



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Matière

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : chimie pharmaceutique

Réf: /

Présenté et soutenu par :

Makhloufi khadidja et Lazreg Ikram

Le : Mercredi 26 Juin 2019

Conception in silico de nouveaux composés anticancéreux

Jury :

YOUCEF Oum Hani	M.C.B	Université Med Khider de Biskra	Présidente
KHAMOULI Saida	M.A.A	Université Med Khider de Biskra	Rapporteur
BELAÏDI Salah	Professeur	Université Med Khider de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018-2019

Dédicace

Je dédie ce projet:

A mon cher père

A ma chère mère

*Qui n'ont jamais cesse de formuler des prières a mon
égard de me soutenir et de m'épauler pour que
je puisse atteindre mes objectifs*

*A mon frère **Nadjí** A mes sœurs **Amani Ryhana** et
Ayat Elbatoul*

*Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout
au long de mon étude*

*A mon cher binôme **Khadidja***

*Pour sa entent et sa sympathise, et Pour leur
indéfectible soutiens et leur patiences infinies*

A mon cher

***Ibtissam** et **Mariam** et **Salima** et tout ami qui m'a
aide supporté dans les moments difficiles dans la site*

A mes chères amies

***Reguia Mana** et **Reguia Menacer** et **Hanaà** et **Hayat**
et **Chahar zad** et tout mes amis de la promotion avec
lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.*

A toute ma famille

A tous mes autres amies

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment

Ikram

Dédicace

Je dédie ce travail :

*A Mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour,
leur tendresse,
leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, pour
toute leur
assistance et leur présence dans ma vie.*

Merci d'être toujours là pour moi

A mon adorable frère Azzedine.

*A Mes sœurs pour leurs encouragements permanents et leur
soutien
moral.*

*Aux cœurs purs et gentils et aux âmes innocentes aux vents
de ma vie à qui je serai leur tante Tassnime et Adame*

*A Ma chère amie, mon binôme Ikram, qui j'ai trouvé l'entente
dont j'avais
besoin.*

*A Tous mes amis de la promotion avec lesquels j'ai partagé mes
moments de
joie et de bonheur.*

*A Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve
ici
l'expression de ma reconnaissance.*

Khadidja

Remerciements

*Avant tout, nous remercions Allah qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans de
Bonnes conditions.*

Après un long parcours notre mémoire touche à Sa fin. Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre rapporteur

Madame KHAMOULLI Saïda

*Maitre-assistant à l'université Mohamed Khider, pour nous avoir encadré durant toute la période de préparation du mémoire, pour tout le temps qu'il nous a consacré à nous former, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi de
ce travail.*

Nos vifs remerciements vont également les membres de jury Belaidi Salah et Youcef Oum haní pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger notre travail

Enfin, nous remercions nos familles, nos amis et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités.

sommaire

Liste des tableaux	i
Liste des figures	iii
Liste des principales abréviations	iv
Introduction générale	2
<i>Chapitre I : Généralité sur cancer et les coumarines</i>	
1. Cancer.....	6
1.1. Généralité.....	6
1.2. Définition.....	6
1.3. Le différent type de cancer et différentes classifications.....	7
1.4. Les étapes de la transformation cellulaire tumorale.....	7
2. Cancer de sein.....	9
2.1. Définition.....	9
2.2. Les type de cancer du sein.....	10
2.3. Les facteurs de risque de cancer du sein.....	11
2.4. Le diagnostic.....	12
2.5. Traitements.....	12
3. Récepteur CDK.....	15
3.1. Introduction.....	15
3.2. Définition.....	15
3.3. Mécanisme d'activité des CDK.....	16
3.4. Inhibiteur de CDK.....	17
3.5. La famille de CDK.....	17
3.6. Applications thérapeutiques potentielles des inhibiteurs de CDK.....	18
4. Coumarines.....	18
4.1. Définition.....	18

4.2. Les différentes méthodes de synthèses des coumarines.....	19
4.3. Propriétés physico chimique.....	19
4.4. Activités thérapeutiques des coumarines.....	19
Références bibliographiques.....	21

Chapitre II : Méthodes de criblage virtuel in silico

1. Drug discovery.....	25
1.1. Histoire de la découverte des médicaments.....	25
1.2. Choix d'une cible thérapeutique.....	25
1.3. Identification de « hits ».....	26
1.4. Génération et optimisation de « leads ».....	26
1.5. Test précliniques.....	27
1.6. Test cliniques.....	27
2. Méthodes de criblage virtuel in silico.....	28
2.1. Criblage virtuel « ligand-based ».....	29
2.2. Criblage virtuel « structure-based ».....	30
3. Le docking ou l'amarrage moléculaire.....	30
3.1. Programmes de docking les plus cites.....	32
3.2. Type de docking moléculaires.....	32
3.2.1. Docking rigide.....	32
3.2.2. Docking flexible.....	33
3.2.3. Docking semi flexible.....	33
3.3. Le processus de scoring.....	33
3.3.1. Familles de fonctions de score.....	34
3.3.1.1. Fonctions de score empirique.....	34
3.3.1.2. Les fonctions de type knowledge-based.....	34
3.4. Algorithmes de recherche.....	34
3.4.1. Algorithme systématique.....	35

3.4.2. La algorithme stochastique.....	35
3.5. Les interactions protéine-ligand.....	36
3.5.1. Les différentes interactions.....	36
4. Filtrage par ADME –TOX.....	38
Références bibliographiques.....	40

Chapitre III : Résultat et Discussion

1. Introduction	45
2. Première Partie : Docking moléculaires.....	46
2.1. Méthodologie des calculs.....	47
2.1.1. Préparation de l'enzyme.....	47
2.1.2. Préparation des ligands.....	47
2.2. Résultats de docking moléculaire.....	50
2.2.1. Détection des cavités dans l'enzyme CDK2.....	50
2.2.2. Énergie d'interaction.....	51
3. Deuxième partie : Filtration par ADME /TOX.....	61
3.1. Drug-likeness Prédiction.....	61
3.1.1. La règle de Lipinski.....	61
3.1.2. Les règle de Veber.....	63
3.2. ADME Prédiction (absorption, distribution, métabolisme, l'excrétion, et de toxicité)...	64
3.3. Bio activité score.....	64
Références bibliographiques.....	69
Conclusion générale.....	72

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Principaux programmes de docking moléculaire	29
Tableau III.1 : Volume et surface des cavités détectées.....	50
Tableau III.2 : Résultats de docking moléculaire des ligands avec la cavité 1 de CDK2..	52
Tableau III.3 : Les énergies d'interaction Mol Dock Score, Interaction totale, H bond Score et VDW des 6 meilleurs poses sélectionnés et el LS5.....	53
Tableau III.4 : Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand L4.....	56
Tableau III.5 : Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand L9.....	56
Tableau III.6 : Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand L10.....	57
Tableau III.7 : Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand L14	58
Tableau III.8 : Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand L19.....	58
Tableau III.9 : Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand L20.....	59
Tableau III.10 : Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand LS5.....	59
Tableau III.11 : Valeurs des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règle Lipinski.....	62
Tableau III.12 : Résultats des critères de Veber des ligands.	63
Tableaux III.13 : Résultats des propriétés d'absorption, Distribution des ligands et ligand référence.....	64
Tableau III.14 : Résultats propriétés de métabolisme des ligands et ligand référenc.....	66
Tableau III.15 : Résultats propriétés de Toxicité des ligands et ligand référence.....	67

Liste des tableaux

Tableau III.16 : Résultats des paramètres de Bioactivité de score des ligands et ligand de référence	68
---	----

Liste des tableaux

Figure I.1 : Représentation schématique des étapes du processus cancérologène	8
Figure I.2 : Représentation schématique d'un sein en coupe	10
Figure I.3 : Le complexe Cycline / Cdk agit en phosphorylant une protéine	15
Figure I.4 : Représentation schématique de mécanisme d'activité des CDK	16
Figure I.5 : Représentation schématique des inhibiteurs de CDK	17
Figure I.6 : structure de coumarines	18
Figure I.7 : Différentes voies de synthèses des coumarines	19
Figure II.1 : Etapes du processus de recherche et de développement des médicaments ...	25
Figure II.2 : Classification des méthodes de criblage virtuel « ligand-based » et « structure based », les plus utilisés au cours du processus R&D notamment par les chimistes	29
Figure II.3 : Représentation schématique du docking de deux molécules	31
Figure II.4 : principe générale d'un programme de docking	31
Figure II.5 : Interactions électrostatiques	36
Figure II.6 : Liaison hydrogène	36
Figure II.7 : Interaction de Van Der Walls	37
Figure II.8 : Interaction hydrophobe	37
Figure III.1 : Protocole de calcul	46
Figure III.2 : Structure de l'enzyme Code PDB (1KE9)	47
Figure III.3 : Structures chimique des ligands étudiés	49
Figure III.4 : Illustration de l'espace de recherche	50
Figure III.5 : Flexibilité de ligand	51
Figure III.6 : Interactions hydrogène et stériques entre les ligands et acide amines de la cavité 1.....	54

Liste des principales abréviations

MVD : Molegro virtual docker

PDB : Protein Data Bank

VDW : Van Der Waals

Trp : Tryptophane

Tyr : Tyrosine

Val : Valine

Thr : Thréonine

Ser : Sérine

Lys : Lysine

Met : Méthionine

Glu : Acide Glutamique

Gly : Glycine

Cys : Cystéine

Arg : Arginine

Ala : Alanine

Asp : Acide Aspartique

ADMET : Absorption Distribution Métabolisme Elimination – Toxicité



Introduction Générale

Introduction Générale

Le cancer représente un problème majeur de santé publique. Il constitue la première Cause de mortalité dans le monde entier. Plusieurs facteurs sont responsables de cette maladie, parmi lesquelles on trouve l'utilisation des produits chimiques dans plusieurs domaines. La majorité de ces produits chimiques ont des propriétés carcinogènes ou toxiques. donc était considéré comme une maladie aiguë [1].

La cause du cancer implique de multiples voies. Les voies des kinases dépendantes de la cycline (CDK) comme cibles thérapeutiques importantes pour le traitement du cancer ont été bien établies. CDK sont des enzymes impliquées dans la réplication cellulaire, et leur rôle dans la croissance des tumeurs les a longtemps rendus en cibles de drogue attrayantes. Mais les premières tentatives industrielles d'inhibition des CDK pour restaurer les cellules à la normale ont rencontré des problèmes de toxicité. Les inhibiteurs CDK de première génération n'étaient pas spécifiques, inhibant de nombreux CDK différents, ce qui entraîne des types de toxicités et une efficacité réduite. avec des chimiothérapies plus anciennes.

La kinase 2 cycline dépendante (CDK2) est l'une des protéines kinases sérine/thréonine. Il joue un rôle dans la régulation de la transition du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S, et donc dans le contrôle de l'activité de la prolifération cellulaire. Par conséquent, les inhibiteurs CDK2 sont des agents anticancéreux potentiellement efficaces [2].

Le criblage virtuel est une méthode rapide et peu coûteuse. De même, un pré filtrage préalable est recommandé afin de réduire la taille d'une banque de données chimiques et de ne retenir que des composés d'intérêt.

Le docking moléculaire est une méthode computationnelle de développement de médicaments sur la base de structure du récepteur, elle permet de prédire l'effet biologique d'un grand nombre de molécules dans un temps raisonnable et de proposer à la fin une série réduite de molécules à synthétiser ou acheter et à tester expérimentalement sur une cible donnée [3].

Le principal objectif de ce travail est l'utilisation des méthodes de criblage virtuel telle que le docking moléculaire pour la conception des nouvelles molécules bioactives et l'étude de leurs interactions avec l'enzyme kinase cycline dépendante CDK2 et une série

Introduction Générale

de dérivés de coumarines, suivi par une filtration en utilisant les règles de Lipinski et de Veber et propriétés ADMET.

Le manuscrit est divisé en trois chapitres, Le premier chapitre représente des rappels généraux sur le cancer et les coumarines, ensuite la description de l'enzyme kinase cycline dépendante CDK2.

Dans le deuxième chapitre nous avons donné un aperçu sur les principales stratégies de criblage virtuel qui sont les méthodes prédictives les plus utilisées dans la conception des nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique: aussi bien la stratégie basée sur la structure de la cible que celle basée sur la structure et les propriétés des ligands, dans le troisième chapitre, nous avons présenté les différents matériels et méthodes utilisés dans cette étude. Enfin nous exposons l'essentiel de nos résultats et une discussion.

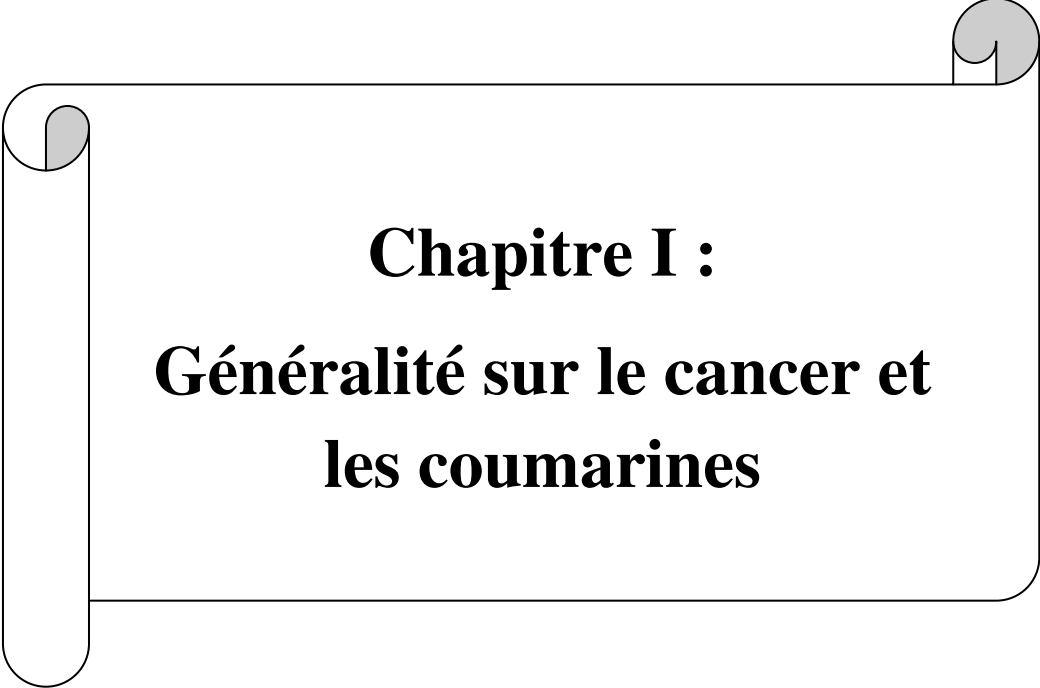
Introduction Générale

Référence bibliographiques :

[1] Laadjal Khaoula, thèse de master en Biochimie et Biologie Moléculaire .Une contribution à l'étude épidémiologique du cancer du sein dans la région de Biskra .Université Mohamed Khider Biskra, 2013.

[2] Shi X-N, Li H, Yao H, Liu X, Li L, Leung KS, et al. (2015) In Silico Identification and In Vitro and In Vivo Validation of Anti-Psychotic Drug Fluspirilene as a Potential CDK2 Inhibitor and a Candidate AntiCancer Drug. PLoS ONE 10(7): e0132072. doi: 10.1371/journal.pone.0132072.

[3] Amina MERZOUG, thèse de doctorat. Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase .Université des Frères Mentouri - Constantine 1.



Chapitre I :
Généralité sur le cancer et
les coumarines

1. Cancer

1.1. Généralité

Le cancer est une maladie résultant d'altérations de l'ADN cellulaire. Les cellules atteintes par ces altérations (cellules malignes) ne suivent plus le processus normal de mort cellulaire programmée, l'apoptose, et deviennent immortelles. Elles se nourrissent par formation de nouveaux vaisseaux sanguins; on appelle ce processus l'angiogenèse. Ces cellules ont la capacité d'envahir et de coloniser les tissus environnants. [1]

Le développement d'un cancer est le résultat d'une combinaison entre, d'une part, l'activation de la prolifération cellulaire et, d'autre part, l'inhibition de signaux restreignant le potentiel prolifératif des cellules. Différents agents conduisent au développement d'un cancer.

Classiquement, on distingue les agents initiateurs et les agents promoteurs. Les agents initiateurs sont des agents génotoxiques qui induisent une lésion définitive de l'ADN. Par contre, les agents promoteurs n'induisent pas de lésions de l'ADN mais favorisent l'expression d'une lésion, préalablement induite par un agent initiateur. [2]

1.2. Définition

1.2.1. Selon L'OMS

« Cancer » est un terme générale appliqué a un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ces caractéristiques et la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans l'autre organe, formulant ce qu'on appelle des **métastases** ». [3]

1.2.2. Selon Larousse de médecine

A/ Le cancer désigne les tumeurs malignes c'est une prolifération anarchique de cellules anormales dites « **maligne** ».a partir d'un foyer primitif pouvant récidiver localement après ablation et essaimer a distance, entraînant la formation des **métastases**.

B/ Cancer : est dû à des altérations génétiques qui perturbent l'équilibre entre stimulation et inhibition de la prolifération cellulaire .Le cancer est une maladie résultant d'altérations de l'ADN cellulaire, survenant dans 90% des cas dans les cellules somatiques. [4]

1.3. Les différents types de cancer et différentes classifications

Nous pouvons distinguer dans la première catégorie les types de cancers nommés comme suit:

- Les cancers hématopoïétiques : qui touchent les cellules sanguines.
- Les sarcomes : qui évoluent dans les tissus conjonctifs (les os).
- Les carcinomes : qui prolifèrent dans l'épithélium (surface composée de cellules uniquement).

La classification des cancers selon l'organe touché est la plus connue. Les plus fréquents sont

- Le cancer du poumon
- Le cancer du sein
- Le cancer du colon
- Le cancer du foie
- Le cancer du pancréas
- Le cancer du sang ou leucémie
- Le cancer de la moelle osseuse ou myélome multiple
- Le cancer des vaisseaux sanguins ou sarcome de Kaposi
- Lymphomes maladie de Hodgkin et lymphomes non-hodgkinien [5].

1.4. Les étapes de la transformation cellulaire tumorale

1.4.1. La cancérogénèse

Une tumeur primaire, appelée aussi tumeur primitive, peut se développer au niveau des différents organes (sein, foie, poumon, peau, testicule, etc.). Les amas de cellules cancéreuses peuvent alors proliférer en allant chercher des éléments nutritifs dans leur environnement immédiat via la formation de nouveaux vaisseaux sanguins; cela constitue l'angiogénèse tumorale. Les cellules malignes peuvent également se détacher de la tumeur d'origine et migrer, par voie sanguine ou par voie lymphatique, vers d'autres régions du corps, formant ainsi des métastases.

Parfois le cancer peut être détecté avant même la formation de métastases. Dans de tels cas, il est important que le traitement puisse être appliqué le plus rapidement possible, et ce afin de limiter la progression tumorale. Elle comprend trois grandes étapes

successives : l'initiation, la promotion et la progression dont les conséquences sont résumées sur (Figure I.1) [6].

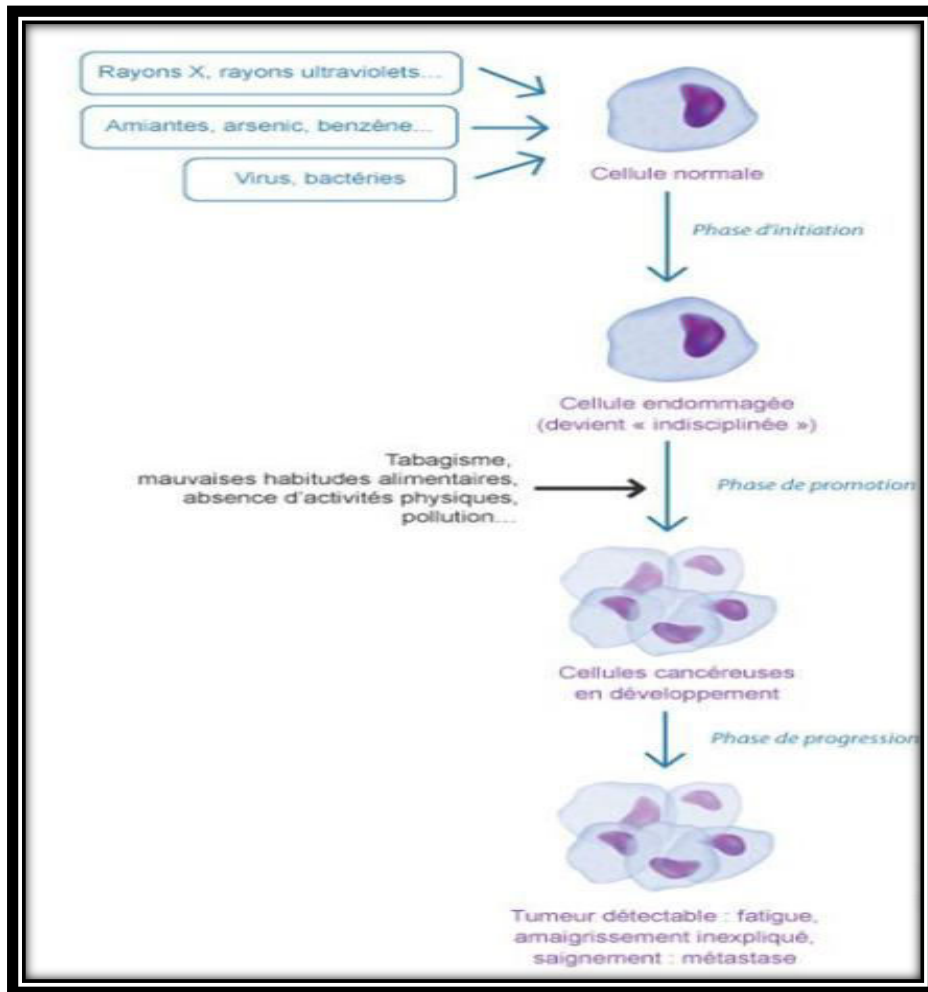


Figure I.1 : Représentation schématique des étapes du processus cancéreux

I.4.2. La tumorigénèse

Il s'agit de la progression des cellules précancéreuses d'abord localement, puis allant en grossissant. Le stade clinique de tumeur est alors atteint. Leur délocalisation par voies lymphatiques ou veineuses au niveau des tissus avoisinants donne lieu à des métastases.

La circulation sanguine joue un rôle catalyseur dans l'invasion cellulaire ou l'angiogénèse. En effet, les cellules tumorales ayant besoin d'un milieu favorisant leur

croissance et leur déplacement, acquièrent un pouvoir d'angiogénèse (système sanguin nourricier) par stimulation des cellules endothéliales des capillaires voisins. [7]

L'acquisition de cette capacité à susciter l'angiogénèse des cellules cancéreuses est la réaction cellulaire normale face à l'hypoxie ou le résultat d'une mutation génétique. Certaines tumeurs primaires peuvent progresser vers un envahissement plus global de l'organisme par échappement de cellules tumorales issues de cette tumeur primaire: on parle alors de métastase.

Les métastases, qui sont l'évolution et la mobilité des cellules cancéreuses vers un ou plusieurs lieux, sont de 2 types :

a).Métastases ganglionnaires ou carcinomes

Se déplacent par les canaux lymphatiques, arrivées au niveau du ganglion, elles peuvent :

- Rester latentes sans activité directe
- Se fixer aux ganglions et s'y multiplier cliniquement palpable
- Traverser le gang
- Se faufiler dans tout le circuit lymphatique, signe évident de l'agressivité de la tumeur. [8]

b).Métastases sanguines ou sarcomes

Pénètrent les vaisseaux sanguins soit de manière directe ou par le biais des canaux lymphatiques. Elles infiltrent préférentiellement les organes où passe un gros volume de sang (foie, poumons... etc.) ainsi que les os (métastases osseuses) [6].

2 .Cancer de sein

2.1. Définition

Le cancer du sein ou (carcinome mammaire) se définit comme une prolifération anarchique et incontrôlée des cellules épithéliales de sein, chez la femme.

Le sein est une glande sécrétrice hypertrophiée. Durant la lactation, des amas de lobes en forme de grains de raisin (glande mammaire ou acini) produisent le lait qui remplit et enfle un système de canalisations particulièrement ramifiées (figure I- 2) [5]. Environ 90% des cancers du sein trouvent leur origine dans les cellules épithéliales des

canaux galactophores (carcinome canalaire), comme ils peuvent se développer aussi à partir des cellules des lobules (carcinome lobulaire) de la glande mammaire. Ils sont dits « in situ » lorsque les cellules cancéreuses sont confinées aux canaux et lobules. Cependant il est dit « infiltrant » lorsque les cellules cancéreuses sont présentes dans les tissus qui les entourent [9].

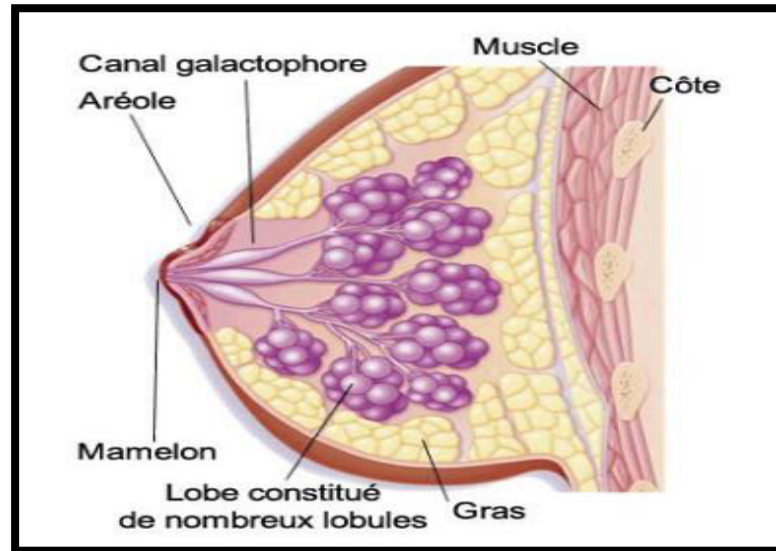


Figure I.2 : Représentation schématique d'un sein en coupe

2.2. Les types de cancer du sein

2.2.1. Le cancer in Situ

Aussi appelés états « précancéreux », ce sont des cancers qui se développent dans la lumière des canaux galactophores et des lobules sans franchir la membrane basale et sans envahir le tissu conjonctif. Ils peuvent donc être intracanaux, avec une évolution inéluctable vers l'invasion, ou intra lobulaires, avec un risque d'évolution vers un cancer invasif dans 35% des cas. [10]

2.2.2. Cancers invasifs ou in filtrants

Ces formes de cancer envahissent les **tissus** autour des canaux de lactation, mais demeurent à l'intérieur du sein. Par contre, si la tumeur n'est pas traitée, elle peut se disséminer à d'autres parties du corps (par exemple, les os, les poumons ou le foie) en générant des métastases.

- **Carcinome canalaire.** Il se forme dans les canaux de lactation. Les cellules cancéreuses traversent la paroi des canaux.
- **Carcinome lobulaire.** Les cellules cancéreuses apparaissent dans les lobules regroupés dans les lobes. Puis, elles traversent la paroi des lobules et se disséminent dans les tissus environnants.
- **Carcinome inflammatoire.** Un cancer rare qui se caractérise principalement par un sein qui peut devenir **rouge, enflé** et **chaud**. La peau du sein peut aussi prendre l'aspect d'une peau d'orange. Ce type de cancer progresse plus rapidement et est plus difficile à traiter.
- **Autres carcinomes** (médullaires, colloïdes ou mucineux, tubulaires, papillaires). Ces types de cancer du sein sont plus rares. Les principales différences entre ces types de cancer reposent sur le type de cellules touchées.
- **Maladie de Paget.** Un cancer rare qui se manifeste par une petite **plaie** au mamelon qui ne guérit pas. [11]

2.3. Les facteurs de risque de cancer du sein

On ne connaît pas les causes du développement du cancer du sein qui peut être dû à différents facteurs :

2.3.1. L'âge

Le risque d'avoir un cancer du sein augmente avec l'âge. Il reste rare avant 40 ans mais demeure beaucoup plus fréquent entre 60 et 65 ans. Le facteur âge représente le risque le plus important car on constate qu'après 40 ans le risque de développer un cancer du sein se multiplie par une fois et demie tous les dix ans.

2.3.2. Les caractéristiques individuelles

Le risque est plus important chez les femmes qui ont eu des règles précoces et une ménopause tardive. Il est élevé également chez celles qui n'ont pas eu de grossesse ou une première grossesse après 40 ans, ou encore qui ont pris un traitement substitutif à la ménopause pendant plus de 10 ans. Ce risque augmente aussi avec la consommation excessive de sucres, de graisses animales et d'alcool.

2.3.3. Les antécédents familiaux

Quelques cancers du sein sont liés au fait que plusieurs femmes de la même famille ont été ou sont atteintes par cette même maladie surtout si elles avaient à l'époque moins de 40 ans. Un cancer du sein est également plus susceptible de se développer chez une femme dont plusieurs membres d'une même famille ont souffert d'un cancer du côlon ou des ovaires. Le facteur génétique n'est lié qu'à 5% des cancers du sein [12].

2.4. Le diagnostic

2.4.1. La mammographie

Cet examen de référence des lésions du sein, est utilisé dans le diagnostic, la prise en charge initiale et la surveillance des cancers du sein. L'échographie mammaire bilatérale.

2.4.2. L'échographie

Technique complémentaire de la mammographie dans la précision des caractéristiques tumorales, permet en plus de visualiser le creux axillaire et de détecter des ganglions lymphatiques suspects.

2.4.3. L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) mammaire

L'IRM mammaire est un examen de seconde intention qui permet de préciser la taille et les rapports des lésions volumineuses et de détecter les récurrences à un stade plus précoce. Il permet aussi d'orienter la décision de chirurgie initiale en statuant sur la présence de lésions multifocales ou multicentriques, la présence de lésions controlatérales ou d'atteintes ganglionnaires diffuses. [13]

2.5. Traitements

Le but du traitement du cancer du sein est non seulement d'éliminer la tumeur primaire, mais aussi les métastases. Pour cela plusieurs stratégies

2.5.1. Chirurgie

La chirurgie est généralement le premier traitement auquel les oncologues ont recours lorsque la tumeur est localisée à un endroit précis du corps. Cette opération chirurgicale consiste à enlever la quasi-totalité des cellules cancéreuses. Pour améliorer l'efficacité de la

chirurgie et s'assurer que la tumeur soit entièrement éliminée, l'intervention est souvent associée à un autre traitement, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie.

Un des inconvénients de la chirurgie est la douleur. De plus, cette technique est moins appropriée lorsque le cancer devient invasif. En effet, le procédé chirurgical localisé ne permet pas la suppression des cellules cancéreuses qui auraient accédé à d'autres organes sous la forme des métastases.

2.5.2. Radiothérapie

La radiothérapie est un autre mode de traitement fréquent du cancer; elle concerne pratiquement près d'un patient sur deux. Cette technique consiste à exposer les cellules cancéreuses d'une tumeur à des radiations tout en préservant, autant que possible, les tissus sains et les organes avoisinants. Les rayons ionisants utilisés sont principalement des rayons X, des électrons produits par des accélérateurs linéaires ou, dans une moindre mesure, des rayons gamma générés par le cobalt.

La radiothérapie agit en ionisant les acides nucléiques (ADN et ARN) des cellules. À de fortes concentrations, les radiations fragilisent le contenu des cellules traitées et entraînent une altération des chromosomes de façon à bloquer le mécanisme de multiplication des cellules irradiées et à provoquer leur destruction. La radiothérapie agit localement sur la région visée, son action se limite à la tumeur et à la région avoisinante de celle-ci. Cette technique atteint inévitablement un certain nombre de cellules saines, ce qui peut entraîner, entre autres, des sensations de brûlure [14].

2.5.3. Chimiothérapie

La chimiothérapie est l'un des traitements anticancéreux les plus fréquemment utilisés de nos jours. Ce mode de traitement utilise des substances chimiques, qualifiées de cytotoxiques, pour tuer les cellules cancéreuses ou bloquer leur multiplication. Les médicaments utilisés en chimiothérapie sont appelés des agents antinéoplasiques. Parmi les alkylants, les antibiotiques, les anti métabolites et les antimétabolites.

Les agents alkylants provoquent une lésion biochimique dans l'ADN du noyau et altèrent ainsi la cellule cancéreuse. Les antibiotiques entravent également la multiplication cellulaire. Les anti métabolites, quant à eux, trompent la cellule en imitant des substances indispensables à la division et à la survie des cellules. Et finalement, les antimétabolites bloquent notamment la division de la cellule-mère en deux cellules-filles. Dans l'ensemble,

ces composés antinéoplasiques sont administrés par voie orale ou intraveineuse. Une fois dans le corps, ceux-ci se propagent dans l'ensemble de l'organisme pour altérer les cellules les plus sensibles et à prolifération rapide telles les cellules cancéreuses [15].

2.5.4. Thérapies ciblées

L'existence de marqueurs spécifiques permet le développement de thérapies ciblées.

a).Hormonothérapie

Le développement de certains types de tumeurs est stimulé par des hormones. Ces cancers sont alors qualifiés **d'hormono-dépendants**. L'hormonothérapie est un traitement qui ajoute, bloque ou enlève des hormones afin de ralentir ou de faire cesser la croissance de cellules cancéreuses hormono-dépendantes. Elle permet ainsi d'empêcher le développement de ces tumeurs. Les principales hormones responsables de la croissance tumorale sont les hormones de croissance, les hormones sexuelles, les hormones thyroïdiennes et d'autres molécules endogènes.

L'hormonothérapie consiste à enlever la glande sécrétrice d'hormones, à l'irradier ou encore à administrer des hormones ou autres médicaments agissant sur l'activité hormonale. Les cancers du sein, de la prostate et de l'endomètre sont les principaux cancers concernés par ce type de traitement. Les hormones sont des molécules qui jouent des rôles importants dans l'homéostasie d'un organisme. Une suppression de ces dernières, provoquée par l'anti-hormonothérapie, engendre plusieurs effets secondaires indésirables: bouffées de chaleur, pertes vaginales, prise de poids, thromboses veineuses, douleurs articulaires, douleurs musculaires, ostéoporose et autres [16].

b). Autres thérapies ciblées

De nouvelles thérapies ciblées sont mises au point. Celles-ci correspondent à des médicaments qui freinent la croissance de la tumeur en agissant spécifiquement sur des mécanismes contrôlant le développement de la tumeur. Pour ce type de thérapie, il est donc important de connaître le profil d'expression de la tumeur. Certaines d'entre-elles visent à interagir avec la voie de signalisation HER2. Le Trastuzumab commercialisé sous le nom de Herceptin est un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le récepteur HER2. Cette protéine favorise la croissance des cellules et est surexprimée dans environ un quart des cancers du sein. Ainsi ce traitement bloque le processus de division cellulaire. Un second médicament a été mis sur le marché en 2008 visant aussi la voie HER2, le Lapatinib.

Commercialisée sous le nom de Tyverb, il est un inhibiteur de protéines kinases. Celles-ci sont situées du côté cytoplasmique et sont impliquées dans la voie de signalisation de HER2 [17].

3. Récepteur CDK

3.1. Introduction

Les kinases sont des protéines fondamentales dans le contrôle des fonctions du vivant. On en dénombre 518 chez l'Homme. Elles sont impliquées dans la régulation de la cellule, plusieurs protéines kinases sont dérégulées dans les proliférations cancéreuses. L'intérêt pour les kinases cyclines dépendantes (CDKs) est relativement récent. Il résulte de l'observation de la dérégulation des CDKs dans une grande diversité de maladies telles que les infections virales, les troubles neuro dégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, ainsi que pour certaines maladies rénales et les cancers [18].

3.2. Définition

Les CDK sont des sérine-thréonine kinases, enzymes qui catalysent la phosphorylation (Figure I.4) de protéines cibles (= substrats) jouant un rôle dans les événements du cycle cellulaire (fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN...), ou dans l'avancement du cycle. Leur activité consiste à transférer le groupement γ -phosphate de l'ATP sur une sérine ou une thréonine, présente dans les protéines cibles, à condition que cet acide aminé soit dans une séquence d'acides aminés caractéristique (séquence consensus) spécifiquement reconnue par la kinase (exemple : Ser/Thr-Pro-X-Arg/Lys) [19].

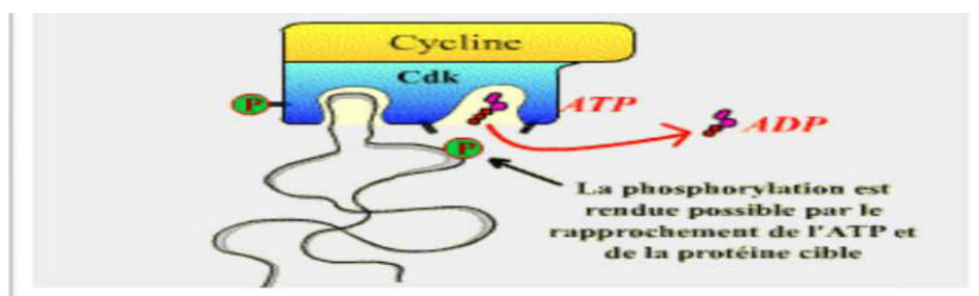


Figure I.3 : Le complexe Cycline / Cdk agit en phosphorylant une protéine

Chapitre I : Généralité sur le cancer et les coumarines

De cette phosphorylation, il résulte un changement de conformation des protéines cibles, ce qui entraîne des propriétés nouvelles pour ces dernières (activation, inhibition, changement de partenaire d'interaction...). Les cyclines n'ont pas d'activité enzymatique, ce sont de protéines régulatrices nécessaires aux CDK pour qu'elles soient enzymatiquement actives.

3.3. Mécanisme d'activité des CDK:

Les CDK sont présentes avant qu'elles ne soient requises. Comment leur activité enzymatique apparaît-elle et disparaît-elle aux moments opportuns ? C'est, premièrement, grâce aux cyclines, qui n'ont pas d'activité enzymatique par elles-mêmes, mais se lient aux kinases du cycle pour les rendre actives. L'activité des CDK est donc contrôlée par un cycle de synthèse/dégradation de leur cycline associée, tout au long du cycle cellulaire.

C'est, deuxièmement, grâce à des protéines déphosphorylant (Cdc 25) ou phosphorylant (CAK, Wee-1). Les CDK et qui permettent de compléter le contrôle de l'activité des CDK. Nous verrons qu'une phosphorylation peut être activatrice ou inhibitrice.

C'est, troisièmement, grâce à des protéines inhibitrices, les CKI (CDK Inhibitor), qui ne régulent que négativement.

Les CDK sont activées, par : des phosphatases : CDC 25 [Déphosphorylations « activatrices », des kinases : CAK (« CDK Activating Kinase » = Cycline H / CDK7), (Polo K, indirect), Phosphorylations « activatrices » [20].

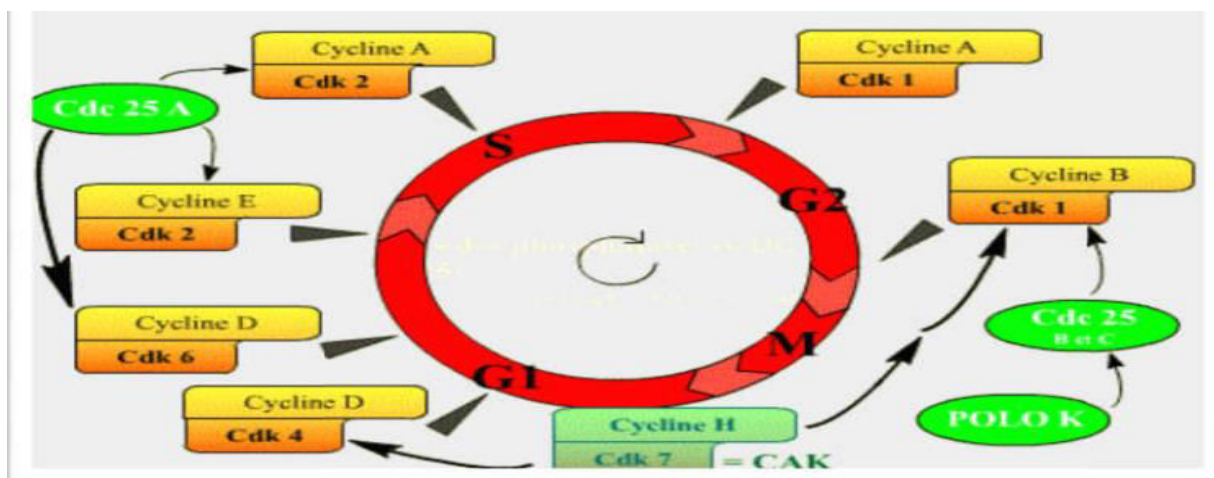


Figure I.4: Représentation schématique de mécanisme d'activité des CDK

3.4. Inhibiteur de CDK :

Les CDK sont inhibées par : des protéines inhibitrices (inhibiteurs physiologiques), les CKI (CDK Inhibitor): p16, p21, p27, qui agissent sur les complexes Cycline / CDK, une kinase : Wee 1 (responsable de Phosphorylations "inhibitrices") qui agit sur la CDK1 en phosphorylant les sites tyrosine 15 et thréonine 14 [21].

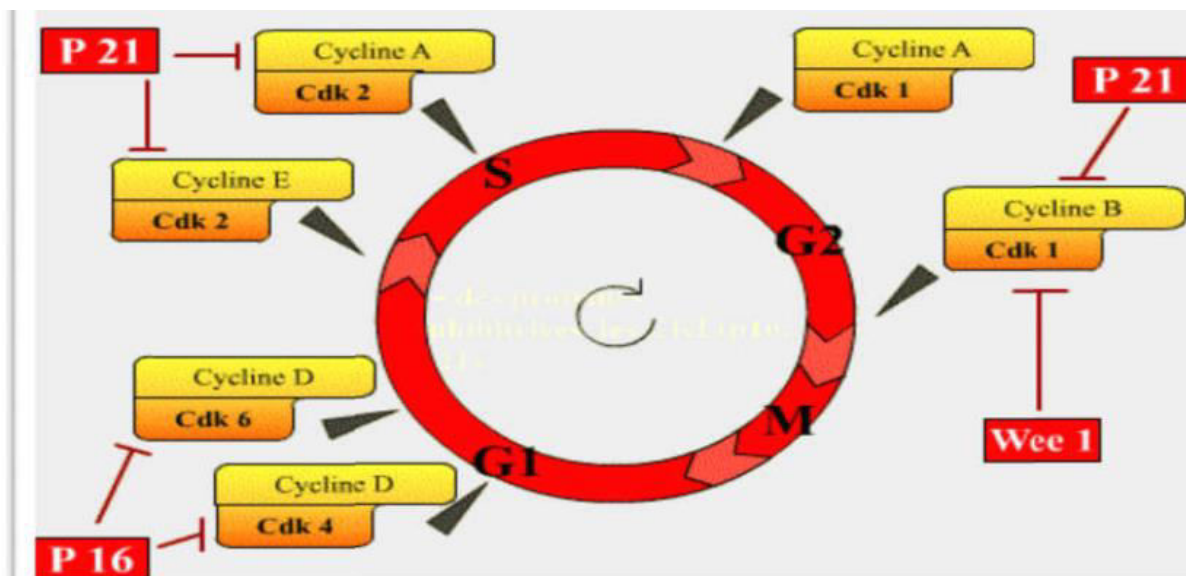


Figure I.5: Représentation schématique des inhibiteurs de CDK

3.5 .La famille de CDK :

3.5.1. CDK2 :

La kinase 2 dépendant de la cycline (CDK2) est l'une des protéines kinases sérine / thréonine. Il joue un pivot dans la régulation de la transition du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S, et donc dans le contrôle prolifération cellulaire. Par conséquent, les inhibiteurs de CDK2 sont des agents anticancéreux potentiellement efficaces. Bien qu'un certain nombre d'inhibiteurs de la CDK2 aient été décrits dans la littérature , et certains sont entrés dans des phases d'essais cliniques, par exemple flavopiridol, roscovitine, et olomoucine, aucune d'entre eux a été approuvé pour une utilisation clinique pour diverses raisons, telles que la toxicité et la spécificité à plusieurs cibles. En outre, aucun des inhibiteurs de CDK2 rapportés n'est destiné au traitement de HEpG2 [22].

3.6. Applications thérapeutiques potentielles des inhibiteurs de CDK

Certaines propriétés des CDK et de leurs inhibiteurs protéiques naturels ont encouragé la recherche d'inhibiteurs chimiques de CDK en vue d'applications antitumorales:

- Altérations très fréquentes, dans les tumeurs humaines, des CDK et de leurs régulateurs.
- liens directs entre oncogènes et suppresseurs de tumeurs, d'une part, et CDK et leurs régulateurs, d'autre part.
- suppression de la prolifération cellulaire par surexpression de p16INK4B ou p21cip1.

Les premiers inhibiteurs chimiques de CDK présentent des propriétés intéressantes qui justifient leur évaluation comme produits anticancéreux potentiels et la poursuite de la recherche de nouvelles molécules plus efficaces [23].

4. Coumarines :

4.1. Définition :

Les coumarines sont des composés aromatiques naturels ou synthétiques, portant un groupement benzopyrone dans leur structure. La nomenclature internationale est le 2H-benzopyran-2-one, qui peut être considérée en première approximation comme une lactone de l'acide 2- hydroxy-Z-cinnamique [24].

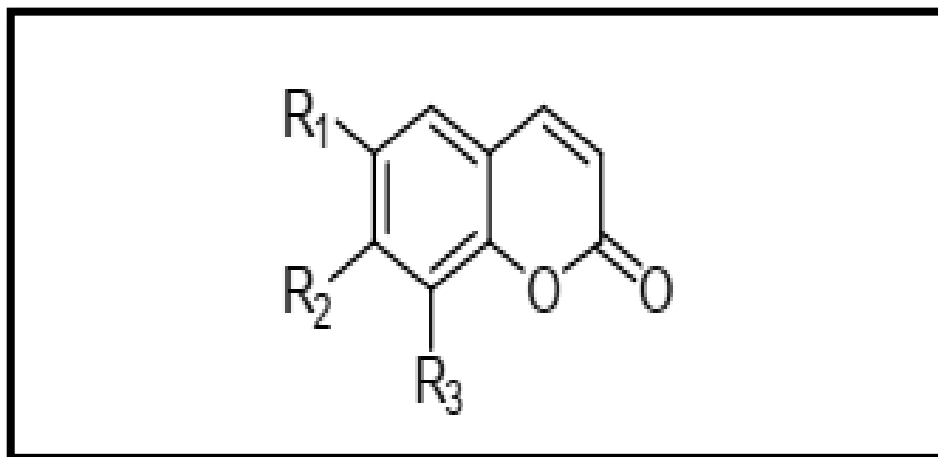


Figure I.6: structure de coumarine

4.2. Les différentes méthodes de synthèses des coumarines :

La figure, ci-dessous, résume les principales voies de synthèse des coumarines [25] :

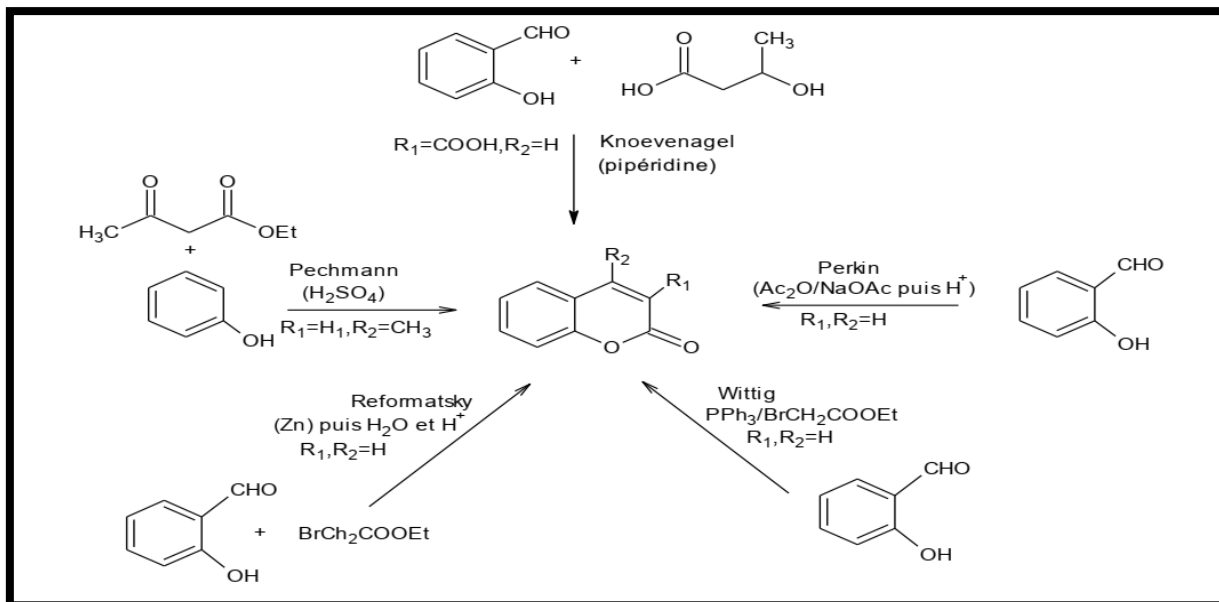


Figure I. 7 : Différentes voies de synthèses des coumarines

4.3. Propriétés physico chimique

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituant, profondément modifié en milieu alcalin (KOH, NaOCH₃), Examinées en lumière ultra-violette [26].

4.4. Activités thérapeutiques des coumarines

Les coumarines et leurs dérivées sont connues pour leurs nombreuses propriétés biochimiques et pharmacologiques. L'activité de ces molécules dépend de la structure et de la nature des substituants [27].

Chapitre I : Généralité sur le cancer et les coumarines

La majorité des coumarines et leurs dérivées ont été soumises à des profondes investigations dans le but d'évaluer leurs effets sur la santé humaine, les recherches ont montré qu'elles peuvent être des agents anti HIV, anti tumoraux, anticancéreux, antimicrobiens, anti inflammatoires, antifongiques, anti oxydants [28].

Ces composés peuvent aussi manifester ont indiquées dans le cas de lymphoedème du membre supérieure après traitement radio chirurgical du cancer du sein concernant les dérivés coumarines, certains d'entre-deux possèdent des activités pharmacologiques, principalement anticoagulantes.les plus connus sont le dicoumarol et l'esculoside tout deux veino toniques et vasculo protecteurs [29].

Références Bibliographique

- [1] Dimitri MOREAU, thèse de doctorat. Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer broncho pulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Université de Nantes, 2006.
- [2] Teniou Soumia, thèse de magistère en Biochimie. Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topo isomérase I de cellules cancéreuses. Université Mentouri Constantine, 2011.
- [3] OMS, Le cancer dans le monde. IARC : Press Lyon, (2005).
- [4] DAMART A, (2008), « **Larousse médicale** », Paris
- [5] Stéphane PUYO, thèse de doctorat. Recherche d'alternatives thérapeutiques aux taxanes dans les cancers de la prostate de hauts grades : Identification d'une signature prédictive de la réponse à l'oxaliplatine. Université Victor Segalen Bordeaux 2, (2011).
- [6] Sarah MOMBELLI, thèse de doctorat. Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale. Université de Reims Champagne-Ardenne Ecole doctorale Sciendes Technologie sante, 2014.
- [7] Y. Asses, Thèse de doctorat, Conception par modélisation et criblage in silico d'inhibiteurs du récepteur c-Met, Université Nancy, 2011.
- [8] Delehedde. M and F. Denhez, Que sait-on du cancer ? EDP Sciences, 2006.
- [9] Korichi Mohamed Anes, thèse de master en biologie moléculaire et génétique. Randomisation Mendélienne facteurs de risque des de survenu de cancer du sein d'une population de Ouargla. Université de Tlemcen, 2016.
- [10] Hammouche Fahima, HAMMICHE Lamia. Mémoire de Master La qualité de vie chez les femmes atteintes du cancer du sein opérées .Université Abderrahmane mira de Bejaia, 2016.
- [11] LORIOT Y ET MORDDANT P, (2001), « **Cancérologie** », édition Masson, France.
- [12] Melle AOUCHICHE Salima, Melle BAKLI Lila, thèse de master en psychologie. L'anxiété chez les femmes atteintes de cancer du sein .Etude de six cas à CHU de Bejaia. Université Abderrahmane Mira de Bejaia, 2016.

Chapitre I : Généralité sur le cancer et les coumarines

- [13] Mlle CHEBBAH Souad, Mlle DIRI Saliha, thèse de master. Les manifestations d'anxiété chez les Femmes atteintes d'un cancer du sein «étude comparative entre les femmes célibataires et Les femmes mariées». Université Abderrahmane Mira de Bejaia, 2014.
- [14] CAROLINE DESCÔTEAUX, thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire (oncologie). Développement de nouveaux composés anticancéreux pour le traitement des cancers féminins. Université du QUÉBEC, 2013.
- [15] Keely N, Meegan M, Targeting tumors using estrogen receptor ligand conjugates, CUIT Cancer Drug Targets 2009;9(3): 370-80.
- [16] GALLON E. « Cancer du sein et sentiment de guérison : impact de l'hormonothérapie lors de l'après-cancer chez la femme ménopause », Université Aix-Marseille I, 2012.
- [17] Christelle Colin-Cassin, thèse de docteur Activité PPAR γ -indépendante des ligands de PPAR γ : une piste pour le traitement des cancers du sein. Université de LORRAINE, 2013.
- [18] Mme BOUZAHAR. Deffar K. Mécanismes moléculaires de l'oncogénèse. Université Ferhat Abbas -Sétif 1(cours en ligne), 2016.
- [19] Dariusz Wolowiec, Martine Ffrench. Kinases dépendantes des cyclines : rôle biologique et implications dans la pathologie humaine C. Proc Natl Acad Sci USA 1995 ; 92 : 8871-5.].
- [20] Marie Claude Lebart. La régulation de la succession des quatre phases du cycle par les complexes Cyclines – Cdk. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) (cours en ligne), 2004 consulté le : 19/05/2001
- [21] Olfa GLOULOU ep LANDOLSI, thèse pour l'obtention du titre de docteur en sciences Identification de nouvelles structures inhibitrices de kinases : conception synthèse et évaluation biologique. Université Paris Descartes et de Monastir, 2013
- [22] Shi X-N, Li H, Yao H, Liu X, Li L, Leung KS, et al. (2015) In Silico Identification and In Vitro and In Vivo Validation of Anti-Psychotic Drug Fluspirilene as a Potential

Chapitre I : Généralité sur le cancer et les coumarines

CDK2 Inhibitor and a Candidate AntiCancer Drug. PLoS ONE 10(7): e0132072. doi: 10.1371/journal.pone.0132072.

[23] MARIE KNOCKAERT. Thèse de doctorat. Mécanismes d'action des inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes: identification de leurs cibles intracellulaires par chromatographie d'affinité. Université de BRETAGNE OCCIDENTALE, 2002.

[24] Harkati B, « valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille ASTERACEAE : Scorzonera Undulata », thèse de doctorat Université MENTOURI Constantine, 2011.

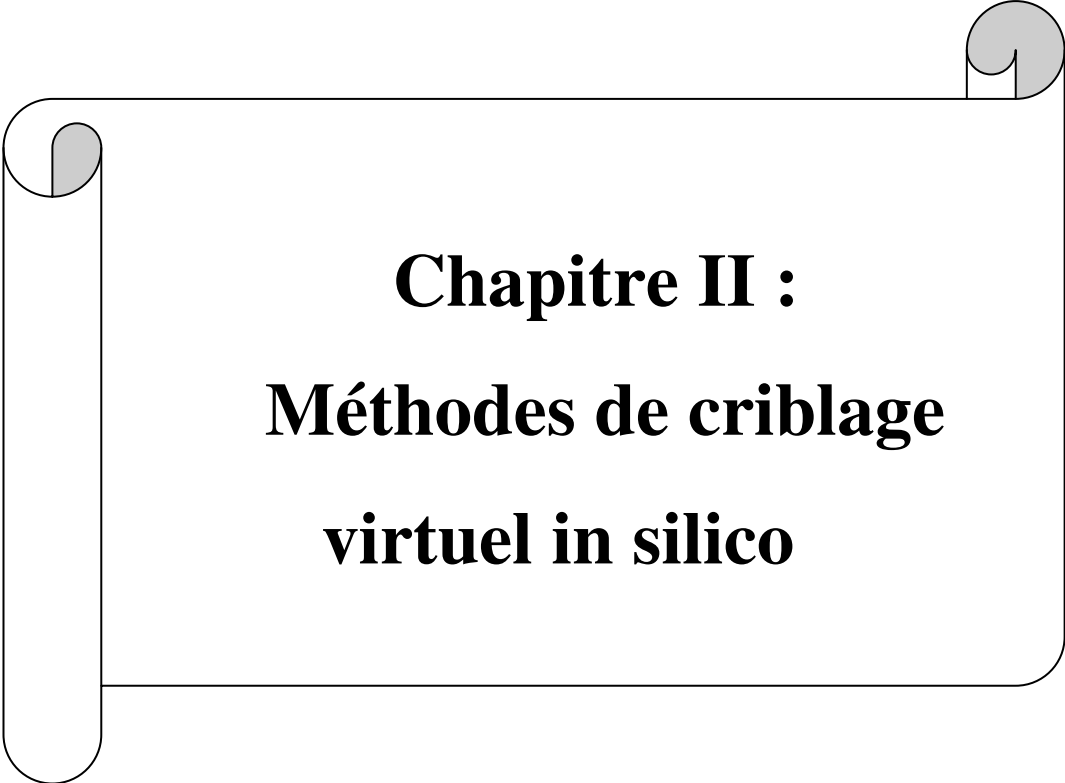
[25] REZINE Fethi, FEDAOUCHE Mohammed Seleem, thèse de docteur en pharmacie Coumarines à intérêt thérapeutique : Synthèse et contrôle analytique. Université ABOU BEKR BELKAID Tlemcen, 2017.

[26] Bruneton J ; (pharmacognosie photochimie plantes médicinales). 2ème édition 1999, Pris.

[27] Fylaktakidou K, CHadjipavlou-Litina D J, Litinas K E, and Nicolaide DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activités. PubMed. 2004;10(30):3813-33.

[28] Miyake Y, Murakam A., Sugiyama Y, Isobe M, Koshimizu K, Ohigashi H, Agric J. Identification of Coumarins From Lemon Fruit (Citrus Limon) as Inhibitors of in Vitro Tumor Promotion and Superoxide and Nitric Oxide Generation. PubMed. 1999; 47 (8) : 3151-3157.

[29] Djamila DJEMOUI, mémoire de master académique. Contribution à l'étude de l'activité anti oxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées. Université KASDI MERBAH OUARGLA, 2012.



Chapitre II :
Méthodes de criblage
virtuel in silico

1. Drug discovery

1.1. Histoire de la découverte des médicaments

Par le passé, un grand nombre de médicaments ont été découverts tout simplement grâce à l'identification de principes actifs extraits de substances naturelles historiquement utilisées dans la médecine non-conventionnelle, ou même par hasard. Par la suite, les avancées dans le domaine de la synthèse chimique et de la pharmacologie ont conduit à une démarche de recherche systématique permettant l'élaboration de nouveaux médicaments de plus grande efficacité [1].

La découverte d'une molécule médicamenteuse « **Drug discovery** ». Le processus de recherche et de développement de nouveaux médicaments est extrêmement long et coûteux. Les différentes étapes sont illustrées schématiquement dans la (Figure II. 1) .Au cours des phases successives, des milliers de molécules doivent être triées et sélectionnées, afin d'obtenir un nombre très limité de candidats.

Pour chaque nouveau médicament, le temps passé depuis la première étape, au cours de laquelle une cible biologique pertinente dans un processus pathologique donné est identifiée, jusqu'à la mise sur le marché d'un composé tourne autour d'une moyenne d'environ 12 à 14 ans. Le coût global estimé est de 800 millions de dollars par composé mis sur la marche [2].

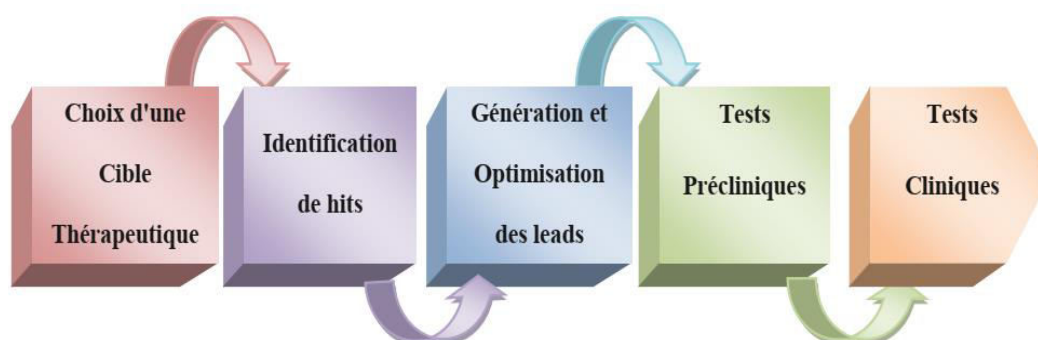


Figure II.1: Etapes du processus de recherche et de développement des médicaments.

1.2. Choix d'une cible thérapeutique

Le choix d'une cible thérapeutique revient à sélectionner, à l'aide de données issues de la littérature, une biomolécule (en général une protéine ou un complexe protéique) impliquée dans un certain processus pathologique. On estime que l'ensemble de médicaments sur le marché cible environ 500 molécules biologiques. Certaines familles de

protéines sont plus représentées dans le génome humain, ou plus souvent impliquées dans des processus pathologiques, mais en contrepartie elles peuvent alors posséder un grand nombre de protéines homologues responsables d'effets indésirables. Certaines sont tout simplement plus aisées à cibler que d'autres, en particulier, il est plus facile pour une petite molécule de perturber la liaison d'un ligand endogène que des interactions protéine-protéine. Ces paramètres régulent ce que l'on appelle la « druggabilité » de la cible [3].

1.3 .Identification de « hits »

Après avoir identifié et choisi la cible thérapeutique, l'objectif est de moduler son activité afin d'altérer le processus pathologique. On appelle touches ou « hits » les composés capables de tels effets. L'approche la plus couramment utilisée dans la recherche de « hits » est le criblage(ou « screening ») de banques de petites molécules (ou chimiothèques). Un criblage peut être réalisé in vitro grâce aux techniques HTS permettant d'estimer l'affinité et activité de milliers de composés sur la cible d'intérêt. Cependant, la mise en œuvre de HTS n'est pas toujours possible du fait de leurs coûts importants et du temps nécessaire à leur exécution. Les criblages de type HTS et la validation pré-clinique des caractéristiques pharmacologiques des composés représenteraient 14% du budget de R&D de l'industrie pharmaceutique [4].

1.4. Génération et optimisation de « leads »

A ce stade, parmi les hits précédemment choisis, quelques molécules se qualifient têtes de séries ou « leads ». Les leads idéaux sont des composés plus actifs et plus sélectifs que les hits dont ils sont issus, tout en présentant des propriétés pharmacocinétiques optimales, qui vont ensuite permettre de créer des séries de composés ayant une activité démontrée sur la cible choisie .L'intervention des chimistes et des chimoinformaticiens est déterminante à cette étape pour obtenir ces leads, en effectuant de vastes études de relations structure-activité (SAR) basées principalement sur la variation et la modification des groupements fonctionnels tout en gardant leurs squelettes de bases des hits. L'analyse des résultats issus de ces études SAR sont actuellement assistés par des approches bioinformatiques, ce qui permet de guider la sélection de nouveaux leads en optimisant les propriétés favorables d'activité « drug-like » (activité, sélectivité, toxicité, propriétés physico-chimiques,...) tout en tentant d'améliorer l'affinité avec la cible et de prouver que l'effet biologique observé est bien induit par interaction du composé avec la cible [5].

1.5. Test précliniques :

La phase précliniques consiste à tester l'activité et la toxicité du candidat-médicament sur cellules et tissus puis sa biodisponibilité, son activité et sa toxicité sur animaux (propriétés ADME-tox: Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité). Ces tests permettent de déterminer les effets de la molécule sur les récepteurs cellulaires et les organes, la marge thérapeutique (dose toxique / dose efficace), ainsi que sa toxicité, aiguë et chronique [6].

1.6. Test cliniques :

Le passage de l'expérimentation animale à l'expérimentation humaine est une période cruciale de la vie d'un médicament, les essais chez l'homme étant fondamentaux pour apprécier l'intérêt thérapeutique d'un médicament. L'évaluation clinique vise à évaluer scientifiquement la valeur thérapeutique d'un médicament, c'est-à-dire à vérifier l'efficacité et l'innocuité d'une molécule chez l'être humain. En d'autre terme, il s'agit de connaître précisément le rapport entre le bénéfice attendu et le risque encouru lors de l'utilisation du médicament chez le patient. L'expérimentation humaine n'intervient que lorsque les études *in vitro* et les études précliniques menées chez l'animal sont jugées satisfaisantes. Elle dure de 6 à 8 ans et se décompose en 3 grandes phases [7].

1.5.1. La phase I

La phase I des essais cliniques se déroule sur un faible nombre de volontaires sains pour s'assurer de la sécurité du candidat médicament en recherchant les effets secondaires qui apparaissent lors de l'administration croissante du candidat médicament. Généralement, 70 % des composés testés passent avec succès cette première phase.

1.5.2. La phase II

La phase II est la première étape où l'on administre le candidat médicament à des patients, dont l'ordre de grandeur est de quelques centaines. Le but est d'évaluer la réelle efficacité de la molécule ainsi que les doses minimales efficaces - et donc la marge thérapeutique vis-à-vis des résultats obtenus à la phase précédente - tout en répertoriant l'apparition éventuelle de nouveaux effets secondaires

1.5.3. La phase III

La phase III est conceptuellement similaire à la phase précédente : il s'agit à nouveau d'administrer la molécule à un groupe de patients. Ici, le nombre de personnes est sensiblement plus important, de l'ordre de quelques milliers. Des malades ayant des profils ethniques variés est également souhaitable pour être le plus proche possible de la réalité. Cette phase permet de confirmer la sécurité et l'efficacité du candidat médicament sur la pathologie ciblée. Une comparaison par rapport à un panel de molécules concurrentes déjà présentes sur le marché est également entreprise, notamment pour pouvoir estimer le service médical rendu par le candidat [8].

1.5.4. La phase IV :

Cette phase relativement récente (également appelée pharmacovigilance) consiste à surveiller, à travers le réseau de médecins et après la mise sur le marché de la molécule, l'apparition d'effets indésirables non détectés précédemment [9].

2. Méthodes de criblage virtuel in silico :

Le terme criblage virtuel regroupe un ensemble de techniques computationnelles ayant pour objectif l'exploration de bases de composés à la recherche de molécules d'intérêt. Une analogie souvent utilisée compare ces techniques à des filtres qui permettraient de constituer des ensembles de molécules partageant certaines propriétés, de sélectionner les plus susceptibles d'interagir avec une cible donnée et d'éliminer les composés supposés inactifs ou les molécules indésirable.

Ces différentes méthodes de criblage virtuel peuvent ainsi être utilisées dans les premières phases de R&D de nouveaux médicaments par les chimistes (Figure II.2) [5]. et en particulier lors de l'identification de hits. Il a alors pour but de sélectionner au sein de chimiothèques variées des ensembles réduits de molécules dont le potentiel d'activité envers la cible thérapeutique visée est supérieur à celui des autres molécules. Il peut également être utilisé lors de l'optimisation des leads. Dans ce cas, le criblage a pour objectif l'identification de motifs structuraux essentiels dans la liaison ligand-récepteur, et la discrimination des meilleurs composés au sein de chimiothèques orientées comprenant des molécules appartenant à une même série.

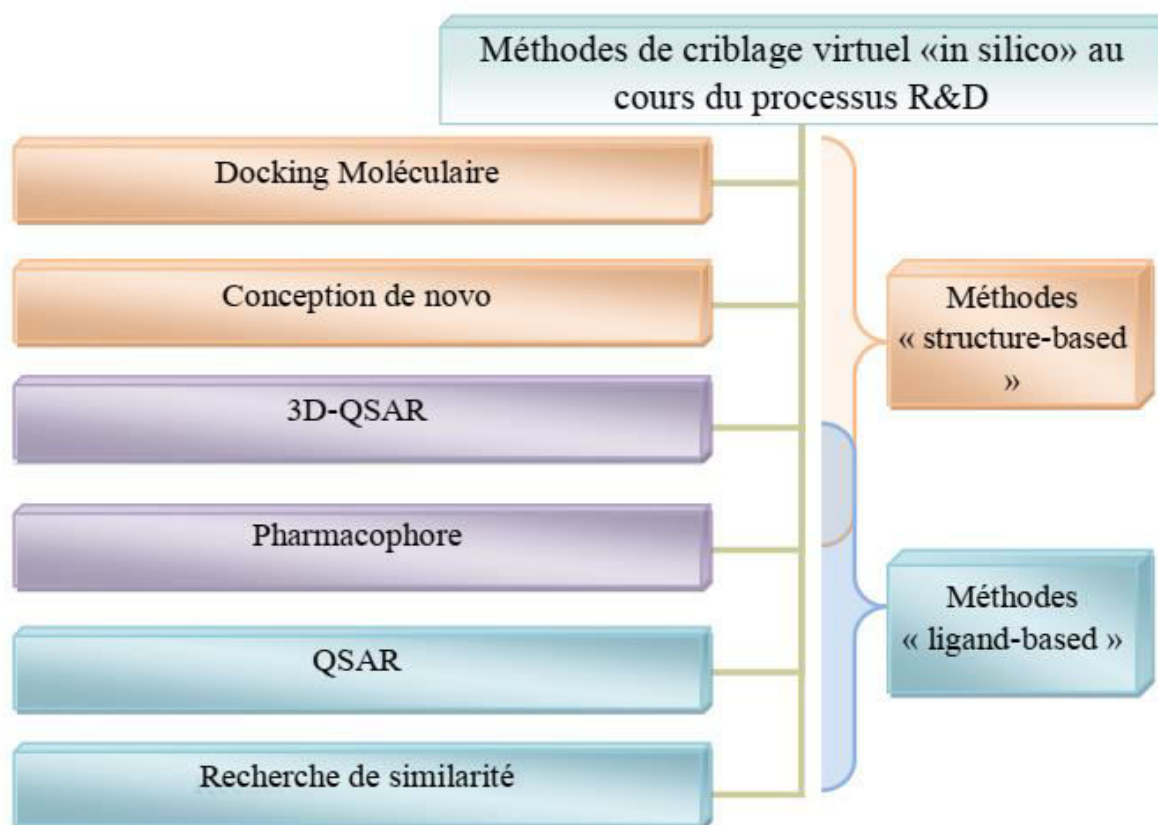


Figure II.2 : Classification des méthodes de criblage virtuel « ligand-based » et « structure-based », les plus utilisés au cours du processus R&D notamment par les chimistes

On regroupe les méthodes in silico en deux grandes familles, le criblage virtuel « structure-based » et le criblage virtuel « ligand-based ». Comme son nom l'indique, le criblage virtuel « structure-based » est basé sur la structure de la cible en évaluant la capacité des ligands à établir des interactions avec le site de liaison étudié et ainsi sélectionner les molécules capables de se lier à cette cible [10].

2.3.1. Criblage virtuel « ligand-based »

Les méthodes de criblage « ligand-based » reposent sur la connaissance préalable de ligands ayant une activité sur la cible thérapeutique. Il sera ainsi possible d'utiliser ces ligands comme une première base de « hits » afin d'identifier d'autres composés similaires, présentant des caractéristiques d'activité communs aux ligands connus de la cible. Différents types de descripteurs moléculaires pourront être calculés pour quantifier la similitude entre composés. Suivant le nombre de ligands connus de la cible thérapeutique, plusieurs méthodes peuvent être employées : la recherche de similarité, le criblage de pharmacophores, ou les approches QSAR [11].

2.3.2. Criblage virtuel « structure-based »

Le criblage virtuel « structure-based » est considéré comme un équivalent in silico d'un test expérimental étudiant la liaison ligand-cible biomoléculaire⁴⁷. Cependant, ce criblage dépend essentiellement de la disponibilité de la structure 3D de la cible biologique qui est obtenue, soit par méthodes expérimentales (RX et RMN) dans des bases de données (tel que PDB: Protein Database), soit par des méthodes de prédiction de la structure 3D par homologie de séquence [12].

Différentes approches peuvent être employées pour réaliser ce criblage: la construction de modèles pharmacophoriques 3D, l'établissement de modèles 3D-QSAR), la conception de novo « de novo design » et les méthodes de docking moléculaire qui sont les plus populaires. Au cours de ce travail, nous sommes intéressés uniquement aux techniques de criblage virtuel « structure-based » [13].

3. Le docking ou l'amarrage moléculaire

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques. Connaître la façon dont les protéines interagissent avec d'autres entités biochimiques est une étape essentielle pour comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées.

Le docking moléculaire in-silico a pour but de prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales in vitro [14].

Il est étude des interactions non-liantes intervenant lors de la formation de complexes (figure II.3) moléculaires telle que : les interactions VDW, les interactions électrostatiques, les interactions Hydrogènes [15].

Le plus souvent, le récepteur est une protéine qui possède un ou plusieurs sites actifs spécifiques, plus ou moins accessibles selon les cas. Le ligand est généralement une molécule flexible étrangère de petite taille. La liaison entre le ligand et le récepteur introduit un signal biologique qui peut avoir diverses formes [16].

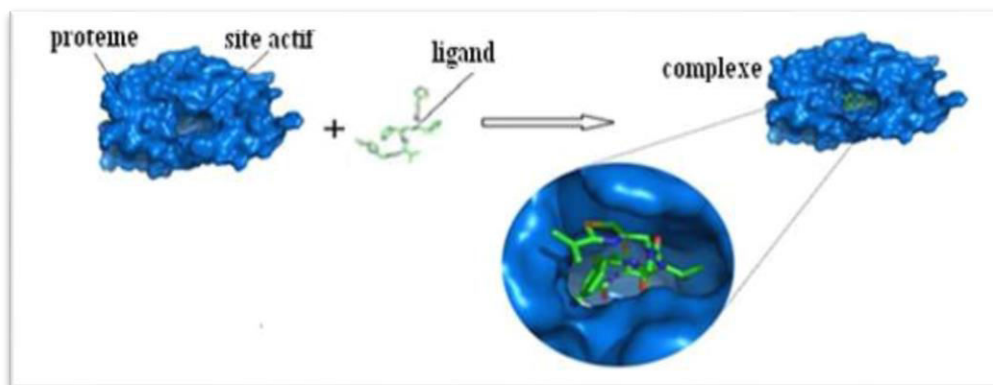


Figure II. 3: Représentation schématique du docking de deux molécules

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (figure II. 4).

- Le Docking (la première étape) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- Le Scoring (la deuxième) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées [17].

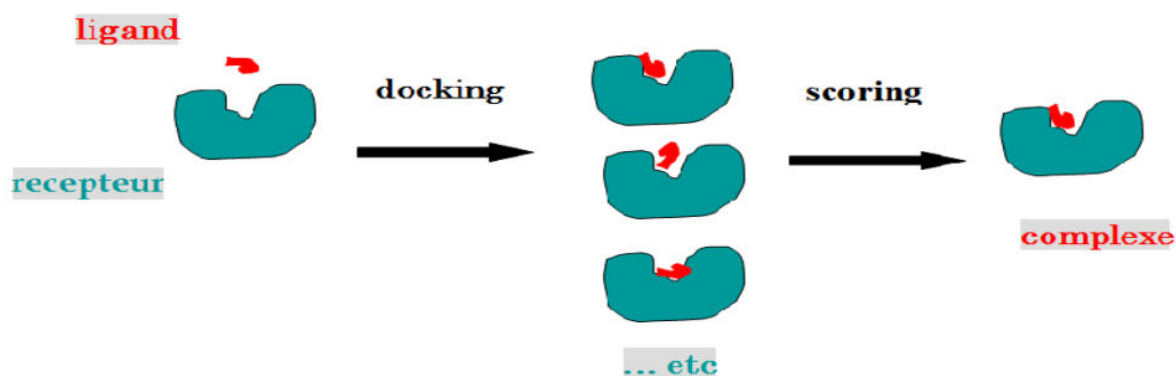


Figure II.4: principe générale d'un programme de docking

3.1. Programmes de docking les plus cités

Plus de 30 logiciels de docking sont actuellement disponibles. Parmi ces programmes d'amarrage moléculaire on peut trouver : comme GOLD, FlexX, DOCK, AutoDock, MOE ou bien UCSF Chimera et Molegro Virtuel Docker (MVD).

L'utilisation des programmes de docking a conduit à de nombreux succès dans le domaine de la découverte de nouvelles molécules bioactives [18].

Tableau II. 1: Principaux programmes de docking moléculaire [19].

Nom	Editeur	Site Internet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

3.2. Type de docking moléculaires

3.2.1. Docking rigide

Dans le cas des méthodes de docking rigide, la recherche de la pose optimale se limite au positionnement. Cette opération consiste en la recherche exhaustive dans l'espace discrétisé des 6 degrés de liberté. Certains programmes, s'ils n'appartiennent pas à la famille des techniques de docking rigide, utilisent plusieurs étapes successives d'optimisation dont les premières peuvent s'apparenter à du docking rigide. Par exemple, le programme Glide, utilise initialement, dans son approche multi-étapes, une recherche systématique pour positionner le ligand de façon approchée au sein du site actif de la protéine [20].

3.2.2. Docking flexible

Lorsque les méthodes de docking prennent en compte la flexibilité du ligand, deux étapes sont effectuées successivement pendant toute la durée du docking. La première étape correspond à une exploration de l'espace conformationnel de manière à retrouver, parmi les conformations proposées, la conformation bioactive. Pendant la deuxième étape une fonction de score évalue ces conformations. Il existe plusieurs types d'algorithmes pour le traitement de la flexibilité du ligand : les méthodes systématiques (fragmentation/reconstruction), les méthodes aléatoires, et les méthodes de simulation (dynamique moléculaire) [21].

3.2.3. Docking semi-flexible

Lorsque l'espace conformationnel des ligands est exploré, le nombre de degrés de liberté de l'espace de recherche peut être conséquent dans le cas de molécules très flexibles. Dans un tel contexte, l'emploi de méthodes de recherche exhaustives apparaît souvent inapproprié car nécessitant des simplifications importantes au niveau de l'échantillonnage. D'autres algorithmes, dits de fragmentation, sont employés pour construire de façon incrémentielle le ligand au sein du site actif de la protéine. L'espace des conformations du ligand est alors restreint au voisinage d'un ensemble initial d'états simplifiés. Cette stratégie de recherche par construction, qui se présente sous diverses variantes, est notamment adoptée par les programmes DOCK, FLEXX, et Hammerhead [20].

3.3. Le processus de scoring

Les méthodes de "scoring" sont utilisées pour estimer mathématiquement l'affinité de liaison entre un récepteur et chacune des poses générées pendant le docking. L'efficacité de ces fonctions de score est au moins tout aussi importante que celle des algorithmes de recherche conformationnelle [22].

L'utilisation des fonctions de scoring est double. Tout d'abord, elles permettent de déterminer la conformation qui représentera au mieux le ligand concerné. Cette conformation est appelée première pose. L'autre utilisation des scores est de pouvoir classer les premières poses de chaque ligand afin d'établir un classement final des molécules les plus prometteuses [23].

3.3.1. Familles de fonctions de score

Les fonctions de scoring peuvent être classées dans deux grandes catégories: les fonctions empiriques et les fonctions basées sur la connaissance (encore appelées «knowledge-based»). Ces deux classes de fonctions sont basées sur un ensemble de complexes ligand-protéine [24].

3.3.1.1. Fonctions de score empirique

Ce type de fonction de score approxime l'énergie libre de liaison en sommant de façon pondérée différents termes d'interaction dérivés de paramètres structuraux. Les différents poids de la fonction de score sont ajustés pour reproduire en priorité des données expérimentales, telles que les constantes de liaison tirées d'un jeu d'entraînement de complexes protéine-ligand. La plupart des programmes de docking implémentent ce type de fonction de score témoignant de leur efficacité (en terme de rapport précision/rapidité). Cependant, le principal inconvénient de ces fonctions empiriques est leur forte dépendance aux données utilisées pour les calibrer qui, en cas de mauvaise paramétrisation, peut limiter leur transférabilité sur des systèmes différents. Parmi les principales fonctions de score empiriques, on peut citer : ChemScore, PLP, et LigScore [25].

3.3.1.2. Les fonctions de type knowledge-based

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexes ligand protéine déterminés de manière expérimentale. Des règles définissant la géométrie préférentielle, des interactions sont déduites de ces structures grâce à des moyens statistiques. Cette alternative aux fonctions empiriques est plus tolérante quant aux interactions présentes au sein du complexe. Leurs expressions sont moins strictes que dans le cas des fonctions empiriques. La fonction PMF fait partie de cette classe de fonction [24].

3.4. Algorithmes de recherche

Il existe différentes Algorithmes qui permettent de prendre en compte la flexibilité du ligand notamment des Algorithmes systématiques et des Algorithmes aléatoires ou stochastiques [26].

3.4.1. Algorithme systématique

Le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles. Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs ancres sont définies. Dans un premier lieu, un ou plusieurs fragments qui doivent être rigides sont placés au sein du site actif et donc mis en interaction avec la cible, puis le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de torsion. Cette méthode a été incorporée dans plusieurs programmes dont Dock, FlexX et Surflex [27].

3.4.2. Algorithme stochastique

L'approche stochastique consiste à effectuer des changements aléatoires dans la structure tridimensionnelle du ligand. Un des principaux algorithmes stochastiques est la méthode par algorithme génétique. Cette méthode a été implémentée dans plusieurs programmes dont AutoDock et GOLD. Concernant la recherche stochastique, nous pouvons citer : La méthode Monté Carlo (MC), algorithme génétique [28].

Dans la méthode Monté Carlo, le ligand est placé au sein du site d'interaction d'une manière aléatoire, où l'interaction sera évaluée par une fonction objective (fonction de score), on pourrait dire que cette conformation est scorée. Une nouvelle conformation est générée selon des changements aléatoires au niveau des liaisons rotatables du ligand et sa position spatiale (translation et rotation). Après chaque changement, le ligand est minimisé et son énergie est calculée (scoré). Alors, si la nouvelle configuration (nouvelle solution) est meilleure que la précédente, elle sera immédiatement acceptée [29].

Les algorithmes génétiques adaptent les principes de compétition biologique et de dynamique des populations. Plusieurs conformations (correspondant à une population d'individus) sont générées, chacune correspondant à un ensemble de variables (par exemple angles dièdres, donneurs de liaisons hydrogène, accepteurs de liaisons hydrogène, ou chromosomes). Ces conformations sont évaluées par une fonction de score et les meilleures sont conservées. Leurs variables sont alors modifiées aléatoirement, soit de manière ponctuelle (mutation), soit en échangeant deux groupes de variables (cross over), formant une nouvelle génération de conformations [30].

3.5. Les interactions protéine-ligand

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Cette association est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles [31].

3.5.1. Les différentes interactions

- Les interactions électrostatiques : Certains acides aminés peuvent être chargés positivement ou négativement, ce qui donne lieu à des interactions électrostatiques. Ces interactions électrostatiques agissent à "longues" distances (autour de 10 Å), entre des groupes d'atomes électriquement chargés (figure II.5) [32].

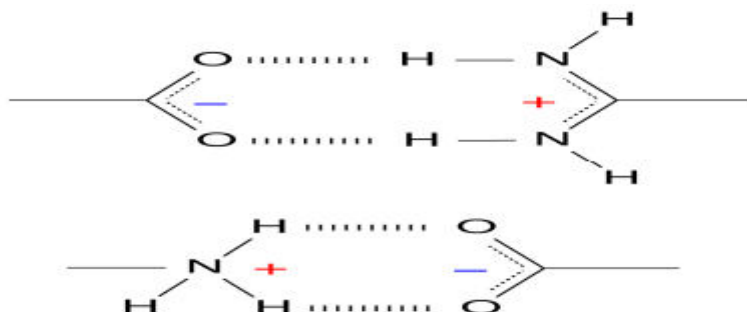


Figure II.5: Interactions électrostatiques.

- La liaison hydrogène : une liaison hydrogène résulte de l'interaction électrostatique entre un atome d'hydrogène (H), lié par covalence à un atome électro-négatif (O, N, S) (donneur) et un deuxième atome électro-négatif possédant une paire d'électrons non partagée (accepteur) [33].

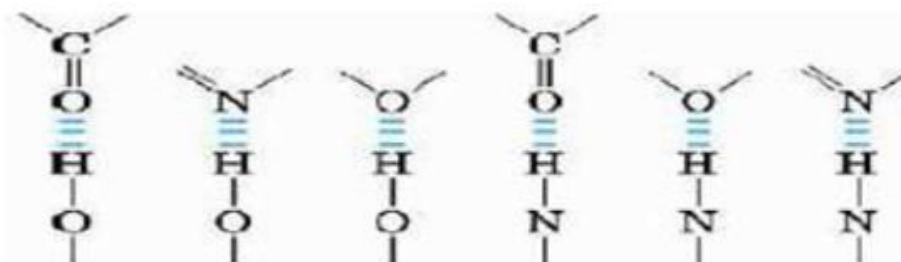


Figure II.6: liaison hydrogène

- Les interactions de Van Der Waals : Ce sont des interactions entre atomes, molécules, ou entre une molécule et un cristal. Ces interactions Van Der Waals

Chapitre II : Méthodes de criblage virtuel in silico

s'appliquent à très courte distance et ne concernent donc que les atomes de surface. Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice [34].

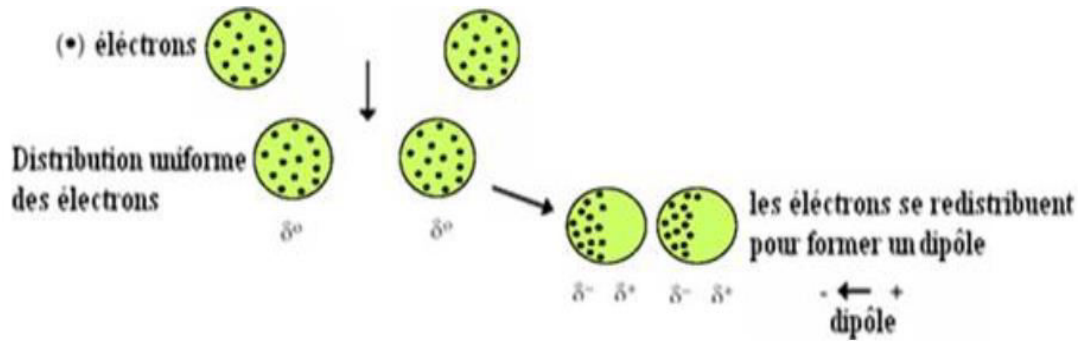


Figure II.7: Interaction de Van Der Walls

- Interactions hydrophobes : Les acides aminés dont le radical est hydrophobe et apolaire ont la propriété d'empêcher la formation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau. Ils forment dans la structure des protéines des zones hydrophobes où les molécules d'eau ne peuvent échanger aucune liaison avec les radicaux d'acides aminés [35].

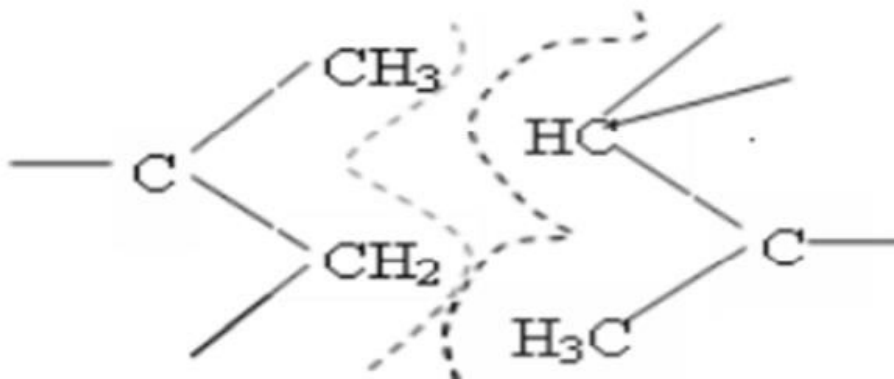


Figure II.8: Interaction hydrophobe

4. Filtrage par ADME –TOX

L'abréviation ADMET représente les concepts pharmacocinétiques suivants : l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion. Ce sont des critères qui décrivent la disposition d'une molécule bioactive dans un organisme. Ils expriment les concentrations du produit dans les différents tissus et système circulatoire de l'organisme. Les résultats obtenus par ces critères permettent d'analyser la performance et l'efficacité d'un produit afin de juger sa capacité à devenir un médicament et son intérêt à poursuivre son développement pour des études cliniques [36].

Les filtres de type ADME-Tox (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité) sont rapidement devenus populaires. Ils reposent sur plusieurs critères déterminant les propriétés pharmacocinétiques potentielles des molécules et sont désormais largement utilisés pour réduire le nombre de composés d'une chimiothèque en sélectionnant les plus adaptés à devenir des candidats médicaments, avant tout processus de criblage. L'utilisation de ces filtres a donné de très bons résultats [4].

Absorption

Cela consiste à analyser la faculté d'une molécule à pénétrer au sein de l'organisme après administration. Une faible solubilité (par exemple due à une trop grande hydrophobicité) ou une forte polarité ont un impact drastique sur l'absorption intestinale d'un composé.

Distribution

Ce critère mesure la capacité d'une molécule à diffuser, par exemple via le flux sanguin, à travers l'organisme. En effet, une molécule doit pouvoir passer d'un compartiment à un autre, afin de pouvoir arriver in fine à l'endroit où sa cible doit être atteinte. La forte liaison à des protéines plasmatiques a un impact négatif sur la distribution d'une molécule.

Métabolisme

Le filtre métabolisme vise à détecter (a) la stabilité de la molécule dans l'organisme qui impacte sur son temps d'action et (b) les métabolites de la molécule initiale, à savoir les composés résultant de sa dégradation ou de modifications enzymatiques ayant lieu au sein de l'organisme. Chez l'homme, les cytochromes P450 du foie sont les principales

enzymes modifiant les xénobiotiques. Ces derniers sont notamment rendus plus hydrophiles par l'introduction d'atomes d'oxygène. Les métabolites peuvent être inactifs, plus actifs que le composé original et bien entendu potentiellement toxiques, d'où la nécessité de les caractériser et de les étudier.

Excrétion (élimination)

Afin d'éviter les phénomènes d'accumulation, souvent synonyme de toxicité, il faut veiller à ce que les composés administrés, ainsi que leurs métabolites, soient bien excrétés de l'organisme, par exemple via l'urine ou les selles [7].

Toxicité

Comme son nom l'indique, ce filtre sert à mesurer la toxicité d'un composé et de ses métabolites. Désormais, la toxicité et le manque d'efficacité des candidats médicaments sont les deux plus grandes causes d'échecs dans le développement d'un médicament. Différents types de toxicité sont évalués, entre autre la cancérogénicité [37].

Un contributeur majeur dans le domaine permettant d'identifier rapidement et à grande échelle des molécules à caractère « drug-like » est communément appelées « **règles de Lipinski** » ou « la règle de 5 » permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Ces règles concernant les propriétés physico-chimiques ont été définies après l'analyse de 2245 médicaments commercialisés ou en phase finale de développement [38].

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da).
- Le logarithme décimal du coefficient de partage eau / 1-octanol, noté logP, doit être inférieur à 5.
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 5.
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 10.

D'autres critères ont été mis en place pour compléter et ajuster les règles de Lipinski dans la sélection de composés « drug-like ».

Ainsi, Veber Choisissent d'utiliser critères suivants la surface polaire (PSA, polar surface area) du composé doit être inférieur à 140 Å² et le nombre de liaisons de rotation ("rotatable bonds" en anglais) doit être inférieur à 10 Sont souvent employés en complément de la « règle des 5 » Ces critères ont été établis par l'étude de la biodisponibilité orale candidats médicaments [39].

Référence Bibliographique

[1] J.G. Lombardino, J.A. III Lowe, The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now, *Nat Rev Drug Discov.* 3 (2004) 853– 862

[2] Mlle LAOUD Aicha, thèse de doctorat .Développement de nouveaux inhibiteurs de l' α -glucosides à partir de molécules d'origine naturelle : étude 3D-QSAR et criblage virtuel, université ANNABA, (2018).

[3] JUDITH ELKAÏM, thèse de doctorat. Drug design *in silico* criblage virtuel de protéines à visée thérapeutique .Université de bordeaux 1, (2011).

[4] Charly EMPEREUR-MOT, thèse de doctorat. Développement d'outils statistiques d'évaluation de méthodes de criblage virtuel : courbes de prédictivité & Screening Explorer, ÉCOLE DOCTORALE Sciences des Métiers de l'Ingénieur , (2017).

[5] Mme LAKEHAL Saoussene, thèse de doctorat. Etude docking et synthèse de dérivés de xanthone : voie d'accès à de nouveaux inhibiteurs de l' α -glucosidase université BADJI MOKHTAR ANNABA, (2016).

[6] Laurent HOFFER, thèse de doctorat. Développement et validation du logiciel S4MPLE. Application au docking moléculaire et à l'optimisation de fragments assistée par ordinateur dans le cadre du Fragment-Based Drug Design. Ecole doctorale des sciences chimiques .Université de Strasbourg (2013).

[7] Véronique MALLO. Sous-traitance et développement pharmaceutique d'un médicament : application a la conception d'un comprimé à croquer , diplôme d'état de docteur en pharmacie, Collège sciences de la sante université de bordeaux ,2015.

[8] Hubbard, R.E. *3D* structure and the drug-discovery process. *Mol. BioSyst.*, 2005. 1: p. 391-406.

[9] Nathalie LAGARDE, Méthodes de criblage virtuel *in silico* : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6.Thèse de doctorat du conservatoire national des arts et métiers. Ecole doctorale Abbé Grégoire Laboratoire Génomique, Bioinformatique et Applications ,2014.

[10] T. Tuccinardi, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2009, 12, 303-314

Chapitre II : Méthodes de criblage virtuel *in silico*

- [11] Farouk CHIBAT et Abdelaziz GUECHIRI. Mémoire de Master. Contribution à la mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase par docking moléculaire. Université des Frères Mentouri Constantine.2015
- [12] B. S. Cummings, *Biochem. Pharmacol*, 2007, 74, 949-959
- [13] D. J. Diller and R. Li, *J Med Chem*, 2003, 46, 4638-4647
- [14] Abdallah Chaouche Med Larb, mémoire de Master 2 en Biochimie. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des alcaloïdes dans l'inhibition de la télomérase par docking moléculaire .Université Constantine 1 , (2014).
- [15] MERZOUG Amina, thèse de magistère, Étude *in silico* de l'inhibition de la peptide déformylase , Université Mentouri Constantine ,(2012).
- [16] BOUTRIF Chams Eddine , MERDASSI Abderraouf ,thèse de Master en Biochimie .Etude *in silico* de La 5-lipoxygénase en tant qu'enzyme impliquée dans les Maladies inflammatoires Université Constantine 1,2014.
- [17] Melle EL HADJ SAID kenza .Diplôme de master en chimie . Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire, université de Tlemcen, (2016).
- [18] Mahdjoub Youcef, thèse de magister. Développement d'une application distribuée en utilisant la plateforme Jini « Application docking moléculaire » université d'Oran, (2011).
- [19] Samah BOUCHAGRA, thèse de doctorat , modélisation des interactions proteine-petites molécules: étude de la relation structure – fonction dans le cas des lipases. Université Badji Mokhtar- Annaba , (2018).
- [20] Alexandre Beaufrait, thèse doctorat en Chimie Informatique , et Théorique développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine fat de la kinase d'adhérence focale FAK .Université Henri Poincaré, (2008).
- [21] Ayaz Mahmood Dar, and Shafia Mir . Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal Bioanal Tech* 2017.
- [22] MERZOUG Amina, thèse de doctorat. Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase .Université des FRERES MENTOURI - CONSTANTINE 1,2018.

Chapitre II : Méthodes de criblage virtuel in silico

- [23] Gohlke H., Klebe G. 2002. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 41 (15), 2644-2676
- [24] Alban ARRAULT, thèse de doctorat. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma université D'ORLEANS,(2007).
- [25] Yasmine ASSES thèse de doctorat en Chimie Informatique et Théorique. France. Conception par modélisation et criblage in silico d'inhibiteurs du récepteur c-Met . Université Henri Poincaré – Nancy I .2011.
- [26] Brooijmans, N.; Kuntz, I.D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2003. 32: p. 335-73
- [27] KRID ADEL, thèse de magister en chimie théorique .*Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant*. Université Mentouri de Constantine , (2008).
- [28] H. Guillemain, Thèse de doctorat, Evaluation et application de méthodes de criblage *in silico*, Université de Cnam, 2012 .
- [29] R.J.Zauhar, G.Moyna, L.Tian, et al, Shape signatures: a new approach to computeraided ligand- and receptor-based drug design. *J Med Chem.*, 46, 5674-90(2003)
- [30] ALMI Imen .Mémoire en Master 2. Contribution à l'étude du Pharmacophore d'une série de dérivés de nitrobenzoxadiazole, sont des inhibiteurs de glutathione-S-transferase P1-1(GSTP) .Université Med Khider Biskra,2016
- [32] Salpin F, « laine et colorants : fixation, quantification et vieillissement. Étude par spectrométrie Roman ».Doct : Université Pierre et Marie Curie, 2008.
- [33] Mme BOUDGHENE, thèse doctorat. Étude de l'Interaction Protéine-Protéine par modélisation moléculaire. Application aux Processus Biologiques .UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM, Janvier 2013.
- [34] Teniou S, Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses.Magt : Technologie des Explorations Biochimiques : Université Mentouri Constantine, 2012.

Chapitre II : Méthodes de criblage virtuel in silico

[35] SALAH DEHBIA .Mémoire de Master. Modélisation de la structure d'une protéine impliquée dans le cancer et de ses interactions avec quelques ligands.Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzo, (2014).

[36] Patrick Darveau , mémoire .Étude des propriétés des dendrimères pour le transport de molécules bioactives .université Québec, Canada,2018.

[37] Wang, J. M.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* 2004, 25, 1157-1174.

[38] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ : Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 46(1-3) :3–26.

[39] Corinne HAZAN, thèse de doctorat. Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de L'ADN polymérase BETA par criblage virtuel et RMN. Université Toulouse III, (2008) .



Chapitre III :
Résultats et Discussion

1. Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre les molécules. De même, la découverte de nouvelles molécules activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom "docking", ont été développées [1].

L'ADME- Tox (Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination - Toxicité) des médicaments est un facteur à prendre en compte dans l'optimisation de candidats prometteurs. Nous avons vu précédemment que des filtres peuvent être utilisés afin de réduire le nombre de molécules à analyser virtuellement. Il serait également judicieux d'élaborer des filtres basés sur les propriétés ADME mais également sur la toxicité potentielle, éliminant ainsi tous les composés qui induiraient des effets secondaires

Dans ce chapitre sera dédié principalement à des interprétations des résultats obtenus, il est scindé en deux parties. Dans la première partie consiste à étudier les interactions entre la kinase 2 dépendant de la cycline (CDK2) et une série de coumarines (23 ligands) par la méthode de criblage virtuel (Docking moléculaire). Pour mieux comprendre les mécanismes d'action de cette enzyme afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs. La deuxième partie, suivie par une filtration en faisant la détermination des paramètres ADME /TOX. Nous avons jugé cette utile de filtre qui est basée sur la règle de Lipinski et de Veber et Bio activité de score. Afin d'identifier des nouvelles molécules susceptibles de devenir des médicaments.

2. Docking moléculaires

Le docking moléculaire est une méthode qui prédit la conformation (position et orientation relatives) la plus favorable de deux molécules en interaction et formant un complexe stable [3].

Notre étude portera sur l'interaction entre le site actif de l'enzyme (CDK2) et les inhibiteurs pour former un complexe stable est réalisée a l'aide du logiciel "Molegro Virtual Docker (MVD)" [4]. Alors nous avons, schématisé un protocole de calcul (voir la figure III.1)

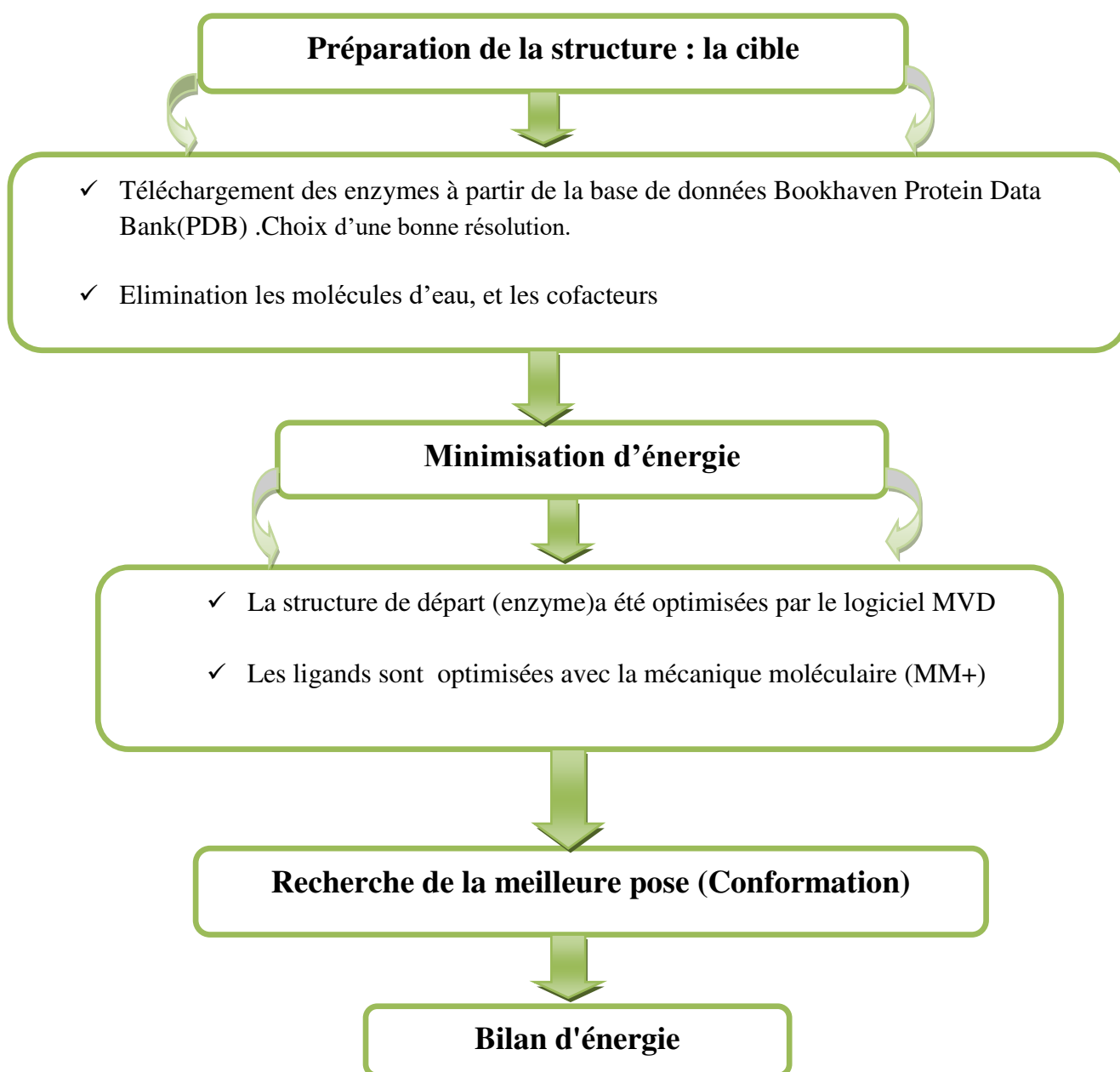


Figure III.1: Protocole de calcul

2.1. Méthodologie des calculs

2.1.1. Préparation de l'enzyme

Le téléchargement de l'enzyme CDK2 a été fait à partir de la base de données Bookhaven Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) avec le code d'accès (1KE9) [5].

La structure tridimensionnelle (structure 3D) de L'enzyme essentiellement déterminées par diffraction en rayon X avec une résolution 2 Å (voir Figure III.2). Ce récepteur est un monomère de protéine avec 281 résidus et 2250 atomes, il est co-cristallisé avec l'inhibiteur

3{[4({[AMINO(IMINO)METHYL]AMINOSULFONYL)ANILINO]METHYLENE}-2-
OXO-2,3-DIHYDRO-1H-INDOLE(C₁₆ H₁₅ N₅ O₃ S). On a éliminé les molécules d'eau et les cofacteurs pour obtenir un modèle simple de l'enzyme.

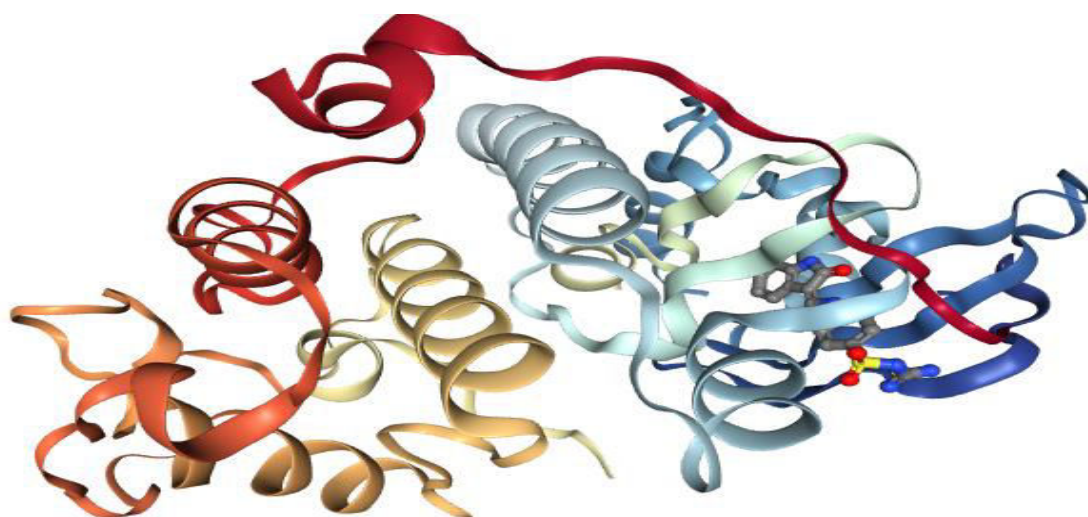
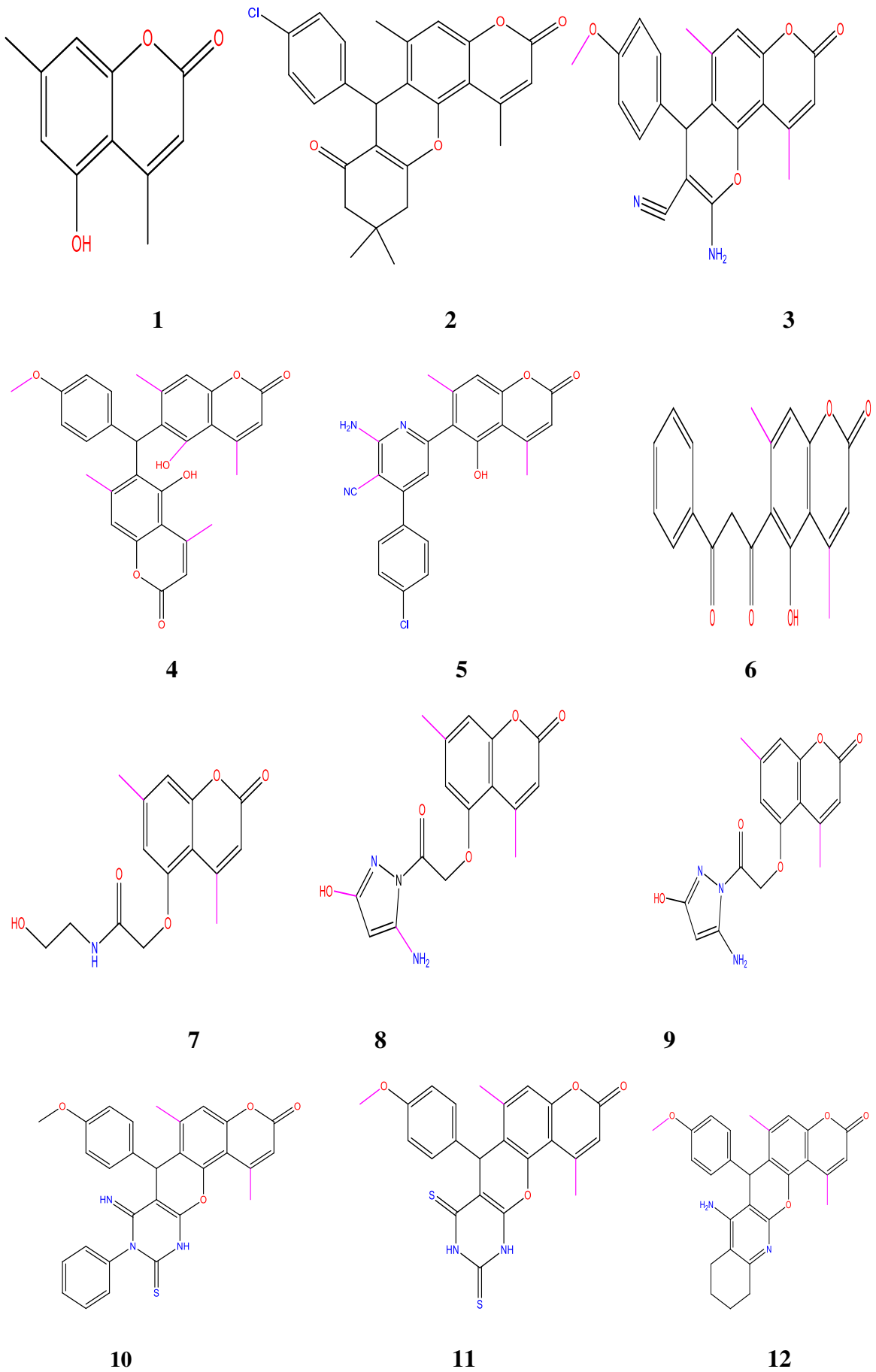


Figure III.2 : Structure de l'enzyme Code PDB (1KE9)

2.1.2. Préparation des ligands

Les molécules utilisés dans ce travail sont des dérivés des coumarines [6] .Leurs structures sont représentées dans le la figure III.3 à l'aide de logiciel chemDraw ultra (12.0), toutes les structures ont été optimisées à l'aide le programme Hyper chem 8.0 [7].Les molécules ainsi obtenues sont enregistrées au format mol, en utilisant la mécanique moléculaire (MM+) ou le champ de force. Le modèle MM+ est basé sur une approche semi-empirique, dont l'objectif est d'optimiser la géométrie de la molécule et de déterminer l'énergie et la distribution électronique.

Chapitre III : Résultats et discussion



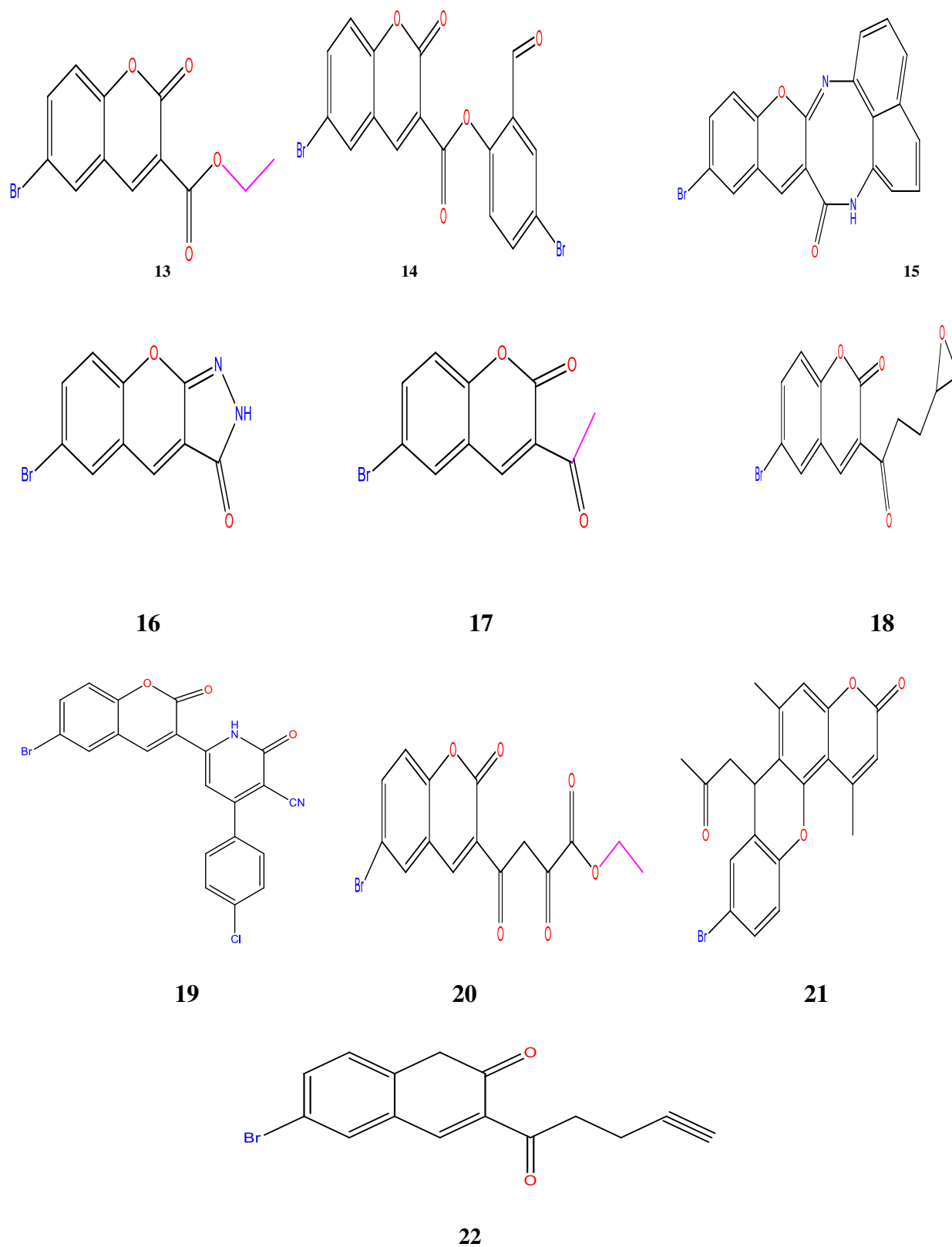


Figure III.3 : Structures chimique des ligands étudiés

2.2. Résultats de docking moléculaire

2.2.1. Détection des cavités dans l'enzyme CDK2

Les cinq cavités ont été détectées dans l'enzyme cdk2 par logiciel MVD (voir la figure 4). Le volume et la surface des cavités sont représentés dans le tableau III.1

Tableau III.1 : Volume et surface des cavités détectées.

Cavités	Volume (Å ³)	Surface (Å ²)
Cavité 1	170.496	492.8
Cavité 2	26.112	103.68
Cavité 3	20.48	80.64
Cavité 4	17.408	70.4
Cavité 5	11.776	53.76

Lors de notre investigation des cavités candidates pour un éventuel site d'interaction de notre étude docking, à l'aide de l'algorithme de prédiction de cavités, nous avons remarqué que le ligand de référence (LS5) est co-cristallisé dans la cavité 1 (figure III.3). Nous avons donc décidé de conserver cette cavité pour la considérer comme centre de recherche (research center) pour le processus du docking. Cette sphère de recherche couvre tous les résidus du site actif avec un rayon de 8.22 Å.

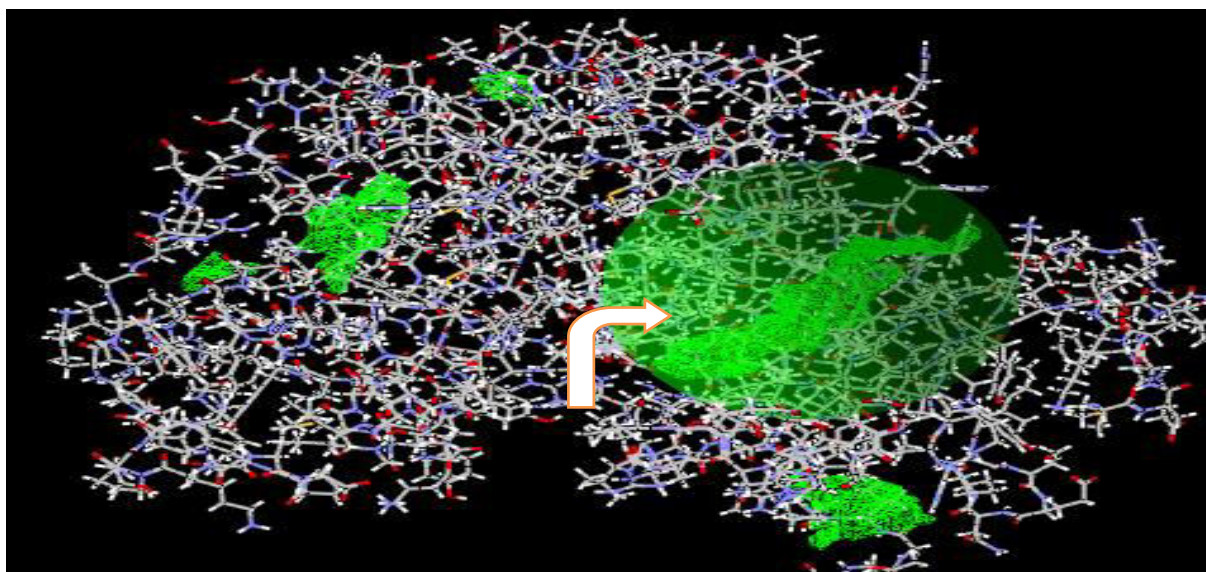
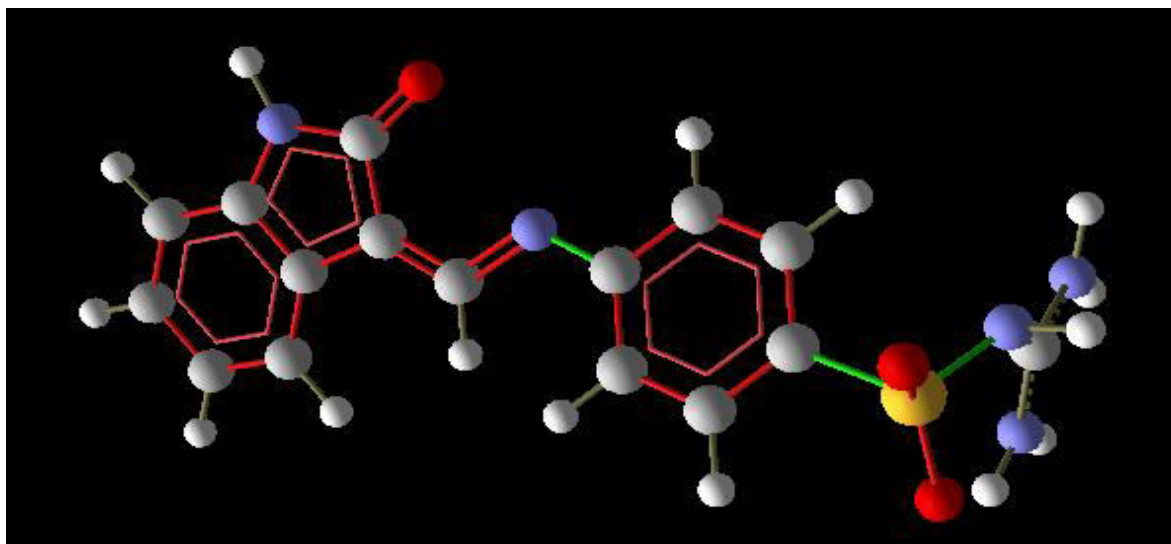



Figure III.4 : Illustration de l'espace de recherche

Dans notre étude l'interaction entre le CDK2 et les ligands (c'est-à-dire formation du complexe), s'effectue dans le cas d'un ligand flexibilité (souvent) (figure 5) et une protéine cible rigide (rarement), ceci explique que lorsqu'on a un ligand a trop de degré de liberté (plusieurs angle de dièdres) signifie qu'il ya plusieurs possibilité de fixation du ligand sur le site actif.



 : Liaisons rigides au cours de docking moléculaire

 : Liaisons flexibles au cours de docking moléculaire

Figure III.5 : Flexibilité de ligand

2.2.2.Énergie d'interaction

L'énergie d'interaction entre la kinase 2 dépendant de la cycline(CDK2), et les ligands sont calculées au cours du docking moléculaire. Elles sont regroupées dans le (Tableau III.2)

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.2 : Résultats de docking moléculaire des ligands avec la cavité 1de CDK2 .

Cavite 1				
Ligands	MolDock Score	E (Interactions)	Liaison-H	E (VdW)
L1	-81.2077	-70.5948	-2.45889	44.4475
L2	-115.188	-104.587	0	119.577
L3	-119.306	-106.559	-1.56452	110.375
L4	-150.655	-116.475	-8.22953	188.385
L5	-133.854	-113.305	-2.54007	112.942
L6	-121.877	-111.587	-1.05343	76.6535
L7	-114.336	-104.289	-4.99175	61.2881
L8	-107.592	-98.7887	-5.460908	51.1697
L9	-115.965	-116.297	-6.53106	59.5845
L10	-129.27	-114.78	-1.15863	147.616
L11	-111.37	-100.107	0	122.145
L12	-106.93	-91.4822	-1.31054	139.258
L13	-99.1016	-91.6734	-2.5	41.317
L14	-127.023	-121.23	-3.15245	68.1296
L15	110.401	-93.9245	-2.44955	96.3519
L16	-89.5246	-84.3514	-4.56555	42.9199
L17	-91.0578	-82.2607	-2.5	41.7721
L18	-114.342	-106.514	-2.5	42.9861
L19	-134.971	-119.176	-0.213119	93.2735
L20	-119.074	-116.678	-1.28114	46.7352
L21	-117.885	-105.788	-1.52352	
L22	-108.859	-108.859	-3.63566	99.5561
L23	-92.9845	-92.9845	-8.14854	43.1039
LS5	-117.306	-108.139	-8.14854	53.786

Chapitre III : Résultats et discussion

Liaison-H : Liaison d'hydrogène.

Mol Dock Score : calculé par la somme d'interaction externe et interne de ligand (interaction protéine-ligand).

Energie d'interaction : entre la pose et les molécules cibles.

E (VDW) : Énergie de Van der Waals.

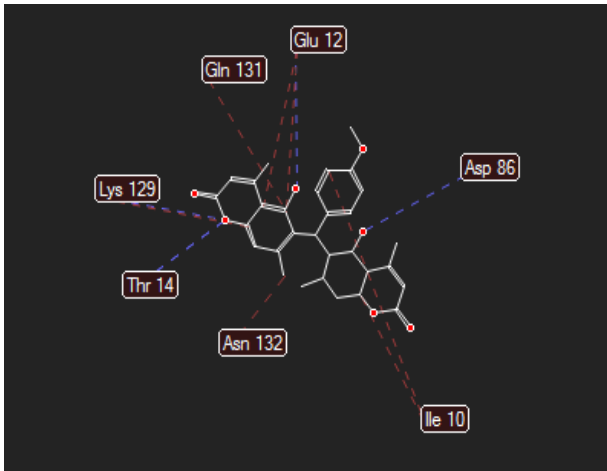
Une fois que le complexe ligand-récepteur est formé, celui-ci va adapter la conformation la plus stable, c'est à dire avec le niveau énergétique le plus faible.

D'après les résultats obtenus, les ligands **L4, L9, L10, L14, L19, L20** possède la plus petite valeur des énergies par rapport aux autres complexes.

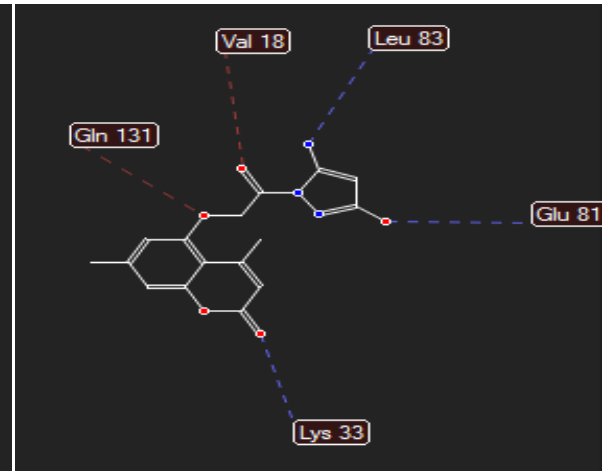
Tableau III.3 : Les énergies d'interaction Mol Dock Score, Interaction totale, H bond Score et VDW des 6 meilleurs poses sélectionnés et le LS5.

Ligands	Mol Dock Score	E (Interaction)	Liaison-H	E (VdW)
L4	-150.655	-116.475	-8.22953	188.385
L9	-115.965	-116.297	-6.53106	59.5845
L10	-129.27	-114.78	-1.15863	147.616
L14	-127.023	-121.23	-3.15245	68.1296
L19	-134.971	-119.176	-0.213119	93.2735
L20	-119.074	-116.678	-1.28114	56.7352
LS5	-117.306	-108.139	-8.14854	53.786

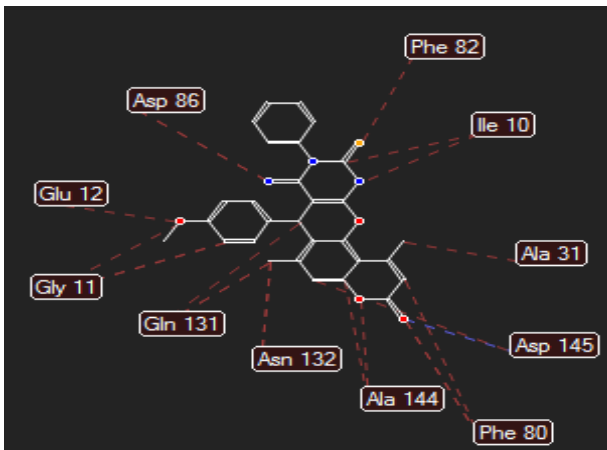
Pour confirmer nos résultats nous avons représenté dans le tableau suivant les différentes interactions entre les résidus du site actif et les 6 ligands.



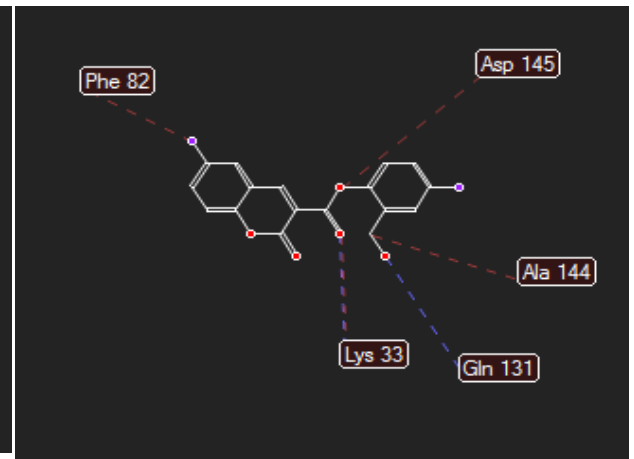
L4



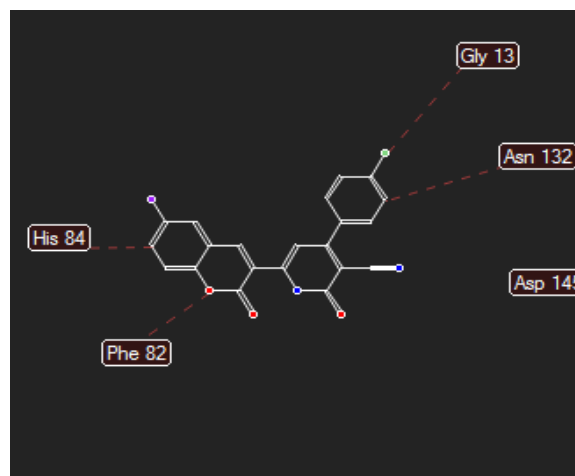
L9



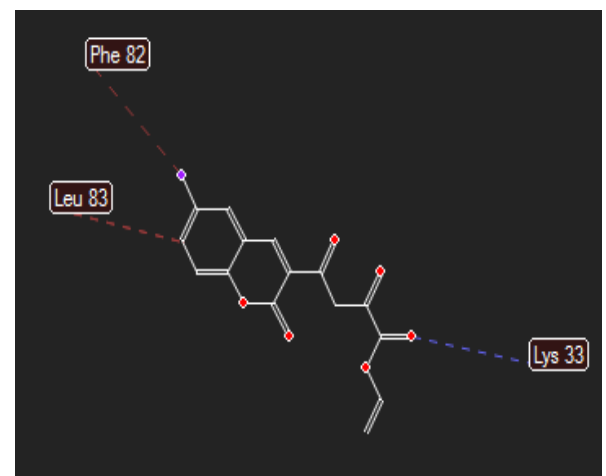
L10



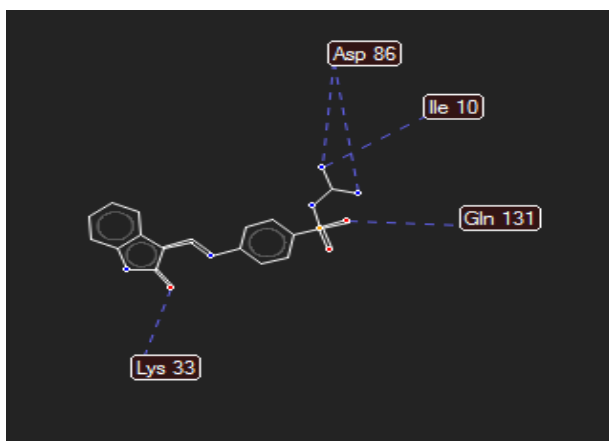
L14



L19



L20



LS5

-----: Interactions stériques

-----: Interactions des liaisons hydrogène

Figure III.6 : Interactions hydrogène et stériques entre les ligands et acide amines de la cavité 1.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les interactions mises en jeu entre les résidus de site actif et les 6 ligands peuvent former des complexes stables. Les distances mesurées entre ces résidus et les six ligands sont regroupés dans les tableaux suivants :

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.4: Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand **L4**.

L4	Les Résidus d'acides aminés	Distance A°	Énergie
	GLU12-----O	3.10	-1.92
Interaction	ASP86-----O	3.02	-2.50
hydrogène	LYS129-----O	3.18	-1.15
	Thr14-----O	3.22	-0.72
	Gln 131-----C	3.13	1.04
Interaction	Asn 132-----C	3.05	1.53
Stérique	Ile 10-----C	3.16	0.82
	Ile 10-----C	3.17	0.77
	Lys 129-----C	3.20	0.63
	Glu 12-----C	3.00	1.80
	Glu 12-----C	3.06	1.47

Tableau III.5: Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand **L9**.

L9	Les Résidus d'acides aminés	Distance A°	Énergie
Interaction	Lue83-----N	2.69	-2.50
Hydrogène	Glu81-----O	2.60	-2.50
	Lys33-----O	2.64	-1.53
Interaction	Gln131-----O	2.71	-2.85
stérique	VAL18-----O	2.98	- 1.93

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.6 : Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand **L10**.

L10	Les Résidus d'acides aminés	Distance A°	Énergie
Interaction	Asp145---O	3.19	-1.17
Hydrogène	ASP86-----N	2.76	3.26
		2.82	2.90
Interaction Stérique	GLU12-----O	2.90	2.42
	GLY11-----O	3.13	1.03
	GLY11-----C	3.11	1.14
		3.13	1.02
	GLn131-----C	3.12	1.09
	GLn131-----C	3.02	2.49
		1.69	4.93
	Asn132-----C	3.13	1.05
		2.58	4.39
	ASP145-----C	2.88	2.55
	Ala144-----C	3.19	0.66
	Ala144-----C	3.15	0.92
	Phe80-----O	2.81	2.99
		2.69	3.68
Phe80-----C	3.13	1.01	
Ala31-----C	3.02	1.67	
Ile10-----N	3.16	0.83	
Ile10-----C	3.02	1.72	
Phe82-----O	3.15	0.90	

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.7: Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand **L14**.

L14	Les Résidus d'acides aminés	Distance A°	Énergie
Interaction hydrogène	Gln131----O	3.10	-2.50
	Lys33----O	3.43	-0.65
Interaction Stérique	Lys33----O	2.97	2.00
	Ala144----C	3.09	1.25
	Asp145----C	3.20	0.63
	Phe82----Br	3.11	1.16

Tableau III.8: Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand **L19**

L19	Les Résidus d'acides aminés	Distance A°	Énergie
Interaction stérique	Gly13----Cl	3.09	1.29
	Asn132----C	2.71	3.56
	Phe82----O	3.01	1.74
	His84----C	2.70	3.64

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.9: Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand **L20**.

L20	Les Résidus d'acides aminés	distance A°	Énergie
Interaction Hydrogène	Lys33-----O	3.25	-1.28
Interaction	Phe82-----O	3.10	1.19
Stérique	Leu81-----C	3.16	0.87

Tableau III.10: Distances des liaisons hydrogène et stériques entre les résidus de site actif et les atomes de ligand de référence **LS5**.

LS5	Les Résidus d'acides aminés	Distance A°	Énergie
	Lle10-----N	3.20	-2.00
Interaction hydrogène	Asp86-----N	3.35	-0.76
	Asp86-----N	2.86	-2.50
	Lys33-----O	3.13	-2.34
	Glu81-----C	3.13	2.02
		2.97	1.80
Interaction	Phe80-----C	3.00	0.88
Stérique		3.16	1.28
	Gly11-----C	3.09	0.74
		3.18	

Chapitre III : Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus (les tableaux III.4 .5.6.7.8.9.10) , en se basent essentiellement sur les liaisons d'hydrogènes, nous remarquons que le ligand L4 établit 4 liaisons hydrogène avec les résidus d'acides aminés **Thr14**, **GLU12**, **ASP86** et **LYS129** avec les distances respectives 3.10, 3.18, 3.02 et 3.22 Å, ensuite le ligand L9 formé 3 liaisons hydrogène avec **Lue83**, **Glu81** et **Lys33** avec les distances respectives de 2.60, 2.64 et 2.69 Å.

Le ligand L10 a montré une seule liaison d'hydrogène avec le résidu d'acide aminé **Asp145** à une distance de 3.19 Å. Le ligand L14 formé 2 interactions de liaisons hydrogène avec les résidus d'acides aminés **Gln131** et **Lys33** par les distances 3.10 et 3.43 Å. Par ailleurs le L19 ne présente pas d'interactions des liaisons hydrogène. Le dernier ligand L20 formé une seule liaison hydrogène avec Lys33 à une distance 3.25 Å.

En outre, comparé à LS5, ces meilleure cinq composé sont montré plus interaction obligatoire d'hydrogène. cette interaction entre les acides aminés avec L4, L9, L10, L14, L19, L20 et LS5 sont récapitulés dans les tableaux montrés, le meilleur composé L4, L9, L10, L14, L19 et L20 ont un nombre plus élevé de liaisons hydrogène que cela LS5.

D'après Imberty [8] les interactions comprises entre 2.5 Å et 3.1Å sont des fortes interactions, celles comprises entre 3.1Å et 3.55Å sont moyennes et celles qui vont au delà de 3.55 Å sont des interactions faibles.

Dans les (Tableaux III.4.5.6.7.8.9.10) Précédent nous pouvons facilement constatés que les distances entre les résidus du site actif et les ligands L4, L9, L10, L14 et L19 et L20 varient dans l'intervalle 2.59 - 3.43, ceci montre qu'il existe deux types d'interactions : forte et moyenne entre ces résidus et le ligand L4, L9, L10, L14, L19 et L20.

On constate que les interactions misent en jeu entre les résidus du site actif et les ligands (L4, L9, L10, L14 et L19 et L20).permettent la formation d'un complexe stable.

3. Filtration par ADME /TOX

L'application du filtre ADME-Tox dans la conception et le développement du médicament joue un rôle important dans le processus étant donné le nombre important des composés "lead" et de drogues qui détiennent des propriétés toxiques [8]. Les propriétés des composés peuvent être prédites à l'aide de la base de données **PreADMET** [9].

3.1. Drug-likeness Prediction

La règle la plus bien connue rapportant les constitutions chimiques à leurs activités biologiques est la règle de Lipinski, il s'appelle la « règle de cinq ». Une autre règle bien connue est la règle comme une avance, c.-à-d. à partir d'une enquête quantitative basée sur 18 paires d'avance et de drogue de structure. PreADMET contient le module de prévision de drug-likeness basé sur ces règles. En outre, il est possible d'employer plusieurs règles comme une drogue que plusieurs chercheurs ont défini des caractéristiques comme une drogue de DB de drogue telles que le CMC, le WDI et MDDR. [10].

3.1.1. La règle de Lipinski

Chaque médicament éventuel doit se conformer à plusieurs critères de base, tels son faible coût de production, être soluble, stable mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité. Ainsi, en 1997, Lipinski et al, proposent ce qu'on appelle couramment la « règle de Lipinski » ou la « règle de 5 » permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure 2D. Selon cette règle un composé possède toutes les chances d'être absorbé par voie orale s'il respecte au moins 3 des 5 critères représentés dans le tableau III.11. [11]

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.11 : Valeurs des différentes propriétés physico-chimiques définissant la règle Lipinski.

Ligands	log p	Mw	noN	noHNNH	nviolation
L4	6.18	498.53	7	2	1
L9	2.26	329.31	8	3	0
L10	3.90	509.59	7	2	1
L14	4.78	452.05	5	0	0
L19	5.15	453.68	5	1	1
L20	1.93	367.15	6	0	0
LS5	0.53	359.41	8	6	1

Note : Le calcul de ces paramètres est réalisé par : molinspiration. [12]

Mw : poids moléculaire ;

nOH, NH : nombre de donneurs de liaisons H ;

nO, N : nombre d'accepteurs de liaisons H ;

logP : logP ou coefficient de partition calculé

Interprétation

On peut avoir à travers le (Tableau III.11) que tous les ligands ont des nombres accepteurs d'hydrogène inférieurs à 10 et nombre donneurs d'hydrogène inférieurs à 5. Et pour Le poids moléculaire de tous les ligands sont inférieurs à 500 DA, ainsi ils peuvent facilement passer à travers la membrane cellulaire, sauf le ligand (L10) est supérieur à 500 DA.

Les ligands L9, L10, L14, L20 ayant les valeurs de la M_i logP inférieure à 5 (Tableau III.11). Donc ils ont une bonne solubilité dans l'eau, une meilleure tolérance gastrique et une élimination efficace par les reins et une bonne perméabilité à travers la membrane cellulaire, à l'exception des ligands L19, L4 valeurs de la M_i logP supérieur à 5.

Ensuite, quand sa valeur de nombre de violations est égale $n=1$ ou $n<0$ signifie les ligands facilement lier au récepteur.

Chapitre III : Résultats et discussion

Les résultats de calcul qui se présentent dans le (Tableau III.11) montrent que tous les composés sont en accord avec les règles de Lipinski, ce qui suggère que ces composés théoriquement n'auraient pas des problèmes avec la biodisponibilité orale.

3.1.2. La règle de Veber

Veber a introduit deux critères supplémentaires d'après l'étude de 1100 composés candidats médicaments, la surface polaire (PSA, polar surface area) du composé doit être inférieure à 140 \AA^2 , le nombre de liaisons de rotation ("rotatable bonds" en anglais) doit être inférieur à 10 pour une bonne biodisponibilité par voie orale. (tableau III.12). [13]

Tableau III.12 : Résultats des critères de Veber des ligands.

Ligands	Tpsa	n rotatable
L4	110.11	4
L9	120.59	3
L10	93.26	3
L14	73.59	4
L19	86.86	2
L20	90.66	6
LS5	137.17	6

Les résultats du (tableau III.12) montrent que les 6 ligands s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères imposés par la règle de Veber. On montre que ces ligands sont capables de présenter une activité biologique sans avoir des problèmes d'absorption par voie orale.

3.2.:ADME Prediction(absorption, distribution, métabolisme, l'excrétion, et de toxicité)

Les propriétés d'ADME/Tox (absorption, Distribution, métabolisme, excrétion/toxicologie) des composés principaux ont été calculés utilisant le serveur en ligne PreADMET. Ce serveur calcule les propriétés pharmacocinétiques comme: Humain Absorption intestinale (HIA), perméabilité à cellules, Caco-2 in vitro (PCaCO2), perméabilité à cellules de Maden Darby rein rénal (PMDCK)), perméabilité (PSkin), attache de protéine de plasma (PPB) et la pénétration de l'hématoméningé [14] ont été résumées dans le tableau suivant :

Tableaux III.13: Résultats des propriétés d' absorption, Distribution des ligands et ligand de référence

Ligands	Absorption			Distribution	
	HIA (%)	Caco-2 cell (nm sec-1)	MDCK	perméabilité de la peau	BBB
L4	95.428012	22.3883	0.164274	-2.49746	1.41022
L9	88.417703	15.6095	67.0686	-3.98847	0.0211188
L10	94.083339	35.0008	0.0584149	-3.0379	4.91113
L14	97.483960	22.7726	0.0506855	-2.82304	0.281373
L19	97.019821	21.3741	0.0274058	-3.22742	0.0752352
L20	98.720092	20.5879	0.173748	-3.45901	0.480439
LS5	71.046117	0.364035	27.8767	-3.18819	0.0427625

HIA: Humane Intestinale Absorption

BBB: Blood-Brain Barrie.

Caco-2 cell : la perméabilité des cellules

Chapitre III : Résultats et discussion

Pour prévoir les paramètres d'absorption et de distribution. Le paramètre des cellules Caco-2 employé pour déterminer la perméabilité du composé, des paramètres des cellules caco-2 ont été étendus 4-70 nm/sec comprenant perméabilité moyenne, l'absorption intestinale humaine (HIA) peut prévoir les pour cent d'absorption l'intestin humain (% de HIA) et l'attache de protéine de plasma (%PPB) est employé pour déterminer la valeur d'une drogue est disponible lié pour la diffusion ou le transport à travers les cellules de membrane et % de valeur de PPB moins de 90% y compris le produit chimique faiblement lié [15].

A travers ces informations et valeurs de (tableau III.14) donc les ligands **L4, L9, L10, L14, L19 et L20** ont des meilleurs scores d'absorption intestinale humaine (HIA) que ligand référence. Une plus grande valeur de HIA indique le composé pourrait être mieux absorbé de la région intestinale sur l'administration par voie orale, ensuite caco-2 values et s'accorder avec les valeurs obtenues (valeur entre 4 et 70 nm/sec). Ainsi, il est a noté que tous les ligands a montré un moyenne perméabilité.

Les valeurs de BBB (CBrain/CBlood) et s'accorder les composés qui ont des valeurs plus grandes que 1 (CBrain/CBlood > 1) sont considérés active dans le CNS peut causer des effets collatéraux et des composés ayant des valeurs moins de 1 (CBrain/CBlood < 1) sont classifié comme inactif dans le CNS.

Par conséquent les ligands L4, L10 ont présenté plus haut valeurs que 1 (CBrain/CBlood > 1), étant considéré active et peut causer des effets collatéraux L9, L14, L19, L20 ayant des valeurs moins de 1 (CBrain/CBlood < 1) étant considéré inactif dans le CNS.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.14: Résultats propriétés de métabolisme des ligands et ligand référence.

Métabolisme						
Ligands	Cyp-2C19- inhibition	Cyp-2C9- inhibition	Cyp-2D6- inhibition	Cyp-2D6- substrat	Cyp-3A4- inhibition	Cyp-3A4- substrat
L4	Inhibiteur	Inhibiteur	Non	Non	Inhibiteur	Substrat
L9	Non	Inhibiteur	Non	Non	Inhibiteur	Faiblement
L10	Non	Non	Non	Non	Inhibiteur	Substrat
L14	Inhibiteur	Inhibiteur	Non	Non	Non	Faiblement
L19	Inhibiteur	Inhibiteur	Non	Non	Non	Faiblement
L20	Inhibiteur	Inhibiteur	Non	Non	Inhibiteur	Faiblement
LS5	Non	Inhibiteur	Non	Substrat	Non	Substrat

Les résultats ont montré que tous les composés n'étaient pas des inhibiteurs du CYP 2D6 et non substrat pour tous les paramètres cinétiques (Tableau III.15). Les résultats suggèrent que les ligands L4, L14, L19 et L20 pourraient être bien métabolisés par le CYP 2D6, facilement éliminés du corps et causant ainsi peu de toxicité.

Cependant, il a également été noté que les ligands L4, L9, L10 et L20 inhibaient l'enzyme CYP 3A4 (Tableau III.14), tandis que L réf était non-substrats aux CYP 3A4, suggérant d'être éliminés sans provoquer de toxicité significative. Une analyse plus poussée a montré que les dérivés L4, L9, L10 et L20 étaient prédits être substrat au CYP 3A4. Cela s'explique par le fait qu'en raison de la complexité des interactions modulatrices avec le cytochrome P450 3A4 qui les faire fonctionner comme des combinaisons de substrat et d'inhibiteur

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.15 : Résultats propriétés de Toxicité des ligands et ligand référence

Ligands	Mutagenicité (Ames test)	Toxicité		HERG inhibition
		Cancérogénicité		
		Mouse	Rat	
L4	Mutagen	Négative	Positive	Risque moyen
L9	Mutagen	Négative	Positive	Risque moyen
L10	Mutagen	Négative	Négative	Risque élevé
L14	Mutagen	Négative	Positive	Risque moyen
L19	Mutagen	Négative	Positive	Faible risque
L20	Mutagen	Négative	Positive	Risque moyen
LS5	Mutagen	Négative	Négative	Faible risque

Le test de toxicité AMES est employé pour savoir si un composé est mutagène ou non. Similaire au ligand référence, tous les ligands de test affichés test de toxicité AMES sont mutagène qui signifie que les ligands sont bactérie. La prévision de négatif de cancérogénicité indique qu'il y a des preuves d'activité cancérogène tandis que le positif signifie que le composé examiné ne montre pas cancérogène activité. De plus, l'inhibition du HERG pour le ligand (L19) présente un faible risque (low-risque).

3.3. Score de bio activité:

Le score de bio activité a été calculé pour le ligand GPCR, l'ion modulateur de canal, inhibiteur de kinase, ligand récepteur nucléaire, inhibiteur de protéase et inhibiteur d'enzyme. la probabilité de score de bio activité est supérieure à 0,00 alors il est actif, -0,50 à 0,0 alors modérément actif et s'il l'est moins que -0.50 alors inactif. [16] Ici, dans notre étude tous les ligands ont été soumis pour le score de bioactivité présenté en **Tableau III.16**

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III.16 : Résultats des paramètres de Score de bioactivité des ligands et ligand de référence .

Score de bioactivité						
Ligands	Ligand GPCR	Modulateur de canal ionique	Inhibiteur de kinase	Ligand de récepteur nucléaire	Inhibiteur de protéase	Inhibiteur d'enzymes
L4	-0.29	-0.43	-0.49	0.07	-0.33	-0.08
L9	-0.60	-0.99	-0.62	-0.65	-0.80	-0.35
L10	-0.61	-0.76	-0.86	-0.47	-0.85	-0.46
L14	-0.71	-0.70	-0.58	-0.21	-0.55	-0.29
L19	-0.44	-0.51	-0.04	-0.17	-0.53	-0.10
L20	-0.70	-0.68	-0.86	-0.36	-0.36	-0.03
LS5	0.10	-0.23	-0.03	-0.38	0.32	-0.04

D'après les résultats de tableau précédent. Le score de bioactivité a été calculé pour le ligand GPCR, le Modulateur de canal ionique, inhibiteur de kinase, ligand de récepteur nucléaire, inhibiteur de protéase et inhibiteur d'enzyme. Résultats du score de bioactivité ont révélé que le ligand **L4** à un score de bioactivité entre -0,50 et 0,00, ce qui signifie que ce ligand est modérément actif selon le score de bioactivité.

Références bibliographique

- [1] GHARDAOUI Meriem, MERRAD Chadia, thèse de Master en biochimie moléculaire et santé. Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la monoamine oxydase B pour le traitement de la maladie de Parkinson. Université des Frères Mentouri Constantine 1,2017.
- [2] Alban ARRAULT, Thèse de doctorat. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données : application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma, université de d'Orleans,(2007).
- [3] <http://www.molegro.com/mvd-product.php>.
- [4] Protein Data Bank (PDB). Biological Macromolecular Resource. [En ligne].<http://www.pdb.org/pdb/home>.
- [5] A. Y. Hassan, M. T. Sarg, M. A. El Deeb, A. H. Bayoumi, c and S. I. El Rabeb. Facile Synthesis and Anticancer Activity Study of Novel Series of Substituted and Fused Coumarin Derivatives J. Heterocyclic Chem., **00**, 00 (2018).
- [6] Hyperchem8.0Hypercube, Inc
- [7] A. Imberty, K. D. Hardman. J.P. Carver, S .Perez; Molecularofprotein _carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concavaline A., Glycobiology, 1991, 1, 631- 642.
- [8] Charly EMPEREUR-MOT, thèse de doctorat. Développement d'outils statistiques d'évaluation de méthodes de criblage virtuel : courbes de prédictivité & Screening Explorer, École doctorale Sciences des Métiers de l'Ingénieur université de CNAM, (2017).
- [9] <https://preadmet.bmdrc.kr/>.
- [10] Harika MS, Kumar TR and Reddy LSS: Docking studies of benzimidazole derivatives using hex. Int J Pharm Sci Res 2017; 8(4): 1677
- [11] Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions peptide de formylase – substances antibactériennes à l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. Thèse de doctorat d'université : microbiologie. Constantine : Université Frères Mentouri. Algérie. 2007.
- [12] Molinspiration. <http://www.molinspiration.com/>
- [13] Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, Fenart L : Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov 2007, 6(8) :650–661.

- [14] Nayara S. Raulino Silva, César F. Santos¹, Luana K. S. Gonçalves, Francinaldo S. Braga, Jonathan R. Almeida, Clarissa S. Lima, Davi S. B. Brasil, Carlos H. T. P. Silva, Lorane I. S. Hage-Melim, and Cleydson Breno R. Santos Molecular Modeling of the Major Compounds of Sesquiterpenes Class in Copaiba Oil-resin. *Int J Pharm Sci* 7(4): 247-263, 2015
- [15] Ruswanto, Siswandono, Richa M1, Tita N1, Tresna L, Molecular Docking of 1-Benzoyl-3-Methylthiourea as Anti Cancer Candidate and Its Absorption, Distribution, and Toxicity Prediction. *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 9(5), 2017, 680-684
- [16] Essa Ajmi Alodeani, Mohammad Arshad, Mohammad Asrar Izhar. Anti-uropathogenic activity, drug likeness, physicochemical and molecular docking assessment of (E)-N0-(substituted-benzylidene)-2-(quinolin-8-yloxy) acetohydrazide *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(8): 676–683.



Conclusion générale

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont orientés vers la recherche d'une nouvelle molécule anticancéreuse. Afin d'atteindre cet objectif nous sommes passés par plusieurs étapes :

Dans une première étape nous avons appliqué un criblage, basé sur une simulation de docking moléculaire, sur 23 dérivés de coumarine afin d'étudier leurs mode d'interaction vis-à-vis de notre cible d'intérêt biologique entre la kinase 2 dépendant de la cycline (CDK2) et la structure tridimensionnelle de cette enzyme est obtenue à partir de la banque des données PDB avec l'identifiant 1KE9 en complexe avec le « LS5 ». Le processus du docking est assisté par le programme Molegro Virtual Docker (MVD).

L'étude a révélé que les ligands **L4, L9, L10, L14, L19, L20** sont les meilleurs complexe, ceci justifier par la présence des différentes types d'interactions et en plus ces ligands possèdent les plus basses énergies de score par rapport aux autre.

Suite à cette étude nous avons pu élucider les mécanismes d'interaction entre (CDK2) et 23 ligands par visualisation des différents types des interactions mis en jeu.

Les résultats de docking ont indiqué que les meilleurs des complexes ont montré des interactions de liaison hydrogène avec Glu12, Lys129, Asp86, The14.

La deuxième étape: Il serait également très intéressant de poursuivre ce travail préliminaire par une filtration ont été prises pour la prédiction des propriétés moléculaires règle de Lipinski et Veber et la prédiction de la bio activité de score, sont enfin vérifiées les éventuelles propriétés biologiques absorption, métabolisme, excrétion et toxicité des 6 ligands.

L'analyse des résultats obtenus montre que ces ligands utilisés dans cette étude répondent à la règle de Lipinski et Veber.

D'autre part les résultats obtenus montrent que le ligand (L4) possèdent des valeurs de paramètres pharmacocinétiques dans la gamme acceptable et modérément actif selon le score de bio activité.

En conclusion, le résultat prometteur pour le ligand L4 pourrait en outre être évalué pour générer de meilleurs candidats médicaments.

Résumé :

Une étude de criblage virtuel dans les processus de recherche des nouvelles molécules bioactives basé sur le docking moléculaire de dérivés de coumarine dans le site actif de kinase cycline dépendante CDK2. L'étude par docking moléculaire sur un ensemble de vingt-trois dérivés de coumarine a été menée dans le but de comprendre le mode d'interaction de ces composés vis-à-vis de kinase cycline dépendante et de sélectionner ceux représentant une bonne affinité avec les résidus du site actif. Cette étude a été assistée par le programme Molegro Virtual Docker, ensuite concevoir in silico Par la filtration en faisant la prédiction de propriétés ADME/Tox peut être d'une importance soutien à l'identification de nouvelles molécules a visée thérapeutique.

Mots Clés : criblage virtuel, dérivés de coumarine, docking moléculaire, kinase cycline dépendante CDK2, ADME/Tox

Abstract :

A virtual screening study in the research processes of new bioactive molecules based on the molecular docking of coumarin derivatives in the active site of CDK2 dependent cyclin kinase. The molecular docking study on a set of twenty-three coumarin derivatives was conducted to understand how these compounds interact with dependent cyclin kinase and to select those representing a good affinity with the residues of the active site. This study was assisted by the Molegro Virtual Docker program, then designed in silico By filtering by predicting ADME/Tox properties can be of importance support for the identification of new molecules for therapeutic purposes.

Keywords : virtual screening, coumarin derivatives, molecular docking, CDK2 dependent cyclin kinase, ADME/Tox