



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

Science de la matière
Chimie
Chimie pharmaceutique

Réf. : Entrez la référence du document

Présenté et soutenu par :

Laouamer Ikram

Le :

Etude combiné de 3D QSAR, criblage virtuel et de docking moléculaire de certains inhibiteurs de CDK4 sélectionnés

Jury :

Dr Daoud Ismail	MCA	Université Mohamed Khider Biskra	président
Dr Almi Imane	MCB	Université Mohamed Khider Biskra	Rapporteur
Dr Lehraki Faiza	MAA	Université Mohamed Khider Biskra	examinatrice

Année universitaire : 2022/2023

Remerciement

On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir la santé et la volonté de terminer ce mémoire.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Dr Almi Imane**. Je la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant mon préparation de ce mémoire.*

*J'exprime aussi mes vifs remerciement aux membres du jury **Mme Lehraki Faiza** et **Dr Daoud Ismail** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner mon travail et l'enrichir par leur remarques.*

*Mon remerciement s'adresse à **Mme Asma Fettah** pour sa présence à mes côtés et pour ses précieux conseils et orientations, et je la remercie pour ses efforts au cours de sa carrière pratique avec nous.*

Je tiens à remercier tous les enseignant du département des sciences de la matière, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Je ne saurai jamais assez remercier la lumière de ma vie, mes parents, qui par leurs prières et leur encouragements, j'ai pu surmonter tous les obstacles.

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chère,

A MA CHÈRE MÈRE

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que se modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulé, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À MON CHÈRE PÈRE

Je dédie ce travail à mon très cher père pour avoir été à mes cotés à tout moment, pour son travail et sa protection pour nous. Je le remercie pour tout le soutien et l'amour qu'il m'a donné. Tous les mots de gratitude et d'appréciation ne suffisent pas à remercier mon cher père. J'espère que Dieu le protégera et lui accordera une longue vie.

*À mes chers frères **Salah, seïf et Houssein***

*À mes cousines **Assil et Taïma***

*À mes deux chères proches amis qui était comme des sœurs pour moi
Toumi Sounia et Sadaoui Fatima*

*À tous mes collègues de promotion de 2^{ème} année master chimie
pharmaceutique*

À tous mes amis et ma famille

Sommaire

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

List des abréviations

Introduction générale..... 1

Références bibliographique.....3

Chapitre I :

Partie 01 : Généralité sur le cancer du sein

I.1.1.Introduction 4

I.1.2. Le cancer du sein 4

I.1.2.1. Les caractéristiques d'une cellule cancéreuse 4

I.1.2.2 .Anatomie du sein..... 5

I.1.2.3. Classification du cancer du sein 6

I.1.2.3.1. Classification histologique..... 6

I.1.2.3.2. Classification moléculaire..... 7

I.1.2.4. Les facteurs de risques 8

I.1.2.5. Diagnostique 9

I.1.2.6. Le traitement 10

Partie 02 : Généralité sur l'enzyme CDK4

I.2.1. Introduction 11

I.2.2. Le cycle cellulaire 11

I.2.2.1. Les phases de cycle cellulaire	12
I.2.3. Les complexes cyclines-CDKs régulateurs de cycle cellulaire	15
I.2.3.1. Définition de cyclines dépendantes Kinases 4 CDK4.....	15
I.2.3.2. La régulation de l'activité de CDK4	16
I.2.3.3. Le rôle de CDK4 dans le cancer humain	16
I.2.3.4. Les inhibiteurs de CDK4	17
I.2.3.4.1. Mécanisme d'action des inhibiteurs de CDK4	18
I.2.3.4.2. Validation des inhibiteurs de CDK4 en tant qu'agent anticancéreux	18
Références bibliographiques	20

Chapitre II : les méthodes de criblage virtuel

II.1. Introduction (généralité sur le criblage virtuel).....	26
II.2. Le criblage virtuel « ligand-based »	27
II.2.1. Recherche de similarité	27
II.2.2. Méthodes QSAR.....	28
II.2.3. Pharmacophore basé sur le ligand	28
II.2.3.1. Groupes fonctionnels considérés comme un pharmacophore	29
II.2.3.2. Modèles pharmacophore 3D	30
II.2.3.3. Progrès dans les approches 3D-QSAR (pharmacophore 3D-QSAR).....	31
II.2.3.4. Étude 3D-QSAR	31
II.3. Criblage virtuel « structure-based ».....	31
II.3.1. Conception novo	32
II.3.2. Modèle pharmacophorique « structure-based »	32
II.3.3. RD-QSAR (relation quantitative structure-activité dépendant du récepteur)	33
II.3.4. docking moléculaire	33

II.3.4.1. Objectif de docking	33
II.3.4.2. Les outils de docking moléculaire	34
II.3.4.3. Les type de docking moléculaire	36
Références bibliographiques	38

Chapitre III : résultats et discussion

III.1. Introduction.....	43
III.2. Présentation des molécules étudié.....	43
III.3. Méthodologie	52
III.3.1. Logiciel utilisé.....	52
III.3.2. Collecte et préparation des données	52
III.4. Résultats et discussion	53
III.4.1. Génération de modèles pharmacophores	53
III.4.2. Validation de modèle pharmacophore	55
III.4.2.1. L'analyse des coûts (cost analysis)	55
III.4.2.2. L'analyse des ensembles de test	55
III.4.2.3. Méthodes de randomisation Fischer	56
III.4.3. Criblage virtuel	57
III.4.4. Docking moléculaire	58
Références bibliographiques	61
Conclusion générale	63

Résumé

Les kinases dépendantes de la cycline 4, également connue sous le nom de CDK4, est une cible important pour le traitement du cancer du sein. Dans le but de développer de nouveaux composés ayant un effet inhibiteur supérieur à celui du composé "CDK4" sur la cible CDK4, une enzyme implique dans les tumeurs. Le programme Biovia Discovery studio a été créé dans le but d'assister la conception de molécule ayant une activité thérapeutique.

Un criblage virtuel a été réalisé sur une collection de 284176 structures téléchargées à partir de la chimiothèque « NCI ». Parmi ces 284176 structure, 7 composés ont démontrés selon lequel avaient une valeur d'activité estimée inférieur à 0.5 nM .Le modèle pharmacophore utilisé dans le criblage a été généré à partir d'une série de dérivés de pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one. Les règles de Lipinski ont été également utilisées. Grace au logiciel Discovery Studio le docking moléculaire à générer des résultats nous permettant de sélectionner deux meilleurs composés qui pourraient être considérés comme des inhibiteurs prometteurs de notre cible thérapeutique, la CDK4.

Enfin, nous avons procédé à une analyse approfondie des interactions spécifiques de ces composés pour évaluer leur potentiel.

Mots clé : Discovery studio, CDK4, Docking moléculaire, criblage virtuel, cancer, Pharmacophore.

Abstract

Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) is an important target for the treatment of breast cancer. In order to develop new compounds with a stronger inhibitory effect on CDK4, an enzyme involved in tumors, the Biovia Discovery Studio program was created to assist in the design of molecules with therapeutic activity.

A virtual screening was performed on a collection of 284,176 structures downloaded from the "NCI" chemical library. Among these 284,176 structures, 7 compounds demonstrated activity values estimated to be less than 0.5 nM. The pharmacophore model used in the screening was generated from a series of pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one derivatives. Lipinski's rules were also employed. Using the Discovery Studio software, molecular docking generated results that allowed us to select the two best compounds that could be considered promising inhibitors of our therapeutic target, CDK4. Finally, we conducted a detailed analysis of the specific interactions of these compounds to evaluate their potential.

Keywords: Discovery Studio, CDK4, molecular docking, virtual screening, cancer, pharmacophore

Liste des figures

Figure I.1 : La différence entre la cellule normale et la cellula cancéreuse.....	5
Figure I.2 : L'anatomie de sein.....	6
Figure I.3 : Représentation schématique du cycle cellulaire.....	12
Figure I.4 : Représentation schématique de la prophase.....	13
Figure I.5 : Représentation schématique de la métaphase	14
Figure I.6 : Représentation schématique de l'anaphase	14
Figure I.7 : Représentation schématique de la télophase	15
Figure II.1 : Processus de conception de médicament <i>in-silico</i>	26
Figure II.2 : Classification des méthodes de criblage virtuel « ligand-based » et « structure-based ».....	27
Figure II.3 : Schéma descriptif des étapes de QSAR.....	28
Figure II.4 : Principales étapes de l'élucidation d'un pharmacophore	29
Figure II.5 : Caractéristiques pharmacophoriques.....	30
Figure II.6 : Principe générale de docking	34
Figure II.7 : Diagramme des programmes de docking les plus cité	36
Figure II.8 : Schéma descriptif des types de docking	36
Figure II.9 : Modèle de docking de type clé-serrure	37
Figure II.10 : Modèle de docking moléculaire (dokcing flexible)	37
Figure.III.1 : Le meilleur modèle de pharmacophore HypoGen, Hypo1	55
Figure.III.2 : Graphique de corrélation entre les activités expérimentales et estimées à l'échelle logarithmique pour les composés de l'ensemble d'entraînement et de test basés sur Hypo1.....	56

Figure III.3 : La différence de coût entre les runs HypoGen et les runs brouillés. Le niveau de confiance de 95% a été sélectionné.	57
Figure III.4 : La présentation des interactions récepteur-ligand 1 en schéma 2D.	59
Figure III.5 : La présentation des interactions récepteur-ligand 2 en schéma 2D.	60

Liste des tableaux

Tableau III.1 : Les structures des composés du base de données et leurs valeurs de pIC50 rapportées.	44
Tableau III.2 : Résultats statistiques des 10 principales hypothèses pharmacophores générées par l'algorithme HypoGen	53
Tableau III.3 : Activité expérimental et estimée des composés de l'ensemble d'apprentissage "training.set" individuel.....	54
Tableau III.4 : Interaction d'amarrage de composés touchés virtuellement criblés.	58

List des abréviations

2D : Deux dimensionnelle

3D : Trois dimensionnelle

ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisation et Excrétion

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AR: Aromatique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATP: Adénosine-tri Phosphorique

BCSC: Cellule Souche du Cancer du Sein (breast cancer stem cell)

BMP-4: Protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP, de l'anglais bone morphogenetic protein)

CADD: Computer Aided Drug Design

CDK: kinases dépendantes des cyclines (cyclin-dependent kinases)

CKI: Cyclin kinase inhibitors

CoMFA: Comparative Molecular Field Analysis

CoMSIA: Comparative Molecular Similarity Indices Analysis

DS: Discovery Studio

FDA: Food and Drug Administration

FOXM1: Forkhead box M1

GBM: Glioblastoma Multiforme

HBA: Hydrogen Bond Acceptor

HBD: Hydrogen Bond Donor

HER2: Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (human epidermal growth factor receptor 2)

HR: Récepteur hormonaux

HYD:Hydrophobe

IC50: Half maximal Inhibitory Concentration

IRM: Imagerie par résonance magnétique

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

MPF: Facteur promoteur de la mitose

NCI: National Cancer Institute

NI: Négatif ionisable

nM : Nano mole

OMS: Organisation mondiale de la Santé

PDB: Protein Data Bank

POSI: Positif Ionisable

QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship (Relation quantitative structure-activité)

RB1 : Retinoblastoma Protein (protéine de rétinoblastome)

RCP: Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

RD-QSAR: receptor-dependent quantitative structure-activity relationship

RE: Récepteur aux hormones oestrogènes

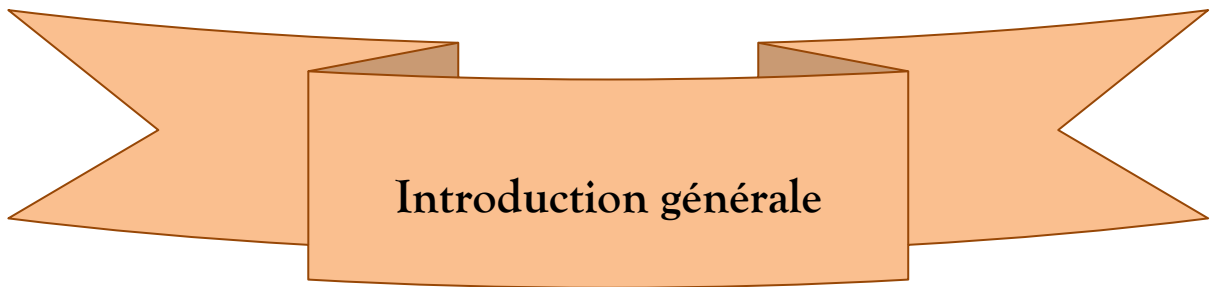
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

RMS: Root-Mean Squared

RMSE: Root-Mean-Square Error (erreur quadratique moyenne)

TNBC: Triple Negative Breast Cancer

XVOL: Volume d'exclusion



Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer représente la deuxième cause de décès à l'échelle mondiale. En fait, la prévalence du cancer a augmenté de manière significative. Aux États-Unis seulement, environ 1 665 540 personnes ont été diagnostiquées avec un cancer en 2014 [1], et malheureusement, 585 720 d'entre elles en sont décédées. Par conséquent, le cancer est un problème majeur qui affecte la santé de toutes les sociétés humaines. Cependant, cette maladie présente une grande variété de types de tumeurs, ce qui rend son diagnostic spécifique et son traitement efficace extrêmement difficiles. Chez les hommes, les types de cancer les plus fréquents se trouvent dans la prostate, les poumons et les bronches, le côlon et le rectum, ainsi que la vessie. Chez les femmes, les types de cancer les plus courants sont le cancer des poumons, des bronches et du côlon, du rectum, du corps utérin et de la thyroïde, et la prévalence la plus élevée concerne le cancer du sein. [2,3]. Ce dernier occupe actuellement une place prépondérante dans le domaine de l'oncologie. En effet, il est le cancer le plus fréquent, notamment dans les pays industrialisés, avec plus d'un million de nouveaux cas chaque année à l'échelle mondiale. Il se positionne en tête des cancers les plus diagnostiqués et des causes de décès chez les femmes, largement devant le cancer colorectal et le cancer du poumon. De nos jours, on estime qu'une femme sur huit développera un cancer du sein au cours de sa vie. En revanche, ce cancer est extrêmement rare chez les hommes, représentant moins de 1 % de tous les cas de cancers du sein. Cette maladie demeure la principale cause de décès chez les femmes en Algérie et dans le monde, constituant ainsi un problème majeur de santé publique [4]. Le cancer du sein est une maladie complexe et multifactorielle, résultant de l'interaction de plusieurs facteurs de risque. Parmi ces facteurs, on retrouve l'âge, le mode de vie, l'obésité, ainsi que d'autres facteurs. Cependant, les antécédents personnels et familiaux jouent un rôle crucial et constituent un facteur de risque majeur dans le développement du cancer du sein. Cependant on trouve que d'autres voies implique dans le cause de cancer. Les voies des kinases dépendantes de la cycline (cdk) ont été largement identifiées comme des cibles thérapeutiques essentielles dans le traitement du cancer.

Les CDK (cyclin-dependent kinases) sont de petites protéines appartenant à la famille des kinases sérine-thréonine. Elles ont une taille d'environ 30 à 60 kDa [5]. Les CDK sont constituées d'une sous-unité catalytique qui est active uniquement lorsqu'elle forme un complexe hétérodimérique avec des sous-unités régulatrices appelées cyclines, ce 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. La kinase 4 cycline dépendante (cdk4) est l'une des protéines kinases sérine/thréonine. Elles jouent un rôle essentiel dans la

INTRODUCTION GENERALE

régulation de la progression du cycle cellulaire, en contrôlant la transition de la phase G1 à la phase S [5]. Elles interagissent avec la protéine RB1 (retinoblastoma 1) pour activer sa fonction, Les inhibiteurs de CDK4 sont largement reconnus comme des agents anticancéreux efficaces en raison de leur capacité à cibler spécifiquement les cellules tumorales. Ils agissent en inhibant l'activité de la CDK4.

Le criblage virtuel par docking moléculaire est une approche informatique utilisée dans la découverte de nouveaux médicaments, il permet d'évaluer virtuellement une grande quantité de composés chimiques potentielles afin de prédire leur activité biologique et leur aptitude à devenir de nouveaux médicaments [6].

Notre objectif principal est de développer *in silico* de nouveaux composés ayant une action inhibitrice sur CDK4 (dans le traitement du cancer du sein) en utilisant le docking moléculaire, à partir d'une série de composés existants comme point de départ et de suggérons que ce composé pourrait être développé en tant que médicament à l'avenir.

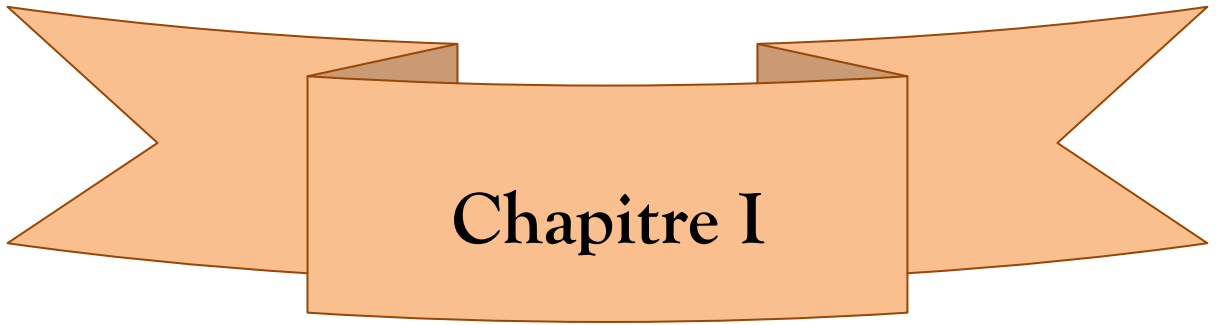
Notre travail est divisé en trois chapitres :

- ✚ Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique, subdivisée en deux parties. La partie A portera sur le cancer du sein, en abordant différents aspects de la maladie, tandis que la partie B se concentrera sur la protéine ciblée et ses inhibiteurs (CDK4).
- ✚ Le deuxième chapitre consistera en une recherche bibliographique sur les méthodes de criblage virtuel, afin de comprendre les différentes approches utilisées pour la conception de nouveaux composés inhibiteurs.
- ✚ Le dernier chapitre présentera les résultats obtenus à travers nos simulations de docking moléculaire, ainsi que leur interprétation et discussion.

Enfin, nous terminerons ce manuscrit par une conclusion générale.

Références

- [1]. Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63(1), 11-30.
- [2]. Meacham, C. E., & Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), 328-337.
- [3]. Fisher, R., Puztai, L., & Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *British journal of cancer*, 108(3), 479-485.
- [4]. Neffaf, R. Keniouche, N. Bougherara, O. (2022). *La prédisposition génétique du gene BRC1 au cancer du sein.*
- [5]. Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, 376(6538), 313-320.
- [6]. MOKRANI, E. H., BENSEGUENI, A., CHIKHI, A., TENIOU, S., MERABTI, B., & BOUCHERIT, H. (2012). Mise en évidence par criblage virtuel d'un nouveau inhibiteur xanthinique de la DPP4 pour le traitement du diabète de type 2. *Les technologies de laboratoire*, 7(27).



Chapitre I

An orange ribbon graphic with a central rectangular section. The ribbon has a slight 3D effect with a darker orange shadow on the top edge of the central section.

Partie 01 :

Généralité sur le cancer du sein

I 1.1. Introduction

Vivre avec sa propre maladie ou vivre avec la maladie d'un proche est aujourd'hui un enjeu de société. En effet, des maladies autrefois mortelles sont devenues des maladies chroniques, c'est-à-dire, des maladies caractérisées par leur durée, par la gestion qu'elles exigent et par l'incertitude qu'elles provoquent. Parmi ces maladies on cite les maladies cancéreuses, en particulier le cancer du sein. Le cancer du sein est le cancer dont le diagnostic est le plus fréquent chez les femmes, comme c'est un cancer qui se traite assez bien s'il est dépisté au début. Une maladie qui induit tant de perturbation que ce soit sur le côté physique, psychologique et sociale [1].

En cancérologie, la prise en charge médicale n'a pas seulement pour objectif de guérir ou de prolonger la vie, elle vise également à diminuer les comorbidités de la maladie et les effets secondaires des traitements, à lutter contre les possibles séquelles de ces derniers, bref, à préserver ou améliorer la qualité de vie de la personne malade.

En 2012, 6.3 millions de femmes vivaient avec un cancer du sein ; en 2010 l'organisation mondiale de la santé (OMS) a fait des projections à l'avenir et a estimé qu'en 2030 le nombre total de cas de cancer du sein s'élèvera à environ 21.4 millions. L'Algérie n'est pas épargnée par ces tendances qui touchent à des degrés variables les populations du monde entier [2].

I. 1.2. Le cancer du sein

Le cancer du sein est un cancer qui prend naissance dans les cellules du sein. Il est en effet le cancer le plus fréquent chez les femmes et la deuxième cause de décès parmi tous les cancers. Il se développe à partir des cellules normales présentes dans la glande mammaire. Ces cellules subissent des mutations ou des instabilités génétiques, ce qui entraîne une croissance anormale et excessive. Au fil du temps, ces cellules se multiplient de manière désordonnée pour former une masse cellulaire appelée tumeur maligne [3].

I. 1.2. 1. Les caractéristiques d'une cellule cancéreuse :

La cellule cancéreuse agit différemment de la cellule normale (figure I.1). Elle commence à se développer et à se diviser de façon désordonnée au lieu de mourir quand elle le devrait. Elle ne mûrit pas non plus autant qu'une cellule normale, alors elle reste immature [4].

La transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse est un processus long, qui peut durer des plusieurs d'années. Au terme de cette transformation, la cellule cancéreuse a acquis un certain nombre de caractéristique :

- Les cellules tumorales présentent une indépendance vis-à-vis des signaux qui stimulent normalement la prolifération cellulaire. Contrairement aux cellules normales qui ne se divisent que lorsqu'elles reçoivent un stimulus spécifique, les cellules tumorales n'ont plus besoin de ce signal pour se reproduire. Les cellules tumorales sont insensibles aux signaux inhibiteurs.
- La capacité d'induire une néo-angiogenèse
- Les cellules tumorales acquièrent la capacité d'invasion. Elles sont capables de pénétrer à l'intérieur des vaisseaux sanguins pour être transportées vers d'autres organes, où elles peuvent former une tumeur secondaire.
- Elles sont capables d'empêcher les défenses immunitaires de l'organisme de les attaquer ;
- Evitement de la mort cellulaire programmée (apoptose) [5].

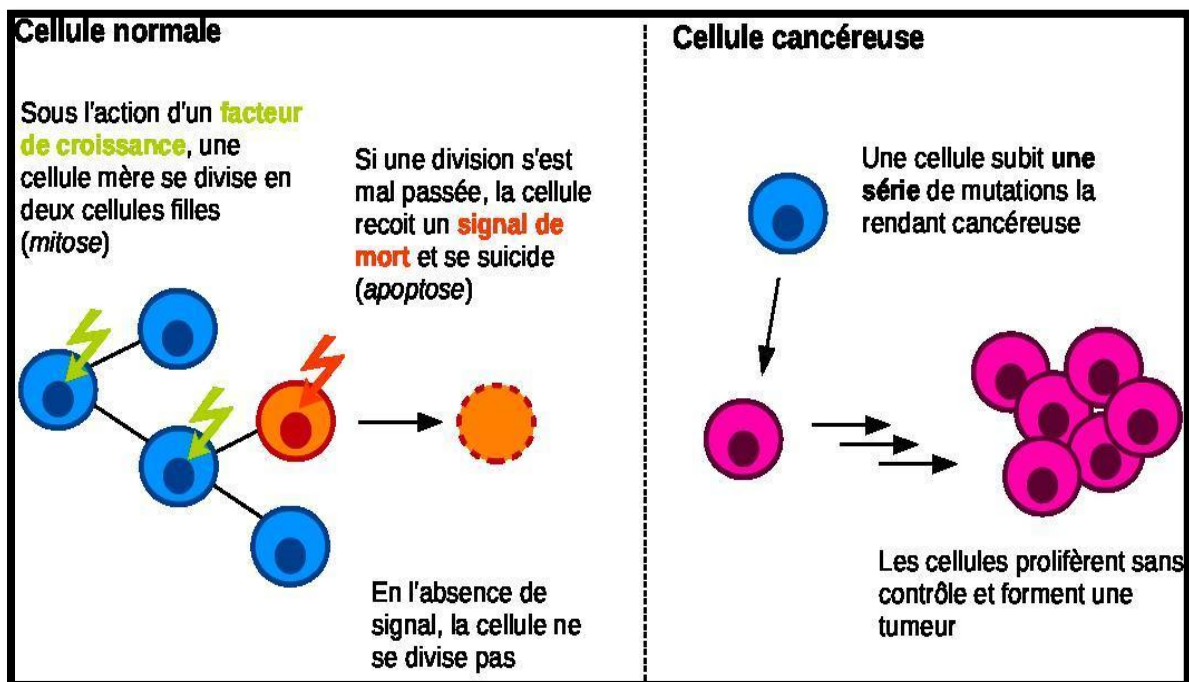


Figure I. 01 : La différence entre la cellule normale et la cellule cancéreuse

I. 1.2. 2. Anatomie de sein

Les seins sont des organes de nature glandaire destinés à sécréter le lait qui est la principale source de la nutrition des nouveaux nés, établissant des contacts intimes entre la mère et l'enfant. La figure I.2 représente les principaux composants constitutifs du sein.

- a. **La position :** Ils occupent la partie antero-supérieure du thorax de chaque côté du sternum, en avant des muscles pectoraux et en regard de l'espace compris entre la 3ème et la 7ème côte. Cette situation varie en fonction de la forme et du type thoracique
- b. **La forme :** La forme générale de sein féminins est variable, le plus souvent conique arrondie. Insignifiants, avant la puberté, les seins présentent chez la jeune fille une forme semi ovoïde. Chez l'adulte, les seins acquièrent leur maturité où leur forme est grossièrement hémisphérique à conique ; par contre avec le vieillissement, les grossesses et l'allaitement, les seins ont tendance à la ptose et ils deviennent plus flasques [6].
- c. **Poids :** Le poids de sein varie selon la morphologie de femme et selon les périodes comme la grossesse ou la lactation début de 200g chez la jeune fille, il peut atteindre 500g chez la femme allaitante et 900g dans certains cas [7].

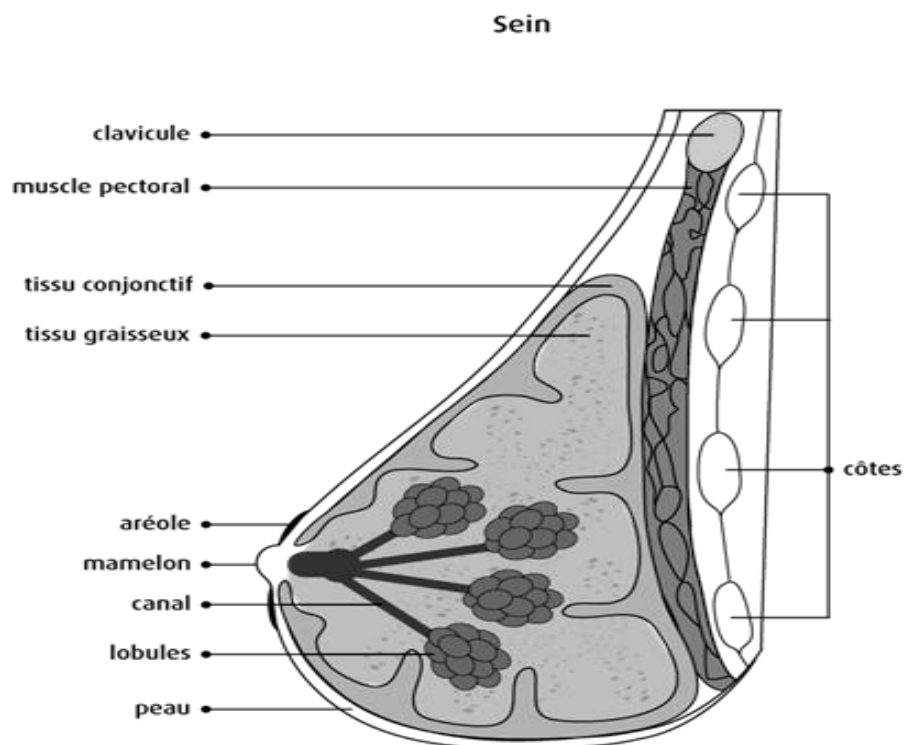


Figure I. 2 : l'anatomie de sein.

I. 1.2.3. Classification du cancer du sein :

On peut distinguer deux classes de cancer du sein une classification histologie et d'autre moléculaire ;

I. 1.2.3.1. Classification histologique :

Le type histologique permet de caractériser la tumeur en fonction du type de cellules atteintes et de sa localisation mammaire, donc il existe plusieurs types de cancer du sein.

L'adénocarcinome c'est le type histologique le plus fréquent (95% des cas) ; il se développe à partir des cellules épithéliales des glandes mammaires, soit au niveau des canaux (carcinomes canaux) soit au niveau des lobules (carcinomes lobulaires) [8].

I. 1.2.3.2. Classification moléculaire de cancer du sein :

Les cancers du sein peuvent être caractérisés par la présence ou l'absence à leur surface de trois types de molécules : les récepteurs aux hormones œstrogènes (RE), à la progestérone (RP) et à un facteur de croissance nommé HER2. L'identification de ces caractéristiques moléculaires permet de classer les cancers du sein en quatre catégories qui ne répondent pas aux mêmes traitements [5]:

a. **Luminal like** : on distingue deux principaux sous-types :

- **Luminal A** : ce type de cancer représente 50 à 60% des cas et sont donc le plus fréquent, il exprime très fortement les récepteurs des œstrogènes RE et de progestérone RP. Ce sont des tumeurs très peu proliférantes, avec un dosage de KI67 bas (< 15 %) (KI67 une protéine nucléaire associé à prolifération des cellules, et est une manière d'évaluer la prolifération tumorale dans un cancer du sein) ; et de bas grade (I ou II) .
- **Luminal B** : Il exprime de façon non important les récepteurs hormonaux RE/RP mais il exprime fortement les tumeurs RH+/HER2- ou RH+/HER2+ ; ces tumeurs présentent un taux de prolifération important avec un pourcentage élevé de KI67 (> 15 %). Les tumeurs luminal B concernent 10% des cancers du sein.

La différence entre les tumeurs luminal A et B se faisait également en fonction de KI67.

- #### b. **Les cancers HER2** : Ils présentent des récepteurs au facteur de croissance HER2. Les tumeurs sont soit HER2+/RH-, soit HER2+/RH+, ces dernières sont agressives et présentent donc un pronostic plus faible que les tumeurs lumineales. Ils présentent de 15% de tous les cancers [8,5].

- #### c. **Basal-like** : Ce type a la particularité de survenir chez des femmes jeunes et chez des femmes pré ménopausées d'origine africaine et américano africaine. Il est associé aux cancers dit « triples négatifs » regroupes les tumeurs RE-, RP- et HER2- [9]. Ce type de cancer du sein passe par une chirurgie associé à des séances de radiothérapie et de

chimiothérapie. Ces tumeurs sont les plus agressives, elles présentent donc l'un des plus mauvais pronostics à ce jour [8].

- d. Normal like :** L'expression génique est proche de celle du tissu mammaire normal. Le phénotype des tumeurs de ce sous type n'est pas décrit. Leur pronostic est intermédiaire. Il reste environ 10 à 15 % de tumeurs in classes n'appartenant pas aux groupes précédemment décrits [9].

I. 1.2. 4 Les facteurs des risques :

Aujourd'hui, nous ne connaissons toujours pas les causes exactes de l'apparition de cette dangereuse maladie (cancer du sein), même si différents facteurs de risques sont fortement liés au développement de la maladie. Il existe donc plusieurs facteurs de risque immuable dont les principaux sont :

- **Le sexe :** Selon les dernières statistiques, environ 99% des cas de cancer du sein sont diagnostiqués chez les femmes. Cependant, il est important de noter que les hommes peuvent également être affectés par cette maladie, bien que leur risque soit extrêmement faible, représentant environ 1% des cas [10].
- **L'âge :** l'incidence de cancer est fortement liée à l'âge, plus l'âge augmente plus le risque augmente. Cette maladie est rare chez les femmes âgées de moins de 30 ans. Le risque augmente significativement entre 50 et 75 ans, ce groupe d'âge représentant près des deux tiers des cas de cancer du sein.
- **La densité mammaire :** le risque de cancer du sein augmente avec le niveau des tissus mammaires, les femmes ayant une très forte densité mammaire ont un risque 4à6 fois plus élevé de cancer [11].
- **L'histoire familiale :** Entre 20et 30% des cancers du sein se manifestent chez les femmes ayant des antécédents familiaux du cancer du sein. Le risque augment deux fois plus élevé si une parente au premier degré (mère, sœur ou fille) àdévelopper un cancer du sein surtout à un âge jeune (moins de 50ans) [12].
- **Le mode de vie :** Le risque de cancer du sein est influencé par le mode de vie. Par conséquent, la quantité totale de calories consommées, l'obésité, en particulier après la ménopause, et la consommation d'alcool sont des facteurs de risque bien établis. Bien que la relation entre le tabagisme et le cancer du sein soit de plus en plus probable, elle reste relativement limitée. Ce risque est plus élevé chez les femmes qui ont commencé à fumer à un jeune âge. [13].

- **État hormonal** : Lorsqu'une cellule mammaire devient cancéreuse, elle conserve souvent ses récepteurs aux hormones, tels que les récepteurs aux estrogènes et à la progestérone. Ces récepteurs stimulent la croissance des cellules cancéreuses et influencent le développement tumoral. Par conséquent, plus une femme est exposée à des niveaux élevés d'hormones, plus elle présente un risque accru de développer un cancer du sein [14].

I. 1.2. 5 Diagnostique :

a) **Examen clinique** :

Lorsqu'il s'agit de diagnostiquer un cancer du sein, le médecin gynécologue va en premier lieu réaliser un examen clinique de sa patiente ; elle inclut un examen détaillé du sein (caractéristique de la tumeur : caractère palpable, taille, topographie, mobilité et examen du revêtement cutané, du mamelon et de l'aréole) ainsi que des aires ganglionnaires axillaires et sus-claviculaires. Cet examen aussi permet de rechercher de signe d'appel pouvant évoquer une évolution métastatique [15].

b) **Examens d'imagerie** :

- **Mammographie** : est une radiographie des seins. Elle permet d'obtenir des images de l'intérieur du sein à l'aide de rayons X et de détecter ainsi d'éventuelles anomalies. La mammographie est l'examen paraclinique de référence pour le diagnostic de cancer du sein, elle permet de mettre en évidence des cancers de petite taille, à un stade précoce, avant l'apparition de symptômes. Elle sera au mieux réalisée pendant la deuxième semaine du cycle. Pendant la période prémenstruelle, il peut y avoir une certaine congestion mammaire qui limite la compression radiologique. Cela peut entraîner une densité mammographique plus élevée, rendant les anomalies plus difficiles à détecter et à évaluer correctement. Il est donc préférable de planifier la mammographie en dehors de cette période pour obtenir des résultats plus précis [16, 17].
- **Echographie** : L'échographie mammaire est un examen de deuxième intention dont l'importance en pathologie mammaire est considérable en tant que complément de la clinique et de la mammographie [3].
- **IRM** :
Cet examen sera de préférence réalisé en deuxième semaine de cycle chez les femmes non ménopausées, au moins 28 jours après une chirurgie et un an après la fin d'une radiothérapie sur le sein. L'IRM du sein ne remplace pas la mammographie ni l'échographie mammaire. Elle ne constitue pas un examen systématique du diagnostic du cancer du sein, il s'agit d'un outil supplémentaire qu'on emploie parfois Par exemple Pour guider un prélèvement par biopsie, Pour évaluer la réponse aux

thérapeutiques néo adjuvantes (chimiothérapie réalisée avant l'opération), L'IRM mammaire se déroule de la même façon que tout autre type d'IRM. L'équipement a cependant été spécialement conçu pour l'observation des seins [17].

- c) **Les prélèvements :** Tous les cancers ne sont pas détectés par une mammographie ou échographie. On distingue aussi les deux méthodes : la cytoponction et la biopsie [18].

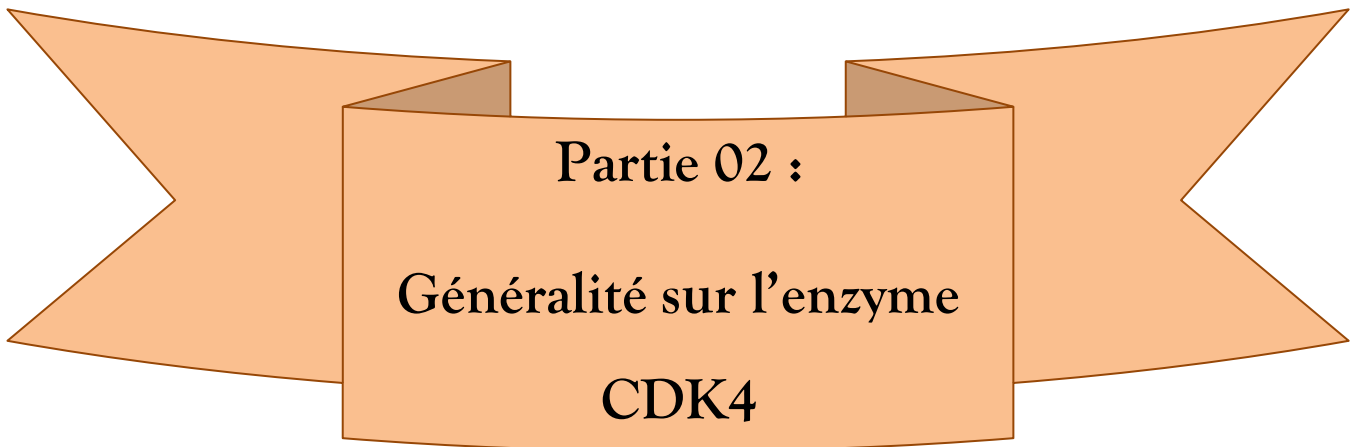
Bilan d'extension :

Lorsqu'il s'agit de déterminer si la maladie s'est propagée à d'autres parties du corps, tels que les ganglions lymphatiques adjacents, les poumons, le foie, les os ou le cerveau, plusieurs examens sont nécessaires. Ces examens font partie du bilan d'extension. Selon les cas, cela peut inclure des analyses sanguines, une radiographie thoracique, une échographie abdominale et éventuellement pelvienne, une scintigraphie osseuse et/ou des tests biologiques, tels que le dosage des marqueurs tumoraux (comme le marqueur CA15-3). L'IRM n'est pas systématiquement proposée dans le bilan d'un cancer du sein, mais peut être recommandée dans certains cas spécifiques [3].

I. 1.2 .6 Le traitement :

Le traitement du cancer du sein fait principalement appel à une locorégionaux (thérapie local) comme la chirurgie et la radiothérapie. Ils peuvent compléter d'autres traitement dites généraux il s'agit de la thérapie antihormonale, de la chimiothérapie et de la thérapie ciblée. De nombreux facteurs sont pris en compte dans le choix des différents traitements afin de les adapter à chaque patient. Les facteurs pronostiques sont : Clinique qui comprend l'âge de patient, taille de la tumeur et leur localisation....L'histologique ; Le biologique qui comprend la présence de HER2, facteurs prédictifs de la réponse au traitement hormonal et à certaines thérapeutiques.

Les décisions thérapeutiques sont prises après une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) qui réunit des médecins de spécialités complémentaires : chirurgien, oncologue médical, radiothérapeute, pathologiste. Le plan de traitement est ensuite expliqué et discuté avec la patiente, qui peut faire ce choix s'elle souhaite, les effets secondaires prévisibles de la chimiothérapie comprennent des effets sur la fonction ovarienne et la fertilité [19].



Partie 02 :
Généralité sur l'enzyme
CDK4

I. 2.1. Introduction

Dans les années 1950, Edwin G. Krebs et Edmond H. Fischer ont fait une découverte majeure concernant l'existence et l'identification des kinases dépendantes des cyclines. Leur travail remarquable dans ce domaine leur a valu d'être récompensés par le Prix Nobel de médecine en 1992. [20].

Les kinases dépendantes des cyclines occupent une place importante dans la régulation du cycle cellulaire, la chronologie de leur activation est déterminée par leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation/déphosphorylation), et par l'association à des sous-unités régulatrices, les cyclines [21]. Les CDK4 participent dans la régulation du cycle cellulaire en association avec leurs partenaires activateurs, les cyclines D. L'activation constitutive de la cyclineD-CDK4 est considérée comme la force motrice de la tumorigenèse de nombreux types de cancer. Les inhibiteurs de CDK4/6 à petites molécules ont été utilisés avec grand succès dans le traitement du cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs et font l'objet d'essais cliniques pour de nombreux autres types de tumeurs. Dans cette partie nous allons voir le cycle cellulaire et sa régulation et aussi nous traiterons le rôle de CDK4 qui joue dans la régulation de cycle cellulaire, le rôle de CDK4 dans le cancer humain ainsi que les inhibiteurs de CDK4 et leurs utilisations en tant qu'agent thérapeutique contre le cancer [22].

I. 2.2. le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire c'est le point central de tous les organismes, est défini comme une suite ordonnée de processus qui permet à une cellule de se diviser en deux cellules filles ayant les mêmes caractères morphologiques et physiologiques de la cellule mère [23]. Est un processus fondamental et commun à toutes les cellules eucaryotes, comprend deux grandes étapes le premier est l'interphase au cours de laquelle la cellule double sa masse et duplique son matériel génétique, l'autre est la phase mitotique (la mitose ou la phase **M**) au cours de laquelle deux cellules filles sont formées, chacune avec un ensemble complet de chromosome (voir figure I.3).

Lorsque la cellule ne se divise pas, elle est dans un état de quiescence, appelé la phase **G0** [20, 24].

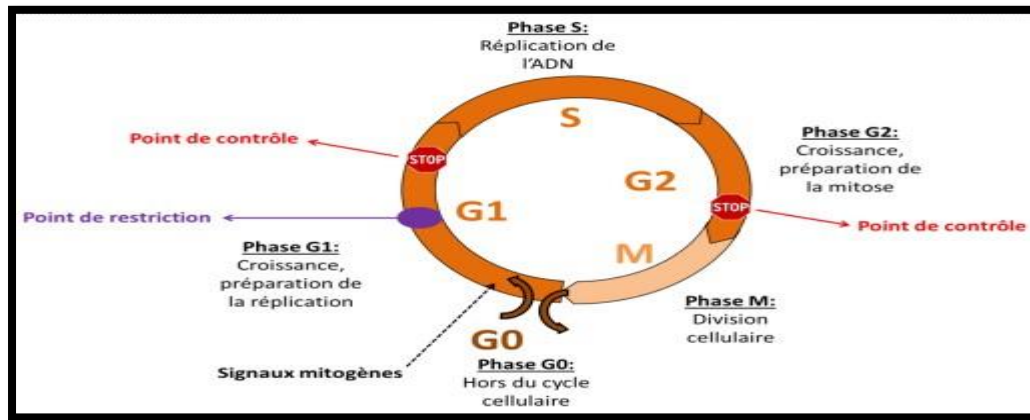


Figure I. 3 : représentation schématique du cycle cellulaire.

I. 2.2. 1. Les phases du cycle cellulaire :

a. **L'interphase** : c'est le plus long période de cycle cellulaire, sa durée varie en fonction de la nature et les conditions physiologique de la cellule. L'interphase comprend les phases **G1** (Gap 1), **S** (Synthèse) et **G2** (Gap 2) [23].

La phase G1 : (G pour Gap, "intervalle" en anglais) est une phase de croissance de la cellule, qui correspond à l'intervalle entre la division cellulaire précédente et la phase de synthèse de l'ADN [25]. Est une phase où l'intégration des différents paramètres environnementaux et cellulaires permet à la cellule de s'engager ou non de manière irréversible dans un nouveau cycle cellulaire [26].

La phase S : C'est la phase de synthèse de l'ADN, durant cette phase le matériel chromosomique est doublé par duplication, chaque chromosome dupliqué sera constitué de deux chromatides sœurs. La durée du la phase S varie selon la quantité d'ADN a répliqué et le nombre de sites de réplication actifs. La synthèse de l'ADN est coordonnée avec celle des histones. Les ARNm des histones sont générés au cours de la phase S puis détruits immédiatement après la réplication. Cette phase se caractérise par la fin de synthèse des autres ARNm [27].

La phase G2 : est un intervalle court, ne dépassant pas 4-5 heures en moyenne, au cours de la phase G2 la cellule vérifier que son ADN a été correctement répliqué (vérification et réparation d'éventuelles erreurs commises lors de la phase S) et va se préparer à la division cellulaire (division mitotique) [28]. Au cours de cette phase, il se produit aussi la phosphorylation des histones H1, qui intervient dans la condensation des chromosomes [29].

Comme la phase G1, elle représente une phase de croissance cytoplasmique.

b. **La phase mitotique (la phase M ou mitose)**:est caractérisé par la division de la cellule mère en deux cellules filles strictement identique, cette phase se compose d'une

division nucléaire (la caryocinèse) et d'une division cytoplasmique (la cytokinèse). La mitose dure entre 1 et 3 heures. Elle se déroule en 5 étapes caractéristiques qui sont:

La prophase : c'est la première phase de la division cellulaire dans la mitose, durant laquelle les chromosomes se condensent et prennent la forme d'entité indépendantes et deviennent visible (figure I.4). Lors de cette phase les centrosomes sont séparés et se déplacent vers les pôles opposés de la cellule [29] A la fin de la prophase, le noyau disparaît lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire [30].

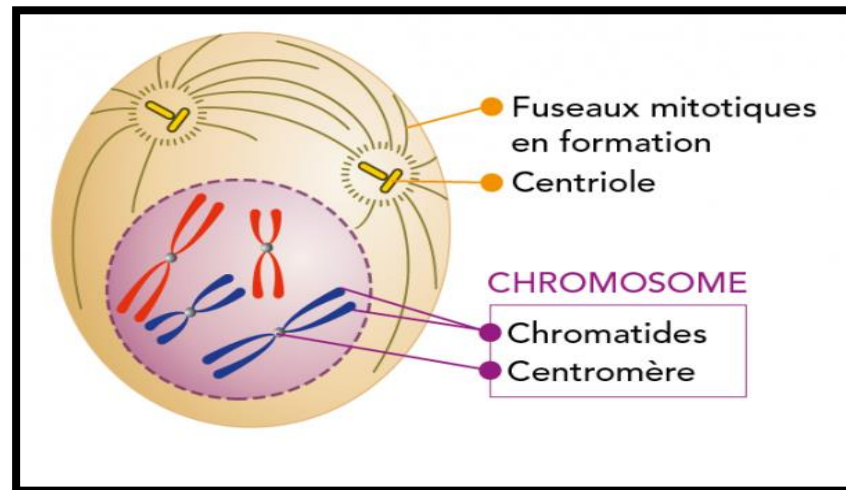


Figure I. 4 : représentation schématique de la prophase.

La prométaphase : Certains auteurs considèrent la prométaphase comme une partie de la prophase. L'ADN des chromosomes continue à se condenser, au cours de cette phase des complexes protéiques (**Kinéochores**) spécialisés se forment au niveau des centromères des chromosomes. Les microtubules s'allongent à partir de deux chromosomes et vont s'attacher aux Kinéochores [29].

La métaphase : c'est la phase où les chromosomes se placent de part et d'autre du plan équatorial, Comme le montre la figure I.5 (partie moyenne de la cellule), ce qui génère des forces opposées qui tirent chaque chromatide sœurs vers un pôle du fuseau cette force exercée par les microtubules et transmise aux chromosomes via les kinéochores, produit une tension entre des chromatides sœurs [31].

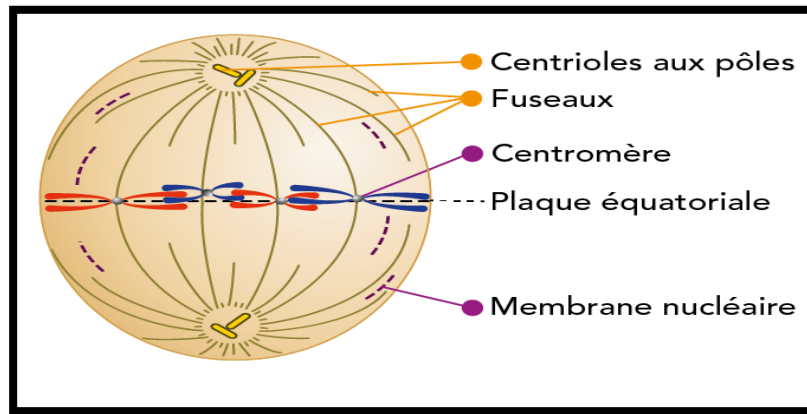


Figure I. 5 : représentation schématique de la métaphase.

L'anaphase : Au cours de l'anaphase le centromère de chaque chromosome est coupé en deux (les chromatides deviennent indépendants), c'est le clivage des cohésines maintenant les chromatides sœurs unies qui permet leur séparation [32]. Les chromatides sœurs s'éloignent l'un de l'autre tirés chacune vers l'un des pôles de la cellule. Les fibres de fuseau mitotique s'étirent et allongent la cellule. La figure ci-dessous (I.6) fournit une explication plus détaillée de cette notion. [29].

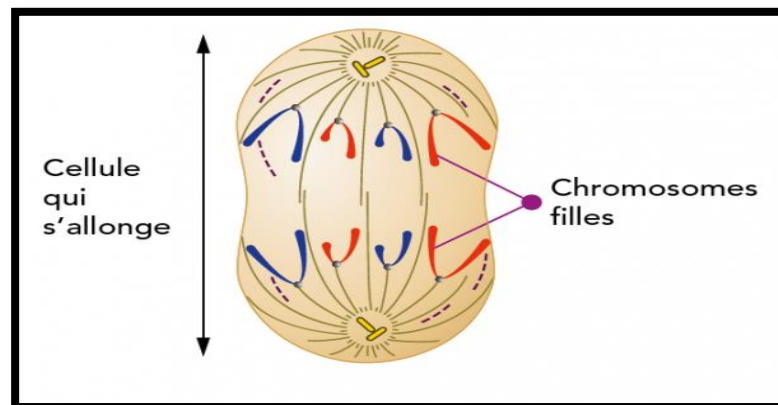


Figure I. 6 : représentation schématique de l'anaphase.

La télophase : L'ADN des chromosomes se décondense, l'enveloppe nucléaire se réassemble autour des chromosomes et le fuseau de mitose se désorganise. Et en fin le cytoplasme se divise en deux lors de la cytokinèse pour former deux cellules filles génétiquement identiques (voir la figure I.7) [32].

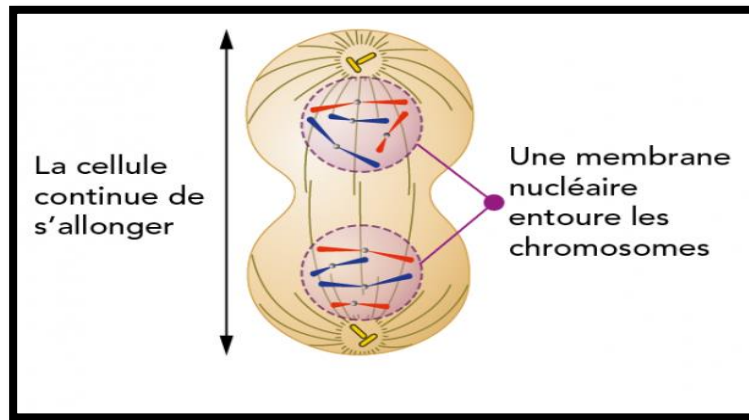


Figure I. 7 : représentation schématique de la télophase.

I. 2.3. Les complexes cyclines-CDKs régulateurs du cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire eucaryote est un processus étroitement régulé qui dépend de l'activation et de l'inactivation ordonnées d'une série de Ser/Thr kinases nommées Kinases Cyclines-dépendantes (CDK) [33,34]. Parmi les 13CDKs connues, cinq d'entre elles (CDK1, 2, 3, 4, et 6) jouent un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire dont elles vont en assurer le bon déroulement et permettre le passage d'une phase à l'autre [20]. Les CDKs ne sont actives qu'après association sous unités régulatrice appelée cycline, dont la synthèse et la dégradation sont étroitement contrôlées au cours du cycle cellulaire [35,36]. Divers complexes cycline-CDK sont impliqués dans la régulation des différentes phases :

La complexe cycline D-CDK4/6 contrôle la progression en G1, cycline E-CDK2 est impliqué dans la rentrée en phase S, la cycline A s'associe à la CDK2 permet la progression de la phase S et cycline A/B-CDK1 permet l'entrée en phase M et la progression jusqu'en métaphase (transition G2/M). Le complexe cyclineB-CDK1 est responsable de l'activité MPF (Facteur Promoteur de la Mitose) cette activité MPF est responsable de l'entrée des cellules en phase M [37].

En plus de leur association avec les différentes cyclines l'activité de CDK dépend de la phosphorylation et de la déphosphorylation de certains résidus, et de leur interaction avec des protéines inhibitrices [38].

D'autres CDKs sont impliqués dans la transcription (CDKs 7, 8, 9, 11, 12 et 13) ou encore le développement neuronal (CDK5) [20].

I. 2.3. 1. Définition de cycline dépendante kinase 4 :

La cycline dépendante kinase 4 (CDK4) est une protéine appartenant à la famille des sérines /thréonine kinase. Cette protéine intervient dans la régulation du cycle cellulaire, elle contrôle la vitesse de croissance de cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S et fonctionne dans l'activation de RB1 (rétinoblastome protéine). Les CDK4 sont donc des protéines cibles thérapeutiques où les médicaments peuvent fonctionner pour traiter certains types de cancer [39].

I. 2.3.2. La régulation de l'activité de CDK4 :

La principale réponse à de nombreux facteurs de croissance dans divers types de cellules est l'activité de CDK4 ou CDK6 par des sous-unités des cyclines D (D1, D2, et D3). Malgré l'absence des cyclines D chez les cellules quiescentes, elles sont d'importants intégrateurs de la signalisation mitogène.

Le complexe cycline-CDK actif peut être inactivé par ou moins deux mécanismes différents [40] ; les kinases régulatrices peuvent phosphoryler la CDK au niveau des sites inhibiteurs près de l'extrémité N-terminal, ou par les complexes cycline-CDK qui peuvent être contrôlés négativement de manière restreinte par les tissus par deux familles d'inhibiteurs de cycline kinase (CKI) sont la famille de INK4 et la famille de CIP/KIP de protéines [41, 42, 43].

La première famille de protéine INK4 (P16^{INK4A}, P15^{INK4B}, P18^{INK4C}, P19^{INK4D}) désactive ou inhibe l'activité de la cycline D en se liant spécifiquement à CDK4 et CDK6. Ces protéines inhibitrices sont exprimées à des faibles niveaux ou sont indétectables dans les cellules en prolifération et sont rapidement stimulées par des stimuli inhibiteurs de croissance, tel que l'inhibition de contact, la sénescence ou le traitement avec certains agents inhibiteurs de croissance [43].

Pour l'autre famille CIP/KIP (P21^{CIP1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}) de protéine se lie et inactive les complexes CDK2/cycline E, CDK2/cycline A et CDK1/cycline B ; quant à CDK4-cycline D se lie à P27, ces complexes P27-cycline D-CDK4 possèdent une activité kinase ce qui indique que cette interaction ne conduit pas à l'inhibition de CDK4 mais stabilise plutôt les complexes cycline D-CDK4, car il a été démontré qu'une expression accrue de P27 conduit à une activité CDK4 accrue [44].

I. 2.3.3. Le rôle de CDK4 dans le cancer humain :

Les anomalies de la reproduction se manifestent toujours par des défauts de contrôle du cycle cellulaire, on pense maintenant que la majorité des tumeurs humaines présente une

dérégulation de la voie CDK4/6-cycline D-INK4-Rb par plusieurs mécanismes , par exemple CDK4/6 est hyperactive dans un certain nombre de cancers humains en raison de la super expression de régulateurs positifs comme , la cycline D, l'inactivation des inhibiteurs INK4 et CIP/KIP ou la suppression et /ou des altération épigénétiques de substrat tel que Rb [45, 46].

Une sur activation de CDK4 a été rapportée dans les tumeurs malignes épithéliales des tissus endocriniens et des muqueuses, tandis que l'activation de CDK4 a été rapportée dans certaines tumeurs mésenchymateuses telles que les sarcomes et les leucémies. Des mutations et des translocations chromosomiques au niveau de locus CDK4 et CDK6 ont également été décrites. L'un des exemples les plus importants et les meilleurs d'insensibilité aux inhibiteurs de la famille INK4 est la mutation CDK4^{R24C} qui a été décrite pour la première fois chez les patients atteints de mélanome familiale [47, 48].

L'expression de CDK4 est également un indicateur pronostique dans certains types du cancer tel que le cancer du sein triple négatif (TNBC). Des études ont montré que CDK4 est fortement exprimé dans ce type de tumeurs et est associé à une faible survie et à des signatures oncogènes associées aux métastases et on pense que la présence disproportionnée de cellules souches du cancer du sein (BCSC) dans ces tumeurs est considéré comme l'une des principales causes de récurrence du (TNBC) [49]. CDK4 est un régulateur de l'auto-renouvellement du TNBC BCSC et le fait en partie en régulation à la baisse l'expression de la protéine morphogénique osseuse-4 (BMP-4) un acteur principal de la biologie des cellules souches tumorales [50].

Il est important de noter que CDK4 favorise également l'auto-renouvellement et la prolifération des BCSC TNBC résistants à la chimiothérapie, qui sont largement responsable de la récurrence et des métastases dans ce cancer agressif [49], étant donné que l'inhibition de l'activité de CDK4 dans les lignées cellulaires TNBC conduit à la différenciation BCSC et à la perte d'auto-renouvellement, le blocage de l'activité de CDK4 dans ce types de tumeur et d'autres est une approche puissante et a conduit à l'approbation de plusieurs CDK4/6 ATP [51].

I. 2.3.4. Les inhibiteurs de CDK4 :

Les inhibiteurs de CDK4 sont des thérapies ciblées, ce sont des médicaments anticancéreux prometteurs qui pris par voie orale, ces inhibiteurs ciblent sélectivement les protéines de CDK4/6 essentielles au cycle cellulaire [39].

Trois inhibiteurs de CDK4 ont été approuvés par la FDA lesquelles (palbociclib, Ribociclib et Abemaciclib) sont utilisés spécifiquement en association avec l'hormonothérapie pour traiter les patients atteints du cancer du sein avancé ou métastatique négatif aux récepteurs hormonaux (HR) et positif au récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) [52].

I. 2.3.4.1. Mécanisme d'action des inhibiteurs de CDK4 :

Comme nous l'avons vu précédemment le cycle cellulaire se régule par des complexes CDK/cyclines qui diffèrent d'une phase à l'autre, il contient des points de contrôle lors des différentes étapes pour déterminé la transition d'une phase à la suivante.

En particulier le passage de la phase G1 à la phase S qui est régulé par le point de contrôle majeur est représenté par la protéine rétinoblastome (Rb), le Rb forme une barrière entre les deux phases lorsqu'elle est active. Cette protéine joue un rôle important dans la poursuite de cycle cellulaire, lorsqu'elle active, empêche la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S, par contre le passage de la phase G1 à la phase S est autorisé lorsque RB est désactivé qui va augmenter la concentration des cyclines D dans le cytoplasme et les complexes CDK4-cycline D vont se former.

Les complexes CDK4-cycline D phosphorylent la Rb, ce dernier va libérer le facteur de transcription E2F et permet ensuite à la cellule de continuer la poursuite du cycle cellulaire.

Les inhibiteurs de CDK4/6 vont se lier compétitivement à la complexe cycline D-CDK4 pour empêcher la phosphorylation de Rb, par conséquent le facteur de transcription E2F n'est pas libéré cela stop le cycle cellulaire de progresser vers la phase S, empêchant prolifération des cellules cancéreuses [53].

I. 2.3.4.2. Validation des inhibiteurs de CDK4/6 en tant qu'agents anticancéreux :

Confirment à l'idée que RB1 est un important substrat limitant la vitesse de la cycline D-CDK4 dans le processus développement du cycle cellulaire [54-56], Des études ont révélé que le palbociclib, le ribociclib et l'abémaciclib sont capables d'inhiber la prolifération de différentes lignées cellulaires cancéreuses qui expriment le gène RB1. Cependant, ces médicaments n'ont pas le même effet sur les lignées cellulaires de cancer du sein appartenant au sous-type luminal, qui sont positives pour les récepteurs des œstrogènes (ER+). Parmi ces médicaments, le palbociclib semble être le plus efficace pour arrêter la progression cellulaire lors du traitement des lignées cellulaires ER+ [57]. Il a été démontré que le palbociclib, le

ribociclib, l'abémaciclib ainsi que d'autres inhibiteurs de CDK4/6 tels que le lérociclib manifestent une activité anti-tumorale significative dans les modèles de xénogreffes impliquant différents types de tumeurs, y compris les cancers du sein [58-59]. Le palbociclib et l'abémaciclib ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'entraver la progression des xénogreffes de glioblastome intracrânien (GBM). L'abémaciclib étant plus efficace pour atteindre le cerveau [60].

Dernièrement, il a été prouvé que des inhibiteurs supplémentaires de CDK4/6 exercent des effets thérapeutiques dans des modèles de xénogreffes de souris de plusieurs types de cancer, notamment SHR6390, FCN-437 et le composé 11 [61]. Des rapports indiquent que ces deux médicaments ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. Cependant, dans la plupart des études in vivo, l'effet thérapeutique dépend de l'expression intacte de la protéine RB1 dans les cellules tumorales. [62-63], des études ont également signalé les effets anti-tumoraux du palbociclib dans les modèles de xénogreffes de cancer de la vessie, indépendamment du statut de RB1. Ces effets ont été attribués à une réduction de la phosphorylation de FOXM1 [64].

Références

- [1]. Hadbi, M. E., Hammiche, L., & Hammouche, F. (2017). *La qualité de vie chez les femmes atteintes du cancer du sein opérées: étude de 08 cas* (Doctoral dissertation, Université de Bejaia).
- [2]. Razali, S. (2018). Cancer du sein Suivi d'une population sous chimiothérapie. *Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*, 6.
- [3]. Le Corgne, A. (2016). *Rôle du pharmacien d'officine dans la prise en charge du cancer du sein après chirurgie mammaire* (Doctoral dissertation, Éditeur inconnu).
- [4]. Teniou, S., & Bensegueni, A. (2012). *Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- [5]. Benattia, I. Bouazza, N, E, H. (2017). *Cancer mammaire et la mutation BRCA1*.
- [6]. Traoré, S. T. (2008). *Cancer du sein au Mali: Anatomie clinique et suivi* (Doctoral dissertation, Thèse médecine]: FMPOS. UB).
- [7]. Roux, M. (2013). *Fibroadénome géant chez l'adolescente et influence hormonale: analyse d'une série de 90 cas* (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation, Université Paris 7-Paris).
- [8]. Jahanmohan, J. P. (2019). *Les cancers du sein agressifs: conséquences de la ménopause chimio-induite chez les femmes jeunes atteintes d'un cancer du sein non métastatique et facteurs pronostiques de la rechute du cancer du sein triple négatif* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne [2017-2020]).
- [9]. Elkebaili, L., & Gheribi, B. (2020). *Classification moléculaire du cancer du sein*. (Mémoire de master).
- [10]. Geffroy-Bellan, M. (2010). *Traitement chirurgical des récurrences mammaires après traitement conservateur initial du cancer du sein. Y a-t-il une place pour un second traitement conservateur?* (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
- [11]. Boukli-Hacene, A., Abdelali, W., Djaafari, A., Yahiaoui, M. E. A., & Shetaya, M. *pris en charge au niveau du service de gynéco-obstétrique Etude Descriptive Rétrospective Des cas de cancer du sein* (Doctoral dissertation).

- [12]. Viassolo, V., Ayme, A., & Chappuis, P. O. (2016). Cancer du sein: risque génétique. *Imagerie de la Femme*, 26(2), 95-104.
- [13]. Tardivon, A., & Malhaire, C. (2009). Cancer du sein. Epidemiologie, facteurs de risque, imagerie. *EMC-RADIOLOGIE ET IMAGERIE MÉDICALE: Génito-urinaire-Gynécobstétricale-Mammaire*, 1-30.
- [14]. Nkondjock, A., & Ghadirian, P. (2005). Facteurs de risque du cancer du sein. *médecine/sciences*, 21(2), 175-180.
- [15]. Perry, N., Broeders, M., de Wolf, C., Törnberg, S., Holland, R., & von Karsa, L. (2008). European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. -summary document. *Oncology in Clinical Practice*, 4(2), 74-86.
- [16]. Saglier, J., Beuzeboc, P., Pommeyrol, A., & Toledano, A. (2009). Traitement locorégional dans Cancer du sein, Questions et réponses au quotidien.
- [17]. Morère, J. F., Apro, M. S., Penault-Llorca, F., & Salmon, R. (2007). *Le cancer du sein*. Springer Paris.
- [18]. Luporsi, E., & Leichtnam-Dugarin, L. (2007). Comprendre le cancer du sein: guide d'information SOR SAVOIR PATIENT à destination des patientes et de leurs proches. *Oncologie*, 9(9).
- [19]. Andre, F., Barranger, E., Bonnetterre, J., De Cremoux, P., Chollet, P., Clough, K., ... & Zelek, L. (2005). Cancers du sein. *Oncologie*, 7, 342-379.
- [20]. Matthews, D. J., & Gerritsen, M. E. (2011). *Targeting protein kinases for cancer therapy*. John Wiley & Sons.
- [21]. Wolowiec, D., & Ffrench, M. (1996). Kinases dépendantes des cyclines: rôle biologique et implications dans la pathologie humaine.
- [22]. Fassel, A., Geng, Y., & Sicinski, P. (2022). CDK4 and CDK6 kinases: From basic science to cancer therapy. *Science*, 375(6577), eabc1495.
- [23]. Coisy-Quivy, M. (2004). *Rôle de Brm dans le contrôle du cycle cellulaire et Étude de l'équilibre prolifération/différenciation des kératinocytes* (Doctoral dissertation, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc).
- [24]. Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *ONCOLOGIE-PARIS-*, 5(7/8), 311-326.
- [25]. Kitajima, T. S., Ohsugi, M., & Ellenberg, J. (2011). Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell*, 146(4), 568-581.

- [26]. Touati, S. A., Buffin, E., Cladière, D., Hached, K., Rachez, C., Van Deursen, J. M., & Wassmann, K. (2015). Mouse oocytes depend on BubR1 for proper chromosome segregation but not for prophase I arrest. *Nature communications*, 6(1), 6946.
- [27]. Ricci, E. P., Kucukural, A., Cenic, C., Mercier, B. C., Singh, G., Heyer, E. E., ... & Moore, M. J. (2014). Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nature structural & molecular biology*, 21(1), 26-35.
- [28]. de Lucas, S., Oliveros, J. C., Chagoyen, M., & Ortín, J. (2014). Functional signature for the recognition of specific target mRNAs by human Staufen1 protein. *Nucleic acids research*, 42(7), 4516-4526.
- [29]. Kim, Y. K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L., & Maquat, L. E. (2007). Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal*, 26(11), 2670-2681.
- [30]. Herbert, M., Levasseur, M., Homer, H., Yallop, K., Murdoch, A., & McDougall, A. (2003). Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature cell biology*, 5(11), 1023-1025.
- [31]. Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L., & Mitchison, T. J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*, 286(5441), 971-974.
- [32]. Vallot, A. (2017). *Quels sont les signaux détectés par le point de contrôle du fuseau lors de la méiose dans l'ovocyte de souris?* (Doctoral dissertation, Paris 6).
- [33]. Ravel-Chapuis, A., Bélanger, G., Yadava, R. S., Mahadevan, M. S., DesGroseillers, L., Côté, J., & Jasmin, B. J. (2012). The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 699-712.
- [34]. Bélanger, G., Stocksley, M. A., Vandromme, M., Schaeffer, L., Furic, L., DesGroseillers, L., & Jasmin, B. J. (2003). Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *Journal of neurochemistry*, 86(3), 669-677.
- [35]. Gautrey, H., McConnell, J., Lako, M., Hall, J., & Hesketh, J. (2008). Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(10), 1935-1942.
- [36]. Yamaguchi, Y., Oohinata, R., Naiki, T. and Irie, K. (2008) Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes Cells*, 13, 583-592.

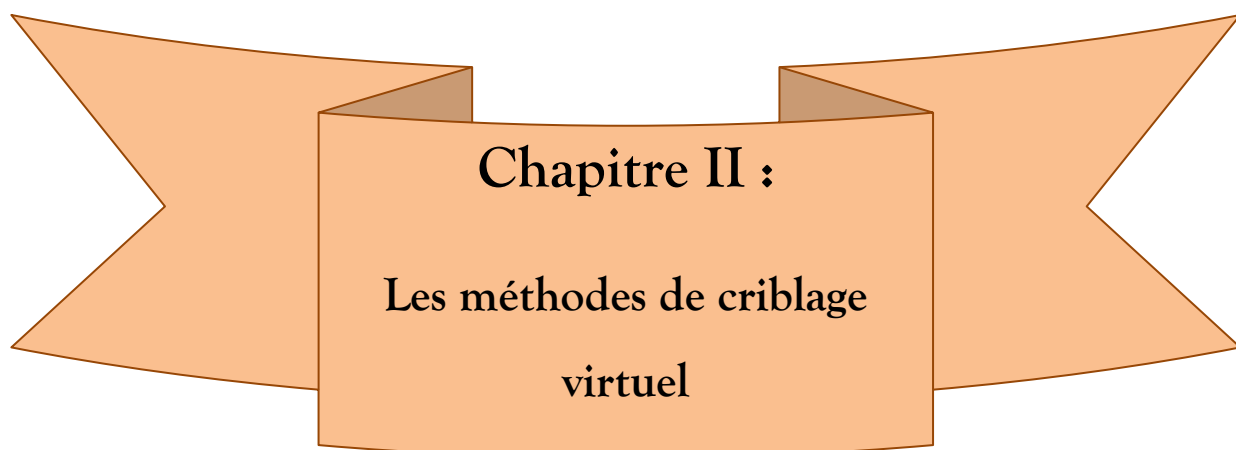
- [37]. Gong, C., Kim, Y. K., Woeller, C. F., Tang, Y., & Maquat, L. E. (2009). SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development*, 23(1), 54-66.
- [38]. Homer, H., Gui, L., & Carroll, J. (2009). A spindle assembly checkpoint protein functions in prophase I arrest and prometaphase progression. *Science*, 326(5955), 991-994.
- [39]. Lilly oncologie. (2020). Les inhibiteurs de CDK4&6. Récupéré de [www.lillyoncologie.fr/assets/pdf/les-traitements/les_inhibiteurs_de_CDK4&6.pdf].
- [40]. Yang, K., Hitomi, M., & Stacey, D. W. (2006). Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell division*, 1(1), 1-8.
- [41]. Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews cancer*, 9(3), 153-166.
- [42]. Gil, J., & Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(9), 667-677.
- [43]. Blain, S. (2008). Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle*, 7(7), 892-898.
- [44]. Baker, S. J., & Reddy, E. P. (2012). CDK4: a key player in the cell cycle, development, and cancer. *Genes & cancer*, 3(11-12), 658-669.
- [45]. Deshpande, A., Sicinski, P., & Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909-2915.
- [46]. Graf, F., Mosch, B., Koehler, L., Bergmann, R., Wuest, F., & Pietzsch, J. (2010). Cyclin-dependent kinase 4/6 (cdk4/6) inhibitors: perspectives in cancer therapy and imaging. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10(6), 527-539.
- [47]. Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., & Serrano, M. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 269(5228), 1281.
- [48]. Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Walker, G. J., ... & Dracopoli, N. C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature genetics*, 12(1), 97-99.
- [49]. Dai, M., Zhang, C., Ali, A., Hong, X., Tian, J., Lo, C., ... & Lebrun, J. J. (2016). CDK4 regulates cancer stemness and is a novel therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Scientific reports*, 6(1), 35383.
- [50]. Zhang, L., Sun, H., Zhao, F., Lu, P., Ge, C., Li, H., ... & Li, J. (2012). BMP4 Administration Induces Differentiation of CD133+ Hepatic Cancer Stem Cells, Blocking Their Contributions to Hepatocellular Carcinoma High-Dose Exogenous BMP4 Induces HCC CSC Differentiation. *Cancer research*, 72(16), 4276-4285.

- [51]. Baker, S. J., Poulikakos, P. I., Irie, H. Y., Parekh, S., & Reddy, E. P. (2022). CDK4: a master regulator of the cell cycle and its role in cancer. *Genes & Cancer*, 13, 21.
- [52]. Kim, S. J. (2021). *Molecular study of the mechanisms of action of CDK4 and CDK6 inhibitors* (Doctoral dissertation, Université Paris Cité).
- [53]. Grevat, E. (2018). *Place des inhibiteurs des CDK4/6 dans la stratégie thérapeutique du cancer du sein métastatique RH+ HER2* (Doctoral dissertation).
- [54]. Lukas, J., Bartkova, J., Rohde, M., Strauss, M., & Bartek, J. (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Molecular and cellular biology*, 15(5), 2600-2611.
- [55]. Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., ... & Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375(6531), 503-506.
- [56]. Medema, R. H., Herrera, R. E., Lam, F., & Weinberg, R. A. (1995). Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14), 6289-6293.
- [57]. Finn, R. S., Dering, J., Conklin, D., Kalous, O., Cohen, D. J., Desai, A. J., ... & Slamon, D. J. (2009). PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Research*, 11(5), 1-13.
- [58]. Bisi, J. E., Sorrentino, J. A., Roberts, P. J., Tavares, F. X., & Strum, J. C. (2016). Preclinical characterization of G1T28: a novel CDK4/6 inhibitor for reduction of chemotherapy-induced myelosuppression. *Molecular cancer therapeutics*, 15(5), 783-793.
- [59]. Rader, J., Russell, M. R., Hart, L. S., Nakazawa, M. S., Belcastro, L. T., Martinez, D., ... & Maris, J. M. (2013). Dual CDK4/CDK6 Inhibition Induces Cell-Cycle Arrest and Senescence in Neuroblastoma. *Clinical cancer research*, 19(22), 6173-6182.
- [60]. Raub, T. J., Wishart, G. N., Kulanthaivel, P., Staton, B. A., Ajamie, R. T., Sawada, G. A., ... & De Dios, A. (2015). Brain exposure of two selective dual CDK4 and CDK6 inhibitors and the antitumor activity of CDK4 and CDK6 inhibition in combination with temozolomide in an intracranial glioblastoma xenograft. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(9), 1360-1371.
- [61]. Yin, L., Li, H., Liu, W., Yao, Z., Cheng, Z., Zhang, H., & Zou, H. (2018). A highly potent CDK4/6 inhibitor was rationally designed to overcome blood brain barrier in glioblastoma therapy. *European journal of medicinal chemistry*, 144, 1-28.

[62]. Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M., Trachet, E., ... & Toogood, P. L. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics*, 3(11), 1427-1438.

[63]. Michaud, K., Solomon, D. A., Oermann, E., Kim, J. S., Zhong, W. Z., Prados, M. D., ... & Waldman, T. (2010). Pharmacologic Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6 Arrests the Growth of Glioblastoma Multiforme Intracranial Xenografts PD-0332991 Arrests the Growth of GBM Intracranial Xenografts. *Cancer research*, 70(8), 3228-3238.

[64]. Rubio, C., Martínez-Fernández, M., Segovia, C., Lodewijk, I., Suarez-Cabrera, C., Segrelles, C., ... & Paramio, J. M. (2019). CDK4/6 Inhibitor as a Novel Therapeutic Approach for Advanced Bladder Cancer Independently of RB1 Status Palbociclib in Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research*, 25(1), 390-402.



Chapitre II :
**Les méthodes de criblage
virtuel**

II.1 Introduction (Généralité sur le criblage virtuel) :

Pour trouver une molécule capable d'interagir avec la maladie étudiée, il est nécessaire premièrement d'identifier une <tête de série > c'est-à-dire un composé possédant l'activité pharmacologique désirée. Une nouvelle <tête de série > peut être découverte par séredipité, à partir des ressources naturelles, en s'inspirant de médicaments déjà existants ou en utilisant les méthodes de criblage virtuel *in silico*[1].

Le criblage virtuel est une méthode *in silico*, c'est un processus permettant la découverte de nouvelles molécules bioactives ; afin de gagner le temps et l'argent (figure II-1) [2- 4]. Le criblage virtuel peut schématiquement être stimulé à un entonnoir dans lequel on verse un grand nombre de composés, constituant la chimiothèque à cribler [5]. Ce processus vise à limiter l'espace chimique des composés de départ (un plus faible nombre de composés) à une liste de composés ayant la chance d'avoir de bon résultats aux tests expérimentaux pour éviter des testes inutiles de molécules [6].

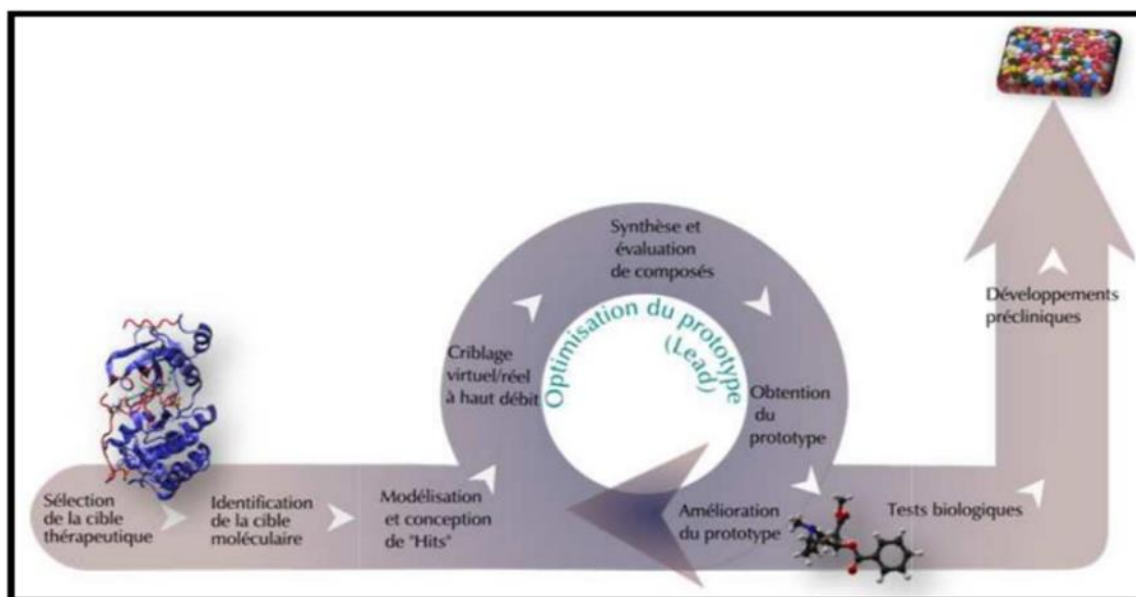


Figure II.1 : processus de conception de médicament *in-silico*.

Deux grandes classes de méthodes de criblage sont distinguées (figure II-2), et le choix de leur utilisation est basé sur la nature des informations expérimentales disponibles concernant le système étudié [7]. Ainsi, lorsque la structure tridimensionnel de la cible biologique a été résolue (cristallographique ou rayon X, résonance magnétique nucléaire RMN, microscopique, électronique ou modèle de structure) les méthodes « structure-based » ou « basées sur la structure » peuvent être utilisés, elles permettant d'évaluer et de sélectionner les

molécules capables de réaliser les interactions dans le site actif de la cible biologique [8]. Les méthodes basées sur les ligands ou «ligand-based » reposent sur le principe que les molécules similaires partagent des propriétés similaires [3].

Ces méthodes, utilisés seules ou en combinaison. La combinaison de ces deux stratégies dans une même étude permet d'augmenter les chances ou d'optimiser de molécules connues [9].

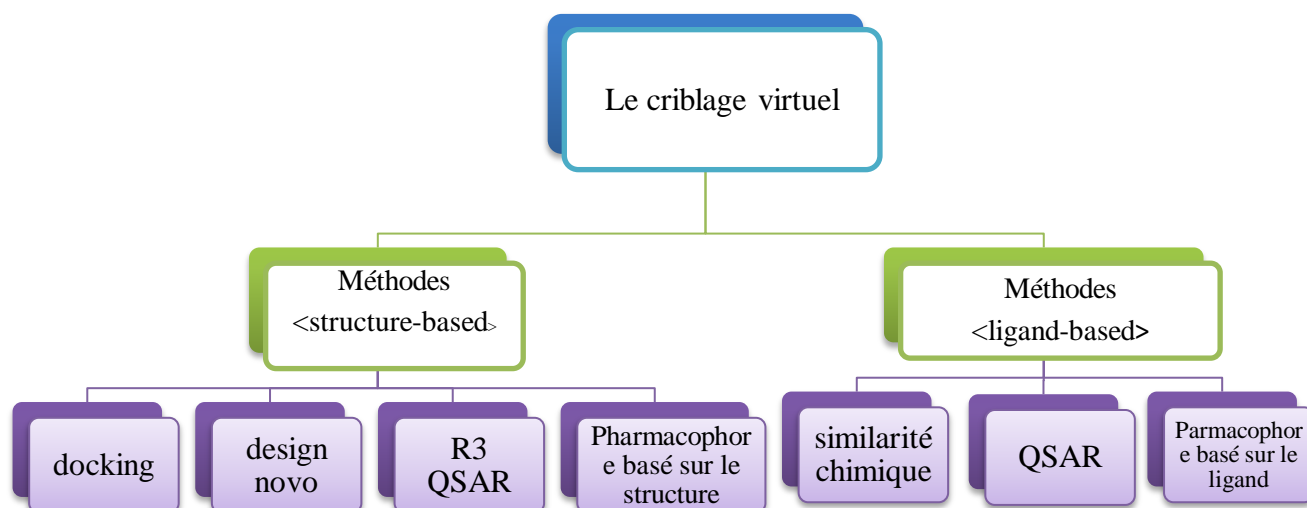


Figure II.2 : Classification des méthodes de criblage virtuel « ligand-based » et « structure-based »

II.2 : Criblage virtuel < ligand-based > :

Lorsqu'au moins un ligand de la cible étudiée est connu, un criblage virtuel basé sur les ligands ou « ligand-based » peut être mis en œuvre. Le principe de base commun à toutes les méthodes basées sur le ligand est que des molécules similaires vont avoir tendance à présenter des profils d'activité similaires [10].

La similarité moléculaire peut être mesurée par trouvez des propriétés communes qui seront utilisées comme descripteurs de similarité. En fonction du nombre de ligand de références pour la cible et du type de descripteurs, les méthodes de criblage virtuel basées sur ligands sont divisées en : méthodes de recherche de similarité (2D ou 3D), QSAR, et pharmacophore basé sur le ligand [11].

II.2.1.Recherche de similarité :

Cette méthode est utilisée lorsque très faible nombre de ligand ont été rapportés pour une cible biologique choisie. En effet ; si le ligand actif est connu, on peut effectuer une recherche de similarité [12]. Donc le but de cette méthode est de trouver des molécules ayant une structure similaire aux ligands de référence en utilisant des descripteurs et de métriques similaires [11].

II.2.2.Méthodes QSAR :

Les méthodes QSAR permettent d'établir quantitativement la relation mathématique entre la structure chimique d'une molécule et son activité biologique. Cette relation peut être utilisée pour cribler ou concevoir de nouvelles molécules avec une meilleure activité biologique.

Lors d'une étude QSAR (Figure II. 3), il faut calculer à partir de la structure moléculaire de plusieurs molécules actives tous les caractéristiques structurales spécifiques ou des descripteurs moléculaires possibles tels que la lipophilie, la polarisation, les propriétés stériques et électroniques. Après élimination des descripteurs dont la valeur ne varie pas ou peu sur l'ensemble des molécules, une analyse multivariée suivie d'une évaluation statistique sont menées pour obtenir le modèle QSAR. Une dernière étape de validation du modèle est nécessaire pour s'assurer de sa fiabilité [12, 13].

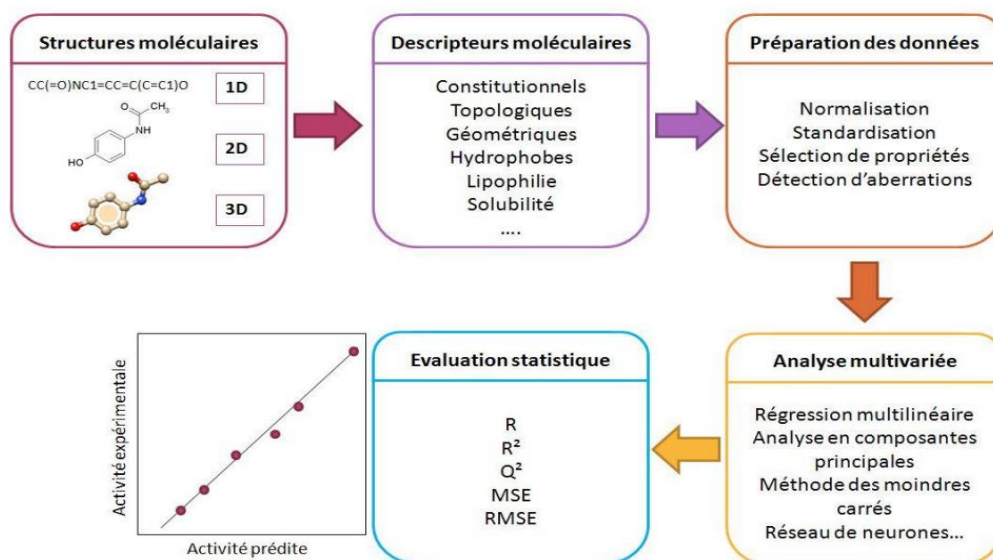


Figure II.3 : schéma descriptif des étapes QSAR

II.2.3.Pharmacophore basé sur le ligand :

Le pharmacophore selon l'IUPAC est l'ensemble des caractéristiques stériques et électroniques nécessaires pour assurer une interaction supramoléculaires optimale

avec une cible biologique spécifique et déclencher (ou bloquer) sa réponse biologique [14]. Suivant cette définition, les molécules qui partagent des pharmacophores similaires se lieront de manière similaire à récepteur particulier.

Un pharmacophore est dite « ligand-based » s'il est déterminé à partir d'un composé actif utilisé comme référence sans tenir compte de la structure du récepteur. Par contre un pharmacophore dit « structure-based » lorsqu'il est construit à partir de la structure du site de liaison de la cible à étudié [15].

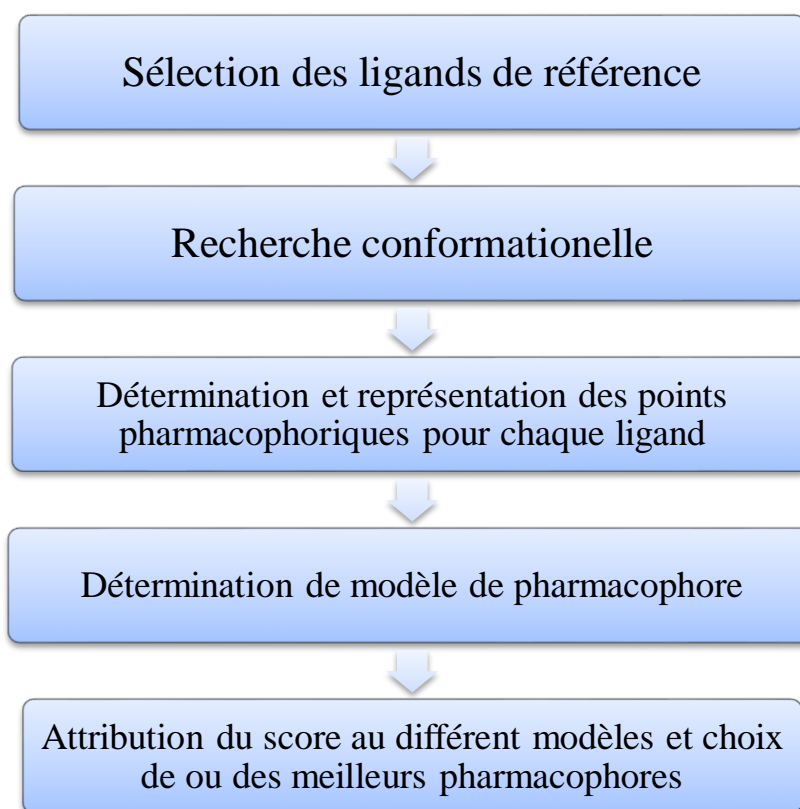


Figure II.4 : principale étapes de l'élucidation d'un pharmacophore.

II.2.3.1. Groupes fonctionnels considérés comme un pharmacophore :

Les modèles pharmacophores jouent un rôle essentiel dans la conception de la structure et la compréhension des interactions possibles au niveau d'un site de liaison identifié [16]. Une caractéristique clé de ces méthodes est que le pharmacophore est défini par des points pharmacophoriques qui se complètent les uns les autres (figure II.5). Ces points pharmacophoriques sont des groupes fonctionnels plutôt que des groupes d'atomes. Les différents points pharmacophoriques recherchés comprennent les donneurs et les accepteurs de liaisons hydrogènes, les groupements chargés positivement qui interagissent électrostatiquement avec les groupements chargés négativement, et vice versa, ainsi que les

groupements aromatiques. Ces derniers sont considérés comme distincts de la classe plus large des groupements hydrophobes à partir desquels ils proviennent, et ils se complètent mutuellement avec d'autres groupements hydrophobes [16].

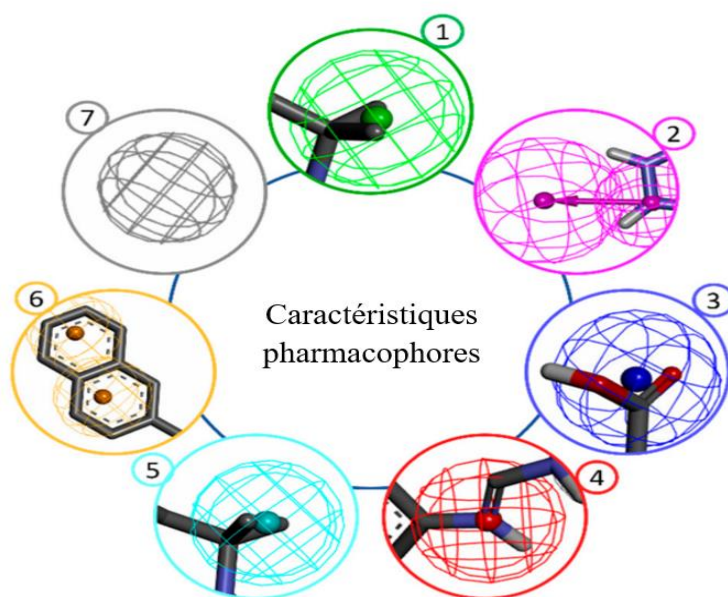


Figure II-5 : Caractéristiques pharmacophoriques. Les principaux types de caractéristiques pharmacophoriques sont représentés par des entités géométriques et comprennent : 1— Accepteur de liaison hydrogène (HBA), 2— Donneur de liaison hydrogène (HBD), 3— Négatif ionisable (NI), 4— Positif ionisable (PI), 5— Hydrophobe (H), 6— Aromatique (AR), 7— Volume d'exclusion (XVOL).

II.2.3.2. Modèles pharmacophore 3D :

Un pharmacophore est l'arrangement spatial des propriétés chimiques nécessaires pour déclencher un effet biologique à partir d'une base de ligands actifs. Il est également possible d'obtenir des pharmacophores en 3D à partir de la structure tridimensionnelle d'un complexe entre un ligand et son site de liaison, ou à partir de la structure tridimensionnelle du récepteur. Ces pharmacophores en 3D sont ensuite utilisés pour cribler une base de données de composés en fonction de leur superposition géométrique avec les pharmacophores du modèle. Cela permet aux méthodes de criblage basées sur les pharmacophores d'être beaucoup moins gourmandes en temps de calcul que les algorithmes d'amarrage moléculaire [17].

II.2.3.3. Progrès dans les approches 3D-QSAR (pharmacophore 3D-QSAR):

Les relations structure activité quantitatives en trois dimensions (3D QSAR) sont des modèles qui établissent une relation entre une activité biologique et les paramètres structuraux

(descripteurs moléculaires) calculés dans l'espace tridimensionnel pour un groupe de molécule.

Cette méthodologie est apparue comme une extension naturelle de l'approche QSAR classique développée par Hansh et Free-Wilson. Le principal inconvénient des méthodes 3D-QSAR est qu'elles reposent toutes sur des hypothèses différentes. [18].

II.2.3.4. Étude 3D-QSAR :

Les modèles CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) et CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) sont utilisés couramment pour étudier la relation quantitative de structure-activité au niveau tridimensionnel [19], [20].

Le CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis), une méthode qui reflète l'interaction sans liaison entre le récepteur et le ligand, est largement utilisé dans la conception de médicaments. Les énergies potentielles stérique (Lennard-Jones) et électrostatique (coulombique) des champs de force implémentés dans logiciel SYBYL ont été évaluées par CoMFA. Pour chaque ligand d'alignement de pharmacophore, un réseau cubique 3D avec un espacement de grille de 1,0 Å dans les directions x, y et z a été généré pour enfermer l'agrégat de molécule. Un atome de carbone sp³ avec une charge de +1,0 et un rayon de Van der Waals de 1,52 Å a été utilisé comme sonde ; cet atome a été placé à chaque point du réseau pour calculer divers champs stériques et électrostatiques. Une valeur de coupure d'énergie de 30 kcal / mol a été imposée à tous les calculs de CoMFA pour éviter des valeurs d'énergie excessivement élevées et irréalistes dans la molécule. Ensuite, l'analyse des moindres carrés partiels (PLS) a été appliquée pour obtenir le modèle final [18].

Le CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) a utilisé une fonction de type gaussien basée sur la distance. Ainsi, CoMSIA peut être capable d'obtenir des modèles plus stables que CoMFA dans les études 3D-QSAR. Le modèle CoMSIA construit a fourni des informations sur les champs stériques, électrostatiques, hydrophobes, donneurs de liaisons hydrogène et accepteurs de liaisons hydrogène [18].

II.3. Criblage virtuel « structure-based »

Un criblage virtuel basé sur la structure est l'équivalent *in silico* d'un test expérimental qui étudie la liaison à la cible biomoléculaire. Cependant cela dépend principalement de la disponibilité de la structure 3D de la cible thérapeutique obtenue par des méthodes expérimentales telles que la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie par résonance

magnétique nucléaire (RMN) dans des bases de données telles que la protéine Data Bank. En revanche pour toutes les structures dont la détermination expérimentale n'est pas possible, des méthodes de prédiction de la structure 3D par homologie de séquence peuvent être utilisées. Ces méthodes reposent sur la structure expérimentale d'une protéine similaire [21].

Effectivement, cette approche peut s'avérer très coûteuse en termes de puissance de calcul et d'expérience [22].

Différentes approches peuvent être utilisées pour ce type de criblage, notamment la conception de novo, la construction de modèles pharmacophoriques basés sur la structure des cibles, l'établissement de modèles RD-QSAR (relation quantitative structure-activité dépendant du récepteur) et le docking moléculaire, qui est actuellement l'approche la plus utilisée [11].

II.3.1. Conception novo : les méthodes de construction de novo design se basent sur la connaissance du site actif de la cible étudiée pour construire de nouveaux composés bioactifs qui seront spécifiquement adaptés à cette cible [23]. Cette approche offre l'avantage d'explorer un espace chimique plus large que celui couvert par les chimiothèques existantes [24].

II.3.2. Modèle pharmacophorique « structure-based » : comme nous avons vu précédemment, les modèles pharmacophoriques basés sur les ligands peuvent être utilisés pour identifier de nouveaux composés à partir d'un composé actif de référence. Toutefois, lorsque la structure 3D du site de liaison est disponible, prendre en compte cette information permet de développer de nouveaux modèles pharmacophoriques qui intègrent des données cruciales et inexploitées non présentes dans les modèles basés sur les ligands. Il est possible de distinguer deux types d'approches pour construire un modèle pharmacophorique basé sur la structure du récepteur : les approches basées sur le récepteur (ou "receptor-based approach") et les approches basées sur le complexe récepteur ligand (ou "complex-based approach") [25].

II.3.3. RD-QSAR (relation quantitative structure-activité dépendant du récepteur) : les méthodes 3D-QSAR dépendantes du récepteur ont pour principe d'établir une corrélation entre l'activité biologique représentée par l'énergie libre de liaison, et les interactions ligand récepteur [26].

Le logiciel VALIDATE 240 est l'une des premières approches développées pour les méthodes 3D-QSAR dépendantes du récepteur. A partir de 12 propriétés physico-chimiques,

notamment les interactions stériques et électrostatiques récepteurs-ligand, une régression PLS permet de prédire l'activité biologique de nouveaux composés [27].

II.3.4. Docking moléculaire :

Le docking ou connue sous le nom « amarrage moléculaire ». En effet le docking moléculaire est une procédure de simulation informatique pour prédire la conformation d'un complexe intermoléculaire récepteur-ligand, où le récepteur est généralement une protéine ou une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) et le ligand soit une petite molécule soit une autre protéine. Il peut également être défini comme un processus de simulation où une position de ligand est estimée dans un site de liaison prédit ou prédéfini [28]. Les simulations d'amarrage moléculaire peuvent être utilisées pour reproduire des données expérimentales grâce à des algorithmes de validation d'amarrage, où les conformations ou protéine-protéine sont obtenues *in silico* et comparée aux structures obtenues à partir de la cristallographie aux rayons X ou de la résonance magnétique nucléaire. De plus le docking est l'un des principaux outils pour les procédures de criblage virtuel, ou une bibliothèque de plusieurs composés est « ancrée » contre une cible médicamenteuse et renvoie le meilleur résultat [28].

II.3.4.1. Objectif de docking :

Les méthodes de docking ont pour but de prédire l'interaction entre une molécule (le ligand) et une protéine (récepteur). Elles permettent de simuler la conformation et l'orientation du ligand dans le site actif de la protéine, afin de prédire la capacité de cette molécule à ce lié au récepteur [29], [30].

Le processus de docking moléculaire se décompose en deux étapes fondamentales : le docking et le scoring (figure II.6).

- La première étape, le docking. Consiste à générer des conformations et orientations possibles du ligand dans le site actif de la protéine (recepteur) (généralement appelés pose).
- La seconde étape, le scoring, est utilisée pour évaluer la qualité de la liaison potentielle entre le ligand et le récepteur. Cette étape vise à prédire l'affinité de liaison entre le ligand et le récepteur et permet de donner une note ou score aux poses obtenues lors de la phase de docking[31].

En combinant ces deux étapes, le docking moléculaire permet d'obtenir une liste de ligands candidats qui peuvent être évalués expérimentalement pour leur activité biologique.

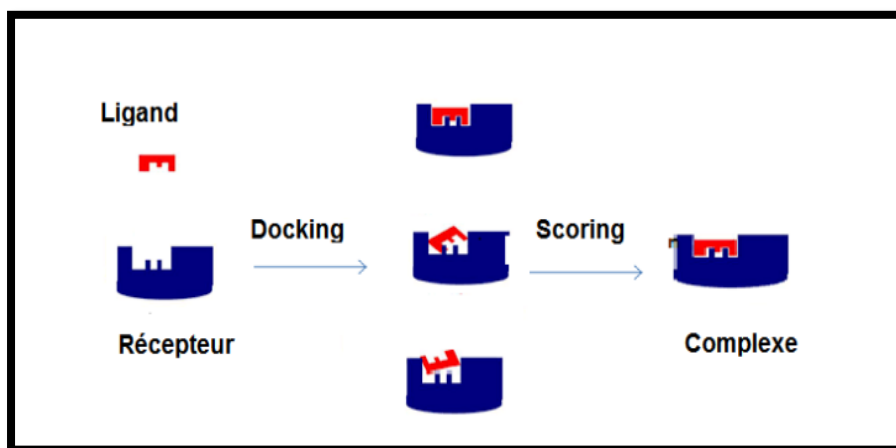


Figure II.6: Principe générale de docking

II.3.4.2. Les outils de docking moléculaire :

Les logiciels de docking sont des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine. Effectivement pour pratiquer un docking moléculaire on a besoin d'un récepteur macromoléculaire de nature protéique appelée cible, et d'un ligand ainsi que d'un programme de docking qui prédire la conformation la plus favorable du ligand une fois qu'il sera lié au récepteur.

- ✚ **Le récepteur :** Le récepteur est une macromolécule de nature protéique qui est souvent une enzyme, une protéine membranaire, ou une protéine régulatrice. Il s'agit d'une cible capable de se lier spécifiquement et réversiblement à une autre petite molécule appelée ligand [32].

La PDB (Protéine Data Bank) est la plus grande banque de données en libre accès contenant des structures tridimensionnelles de macromolécules biologiques telles que les protéines que nous utilisons et les acides nucléiques (ARN et ADN) [32].

- ✚ **Le ligand :** le terme ligand est couramment utilisé en chimie de coordination pour désigner un atome, un ion ou une molécule qui se lie à un centre métallique pour former un complexe[33]. Cependant, en biologie le terme ligand est généralement utilisé pour désigner une petite molécule qui se lie de manière réversible à une protéine. Les ligands peuvent être des hormones, des neurotransmetteurs, des médicaments ou d'autres molécules impliquées dans les processus biologiques [34].

Le choix du ligand est crucial en docking moléculaire. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules [35]. Les structures des ligands peuvent être obtenues par deux moyens principaux :

1/ la première approche pour obtenir des ligands consiste à utiliser des ligands déjà connus et disponibles dans la PDB ou la littérature. On peut ensuite les reproduire par dessin, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2...) en utilisant des logiciels de construction moléculaires tels que titan.

2/ la seconde méthode consiste à utiliser des collections des molécules virtuelles commerciales, qui sont des bases de données de structure chimiques, également appelées chimio-thèques ou espaces chimiques, la plus utilisée est PubChem[33]. Une base de données publique contenant des millions de composés organiques, avec des informations sur leur structure activité biologique, leurs propriétés physicochimiques etc.

✚ **Un programme de docking moléculaire** : le docking moléculaire est devenue une outille essentielle pour la recherche de produits biologiquement actifs (médicaments) et pour comprendre les interactions entre les protéines et les petites molécules. Et il a pour objectif essentiel de prédire avec une grande précision la conformation la plus favorable d'une molécule au sein de son récepteur [36,37]. Il existe une multitude de programmes de docking moléculaire disponibles chacun avec ses avantages et ses limitations. Parmi les programmes les plus fréquemment cités ; AutoDock, GOLD, Flex, Dock, MOE Dock, Surflesx-Dock, Dock3, Glide7, ICM8 [38,39] et sont en effet très populaire et largement utilisés dans la communauté scientifique.

La figure II.7 montre le nombre de citation des programmes de docking les plus courants (durant la période de 2001 – 2011) avec Auto dock, GOLD, DOCK, FlexX, Glide étant.

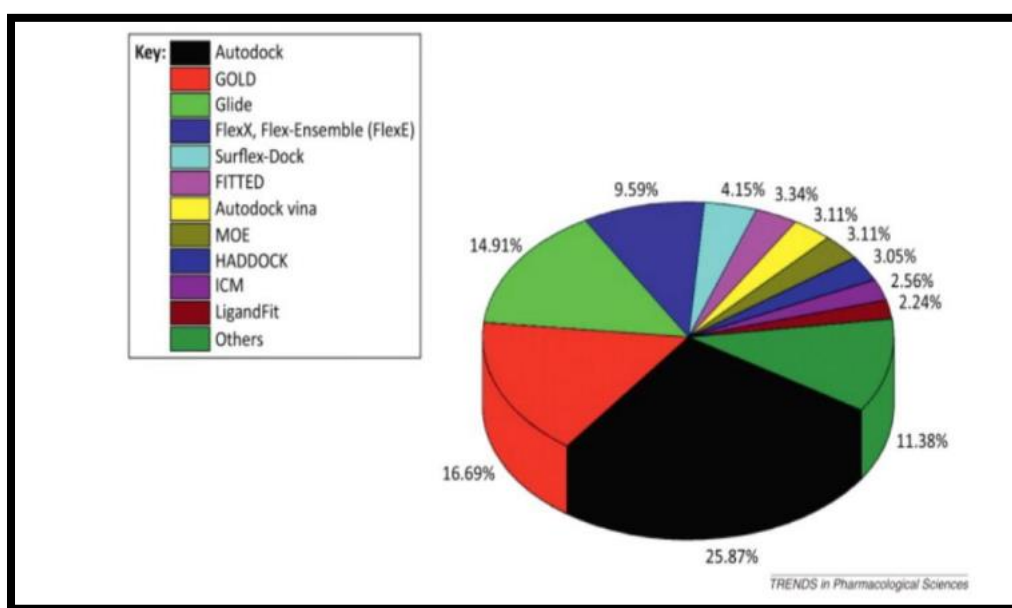


Figure II.7: diagramme des programmes de docking les plus cités [39].

II.3.4.3. Les types de docking moléculaire :

Le docking moléculaire peut être classé en trois catégories principales (figure III.8): **docking rigide**, **flexible** et **semi flexible**.

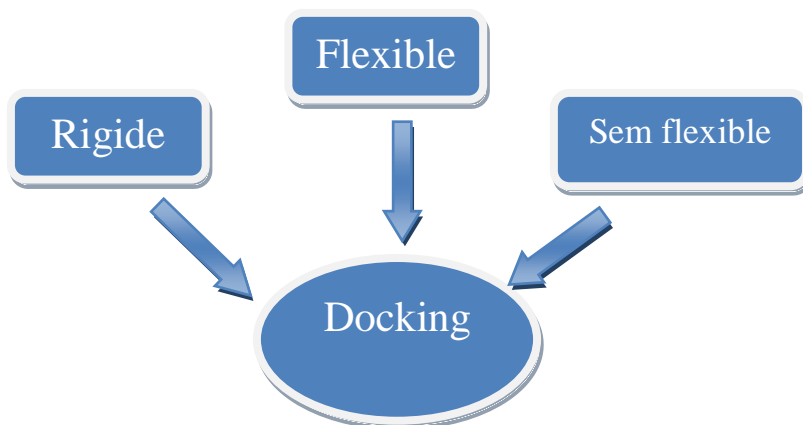


Figure II.8 : schéma présentatif de type de docking

- **Docking rigide :** Le docking rigide est bien sur le plus simple et demeure encore souvent employé pour l'amarrage protéine-protéine [40]. Pendant longtemps, le processus de liaison d'un ligand à son récepteur était considéré comme un processus statique, où le ligand et le récepteur étaient considérés comme des entités rigides qui s'emboîtaient parfaitement comme une clé dans une serrure [11].

La figure III.9 illustre la première proposition du "modèle de la serrure et de la clé", qui aborde le concept du docking rigide entre les récepteurs et les ligands. Ce modèle met en avant l'importance de la complémentarité géométrique [41].

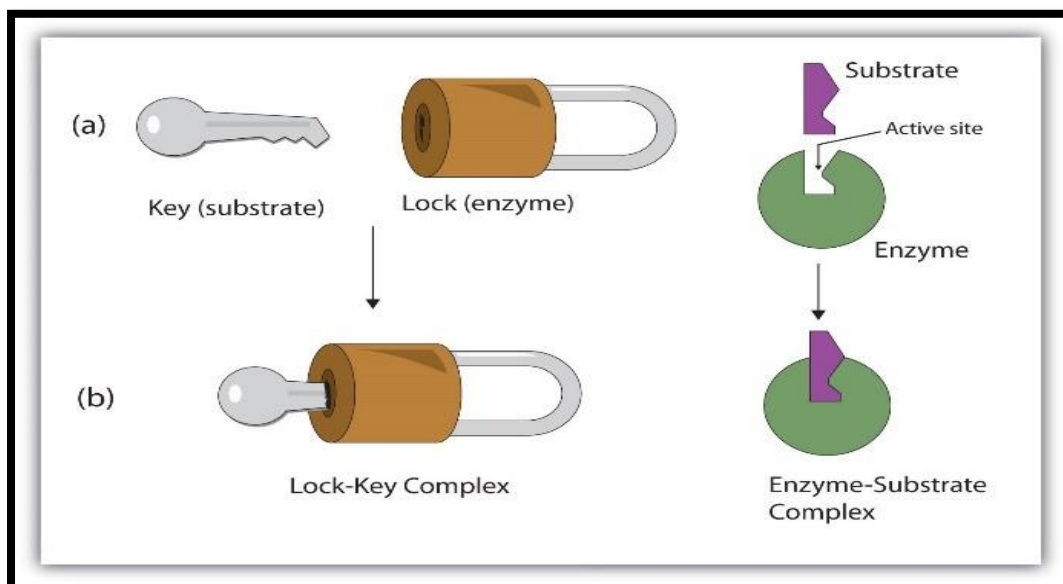


Figure II.9: modèle de docking de type clé-serrure

- **Docking flexible :** Le docking flexible est une méthode qui considère à la fois le ligand et la protéine comme des entités flexibles lors de la liaison. Au cours de cette méthode, la méthode d'amarrage a permis de modifier facilement l'orientation du processus de docking (récepteur et ligand) (figure II.9) [42]. En fin de compte, l'objectif de docking flexible est de trouver la conformation optimale du complexe ligand-récepteur celle qui présente les interactions les plus favorables. Cette flexibilité des récepteurs et ligands dans le docking moléculaire est essentielle pour améliorer la précision des résultats.

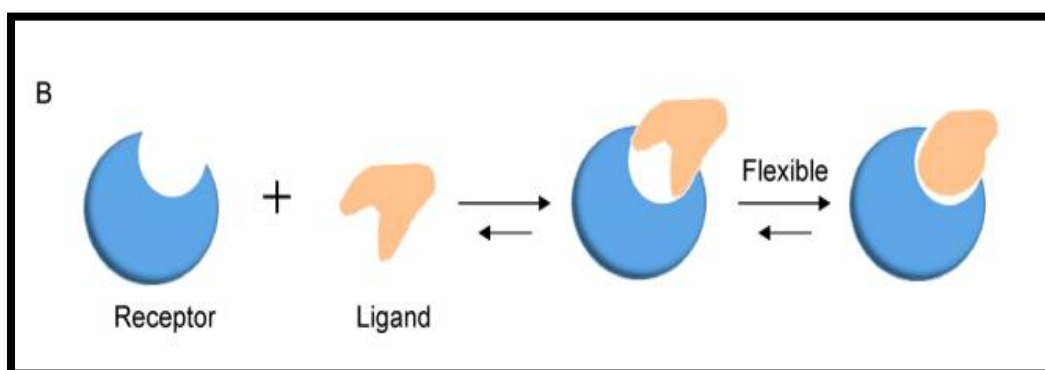


Figure II.10 : Model de docking moléculaire (docking flexible) [41].

- **Docking semi-flexible :** Le docking moléculaire semi-flexible est une approche qui a permis d'obtenir des résultats plus précis en tenant compte de la flexibilité du ligand tout en considérant le récepteur comme un corps rigide [33].

Références

- [1].Xie, W., Robertson, D. L., & Simmons, D. L. (1992). Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: A new target for nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Drug Development Research*, 25(4), 249-265.
- [2].Waszkowycz, B., Perkins, T. D. J., Sykes, R. A., & Li, J. (2001). Large-scale virtual screening for discovering leads in the postgenomic era. *IBM Systems Journal*, 40(2), 360-376.
- [3]. Oprea, T. I., & Matter, H. (2004). Integrating virtual screening in lead discovery. *Current opinion in chemical biology*, 8(4), 349-358.
- [4].Shoichet, B. K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature*, 432(7019), 862-865.
- [5].Tanrikulu, Y., Krüger, B., & Proschak, E. (2013). The holistic integration of virtual screening in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(7-8), 358-364.
- [6].Merzoug, A., & Chikhi, A. (2018). *Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- [7].Oprea, T. I., & Matter, H. (2004). Integrating virtual screening in lead discovery. *Current opinion in chemical biology*, 8(4), 349-358.
- [8].Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British journal of pharmacology*, 152(1), 9-20.
- [9].Muegge, I., & Oloff, S. (2006). Advances in virtual screening. *Drug discovery today: technologies*, 3(4), 405-411.
- [10]. Johnson, M. A., & Maggiora, G. M. (1990). *Concepts and applications of molecular similarity*. Wiley.
- [11].Lagarde, N. (2014). *Méthodes de criblage virtuel in silico: importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6* (Doctoral dissertation, Paris, CNAM).
- [12]. Salman, M. M., Al-Obaidi, Z., Kitchen, P., Loreto, A., Bill, R. M., & Wade-Martins, R. (2021). Advances in applying computer-aided drug design for neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4688.
- [13]. Gbeddy, G., Egodawatta, P., Goonetilleke, A., Ayoko, G., & Chen, L. (2020). Application of quantitative structure-activity relationship (QSAR) model in comprehensive human health risk assessment of PAHs, and alkyl-, nitro-, carbonyl-,

- and hydroxyl-PAHs laden in urban road dust. *Journal of hazardous materials*, 383, 121154.
- [14]. Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., & Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and applied Chemistry*, 70(5), 1129-1143.
- [15]. Empereur-Mot, C. (2017). *Développement d'outils statistiques d'évaluation de méthodes de criblage virtuel: courbes de prédictivité & Screening Explorer* (Doctoral dissertation, Conservatoire national des arts et métiers-CNAM).
- [16]. Varnek, A., & Tropsha, A. (Eds.). (2008). *Cheminformatics approaches to virtual screening*. Royal Society of Chemistry.
- [17]. Toropov, A. A., Toropova, A. P., Raska Jr, I., Leszczynska, D., & Leszczynski, J. (2014). Comprehension of drug toxicity: software and databases. *Computers in biology and medicine*, 45, 20-25.
- [18]. Fredj, B. (2021). *Etude 3D-QSAR, Docking moléculaire et criblage ADMET pour des inhibiteurs potentiels de la Cathepsine B* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA).
- [19]. Cramer, R. D., Patterson, D. E., & Bunce, J. D. (1988). Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 110(18), 5959-5967.
- [20]. Xue, C. B., Zhang, L., Luo, W. C., Xie, X. Y., Jiang, L., & Xiao, T. (2007). 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(5), 2006-2015.
- [21]. S, Houamdi. & R, Kebbabi. (2021). *Prédiction de nouveaux agents Antiangiogéniques à l'aide d'un criblage virtuel basé sur la structure de la cible* (Doctoral dissertation, university center of abdalhafid boussouf-MILA).
- [22]. Cummings, B. S. (2007). Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs. *Biochemical pharmacology*, 74(7), 949-959.
- [23]. Schneider, G., & Fechner, U. (2005). Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(8), 649-663.
- [24]. Gbeddy, G., Egodawatta, P., Goonetilleke, A., Ayoko, G., & Chen, L. (2020). Application of quantitative structure-activity relationship (QSAR) model in comprehensive human health risk assessment of PAHs, and alkyl-, nitro-, carbonyl-, and hydroxyl-PAHs laden in urban road dust. *Journal of hazardous materials*, 383, 121154.

- [25]. Dror, O., Shulman-Peleg, A., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2004). Predicting molecular interactions in silico: I. A guide to pharmacophore identification and its applications to drug design. *Current medicinal chemistry*, *11*(1), 71-90.
- [26]. Ortiz, A. R., Pisabarro, M. T., Gago, F., & Wade, R. C. (1995). Prediction of drug binding affinities by comparative binding energy analysis. *Journal of medicinal chemistry*, *38*(14), 2681-2691.
- [27]. Head, R. D., Smythe, M. L., Oprea, T. I., Waller, C. L., Green, S. M., & Marshall, G. R. (1996). VALIDATE: A new method for the receptor-based prediction of binding affinities of novel ligands. *Journal of the American Chemical society*, *118*(16), 3959-3969.
- [28]. Dias, R., de Azevedo, J., & Walter, F. (2008). Molecular docking algorithms. *Current drug targets*, *9*(12), 1040-1047.
- [29]. Lyne, P. D. (2002). Structure-based virtual screening: an overview. *Drug discovery today*, *7*(20), 1047-1055.
- [30]. Tuccinardi, T. (2009). Docking-based virtual screening: recent developments. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, *12*(3), 303-314.
- [31]. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, *3*(11), 935-949.
- [32]. Martin, L. (2006). *Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif: une application sur la protéine kinase FAK* (Doctoral dissertation, Montpellier 2).
- [33]. Mokrani, E. H., & Bensegueni, A. (2012). *Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- [34]. Tahar, E. M. N., & Benlounissi, Aïcha, E. M.(2021). Mémoire.
- [35]. Monge, A. (2006). *Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche «in silico» de nouveaux composés bioactifs* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- [36]. Thiriote, E. (2009). *Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques: Développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A* (Doctoral dissertation, Nancy 1).
- [37]. Chikhi, A. (2007). *Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase–Substances antibactériennes a l'aide de techniques de*

“docking”(arrimage) moléculaire (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat d’université: Biochimie appliquée. Constantine: Université Mentouri de Constantine. Algérie. 2007. 90p).

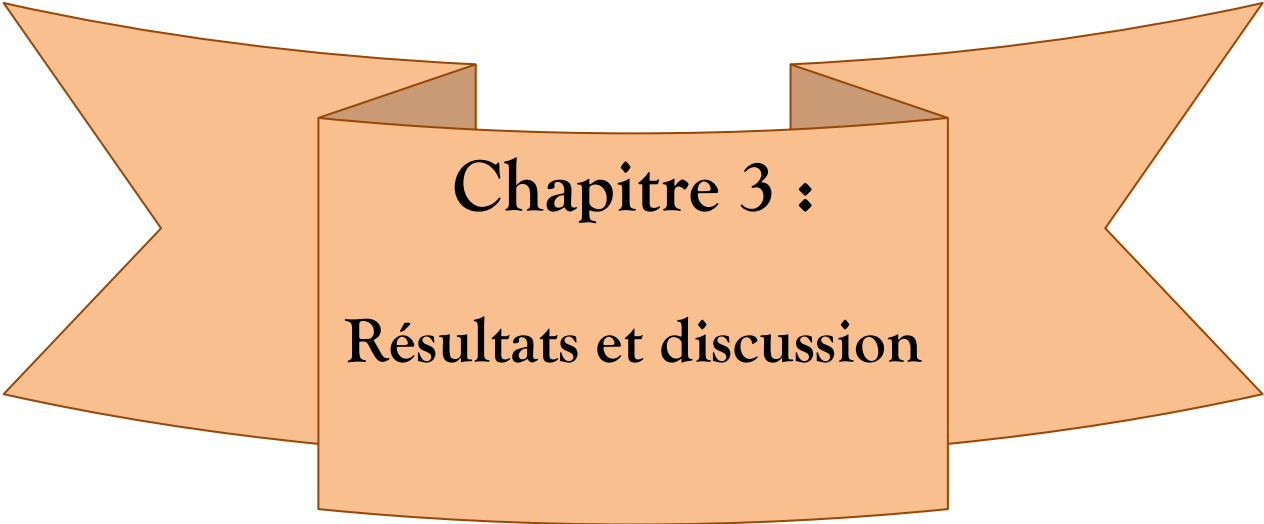
[38]. Onodera, K., Satou, K., & Hirota, H. (2007). Evaluations of molecular docking programs for virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 47(4), 1609-1618.

[39]. Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.

[40]. Bouchagra, S. (2018). *Modelisation des interactions proteine-petits molecules: etude de la relation structure-fonction dans le cas des lipases* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat]. Annaba: Université Badji Mokhtar).

[41]. Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7, 83-89.

[42]. Roy, A., Seal, P., Sikdar, J., Banerjee, S., & Haldar, R. (2018). Underlying molecular interaction of bovine serum albumin and linezolid: A biophysical outlook. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(2), 387-397.



Chapitre 3 :
Résultats et discussion

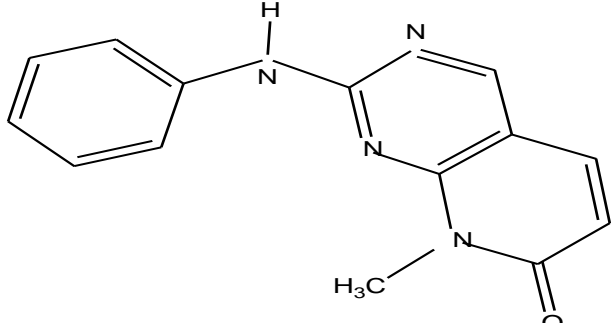
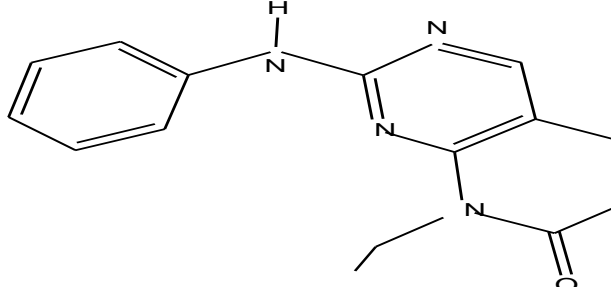
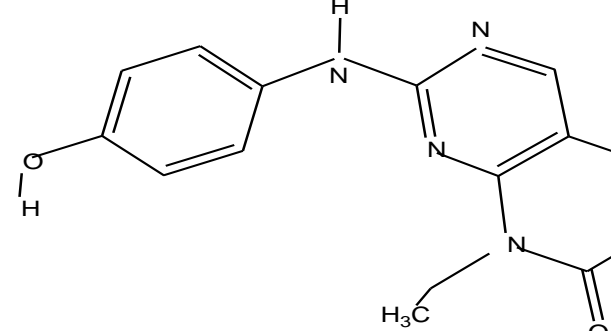
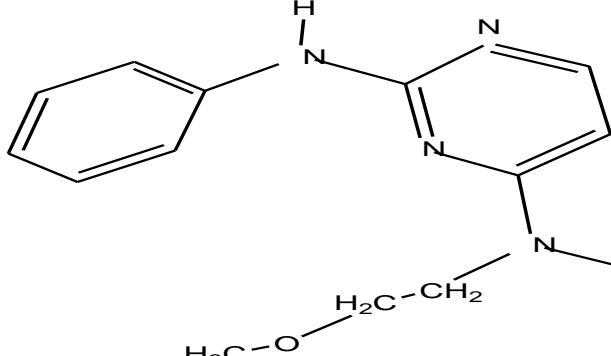
III.1.Introduction :

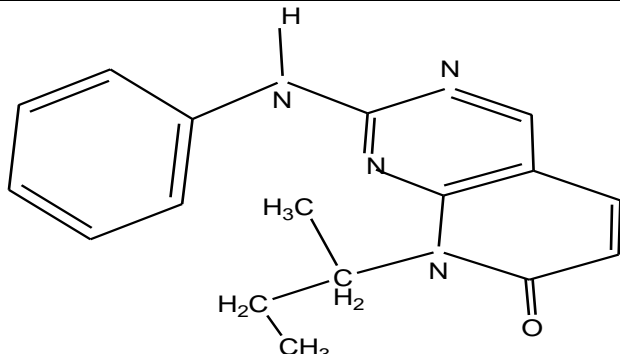
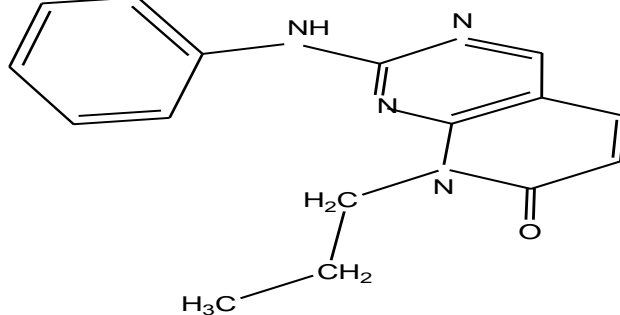
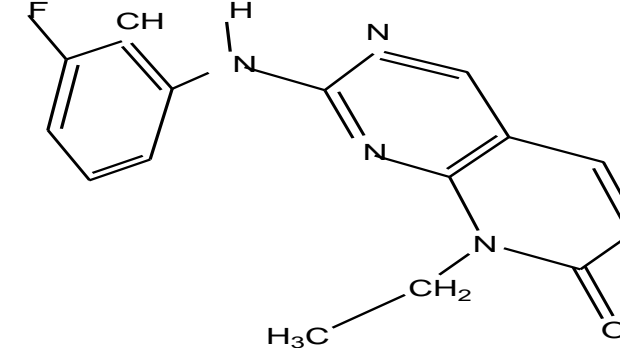
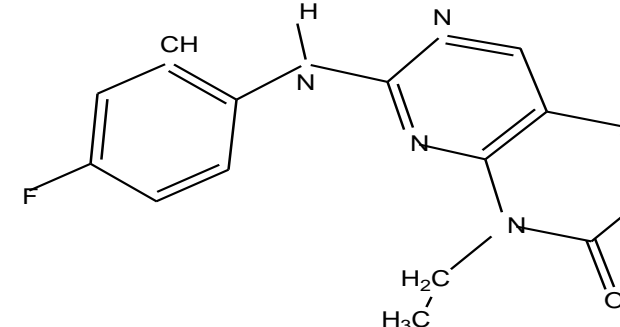
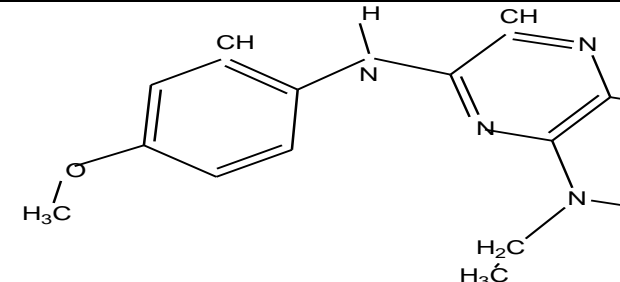
Dans cette étude, des approches informatiques d'aide à la conception de médicament (CADD) (Computer-aided drug design) ont été utilisées pour examiner un ensemble de données d'inhibiteurs de CDK4, dans le but d'améliorer la compréhension du processus de liaison et des exigences structurelles nécessaires pour obtenir une activité élevée. Des méthodes CADD basée sur des ligands compris des relations quantitative structure-activité (QSAR 3D, ont été employées) [1]. Ces méthodes ont permis de développer des modèles quantitatifs capables de prédire l'activité de nouveaux composés tout en mettant en évidence les propriétés physicochimiques essentielles qui influencent cette activité. Le modèle pharmacophore le plus performant a été validé en utilisant trois méthodes différentes, puis appliqué dans le cadre de criblage virtuel de la base de données de la bibliothèque chimique du NCI, qui comprend plus de 200000 composés. De plus afin d'optimiser l'équilibre des propriétés de type médicament des molécules sélectionnées, plusieurs filtres ont été appliqué, notamment les règles de lipinski et veber, la filtration intelligente basée sur les descripteurs ADMET, ainsi que le filtrage par activité estimée ≤ 0.5 nM. Par la suite, nous avons élargi nos recherche en appliquant le docking moléculaire comme un outil de virtuel screening, a fin d'étudier l'affinité de liaison des ligands au récepteur afin d'inhiber l'activité de l'enzyme CDK4.

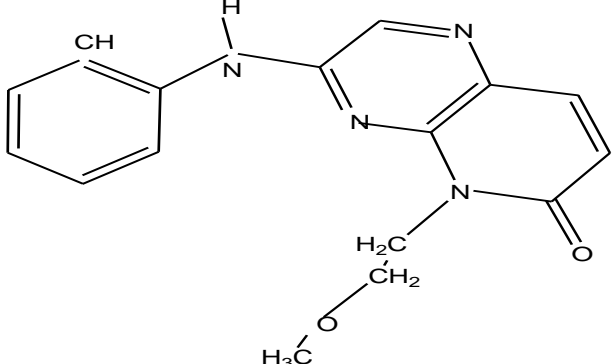
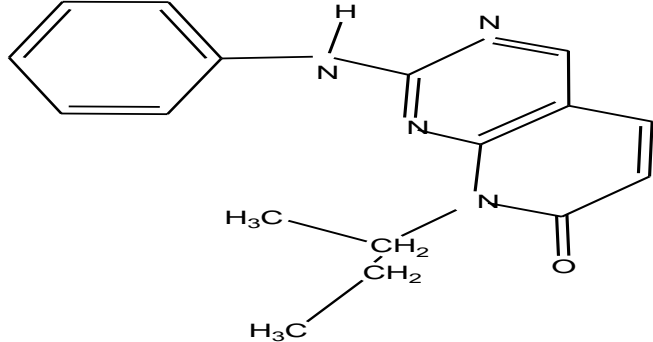
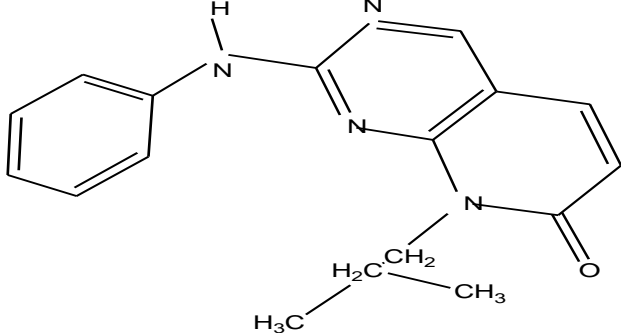
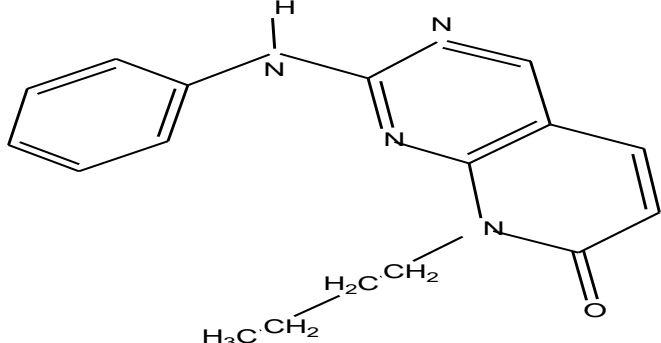
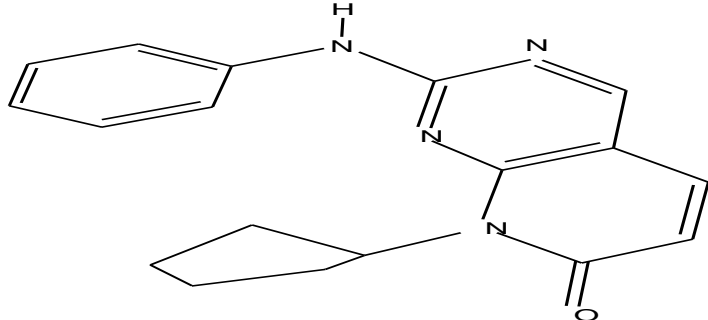
III.2. Présentation des molécules étudier :

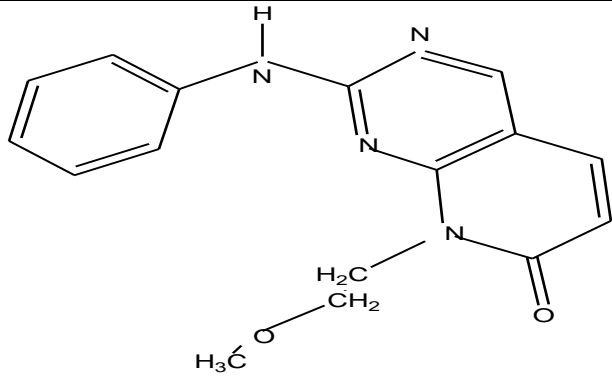
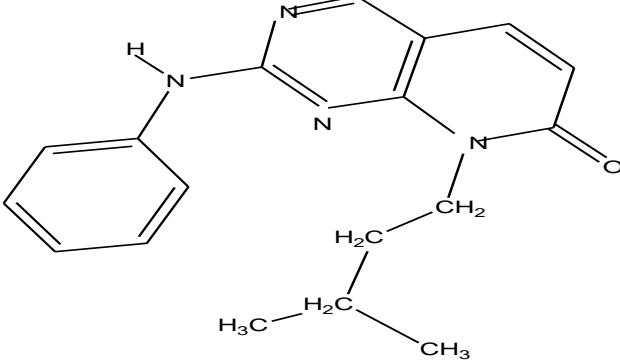
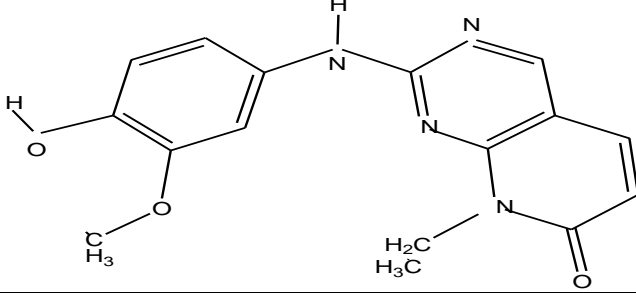
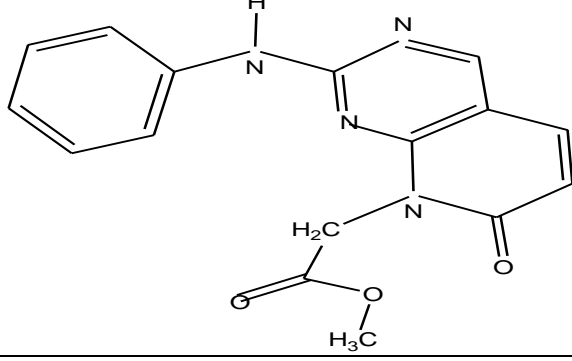
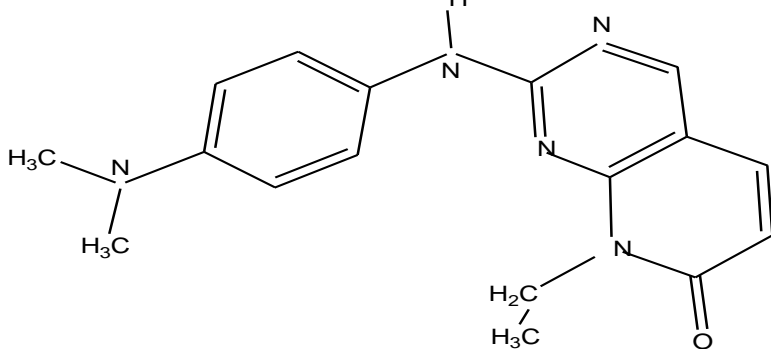
L'ensemble de données choisi pour réaliser ces études comprend 38 inhibiteurs de CDK4 basés sur le noyau pyrido[2,3-d]pyrimidine-7-one, avec un cycle phényle attaché à l'amine secondaire [2]. Les structures de l'ensemble de données et leurs valeurs de pIC50 rapportées sont répertoriées dans le tableau III.1. Tous les composés ont été testés en utilisant la même méthode et les mêmes conditions. L'activité des composés s'étend sur une large gamme de plus de trois ordres de grandeur avec une bonne distribution d'activité. Ces propriétés rendent l'ensemble de données adapté aux études de modélisation moléculaire, en particulier pour l'analyse QSAR [3].

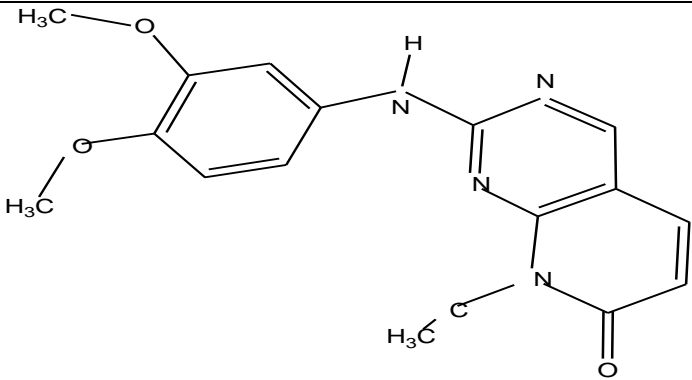
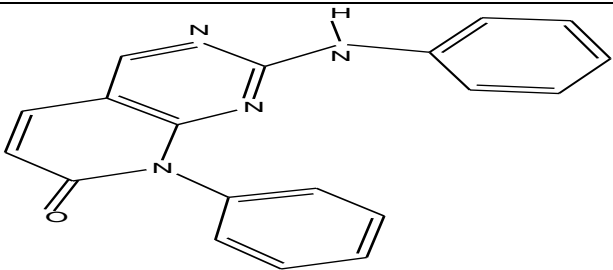
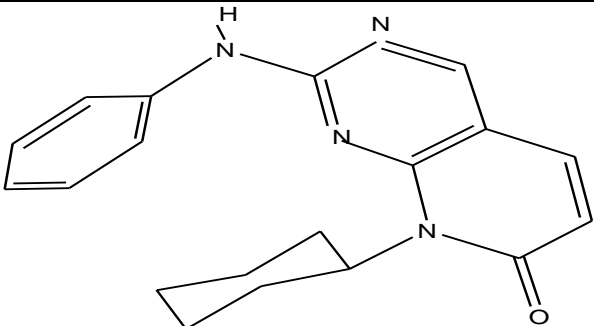
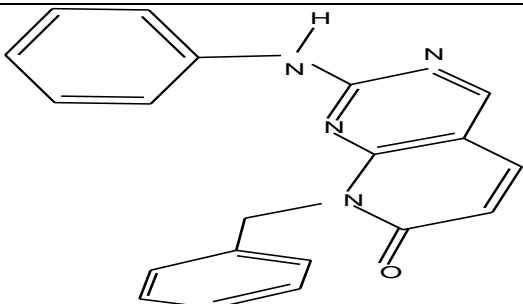
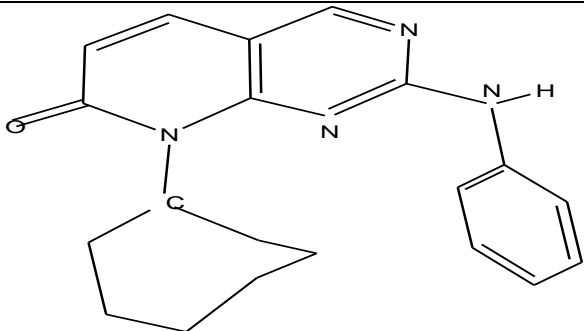
Tableau III.1 : Les structures des composés de la base de données et leurs valeurs de pIC50 rapportées.

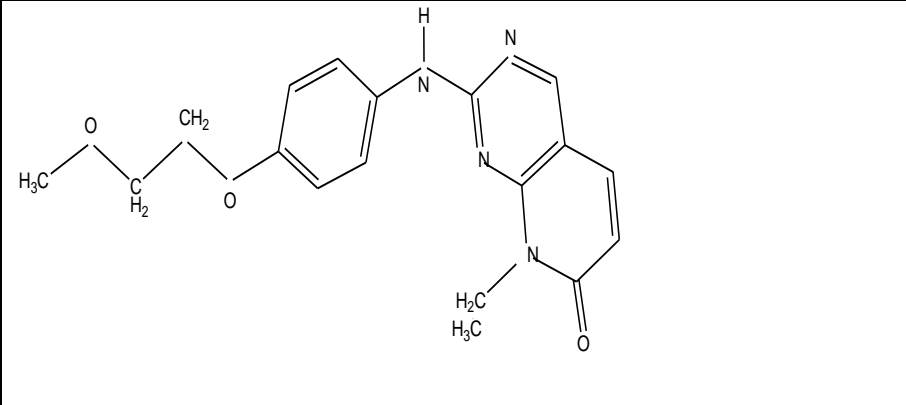
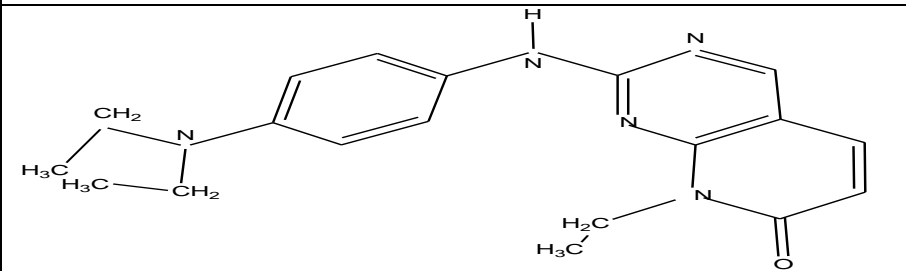
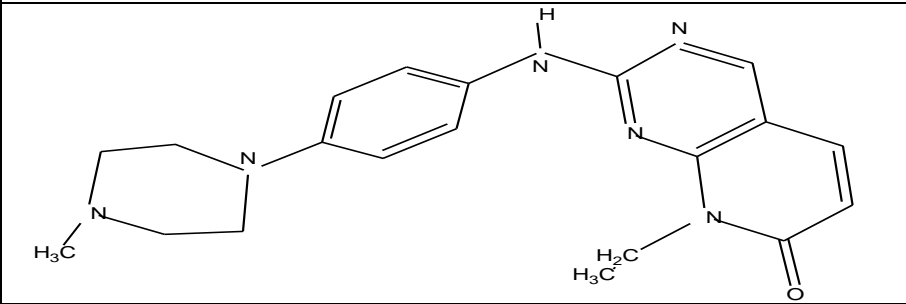
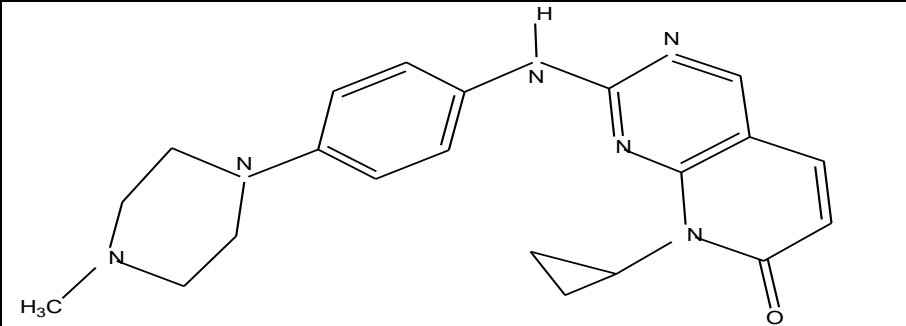
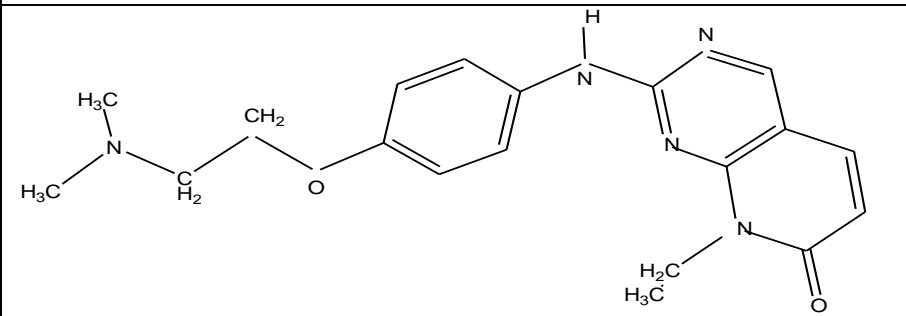
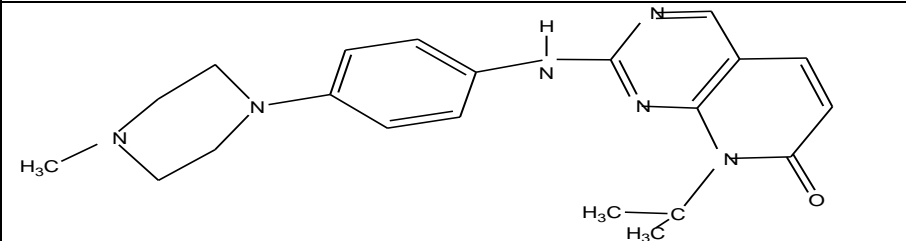
N° de molécule	Molécule	PIC50 (nM)
1	 <chem>CN1C=NC2=C1C(=O)C=C2NC3=CC=CC=C3</chem>	3.739
2	 <chem>CCN1C=NC2=C1C(=O)C=C2NC3=CC=CC=C3</chem>	2.792
3	 <chem>CN1C=NC2=C1C(=O)C=C2NC3=CC=C(O)C=C3</chem>	2.767
4	 <chem>COCCN1C=NC2=C1C(=O)C=C2NC3=CC=CC=C3</chem>	3.618

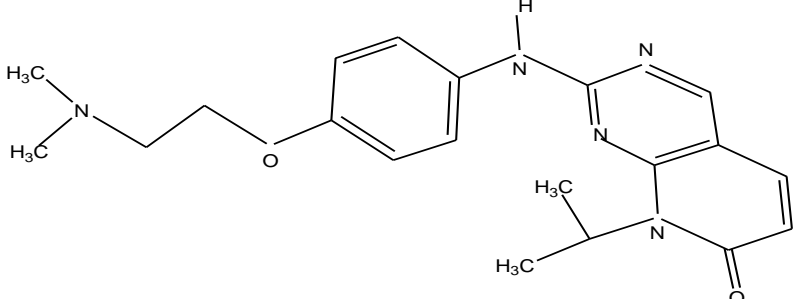
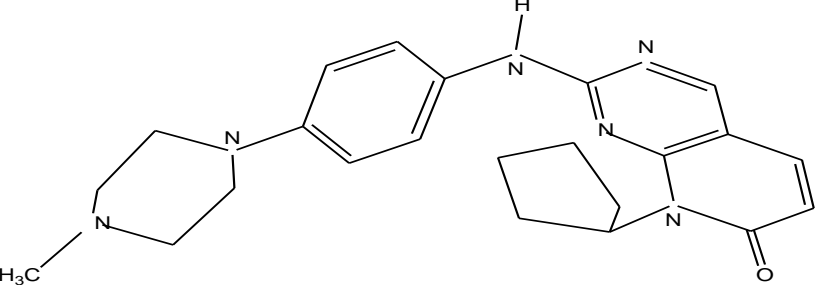
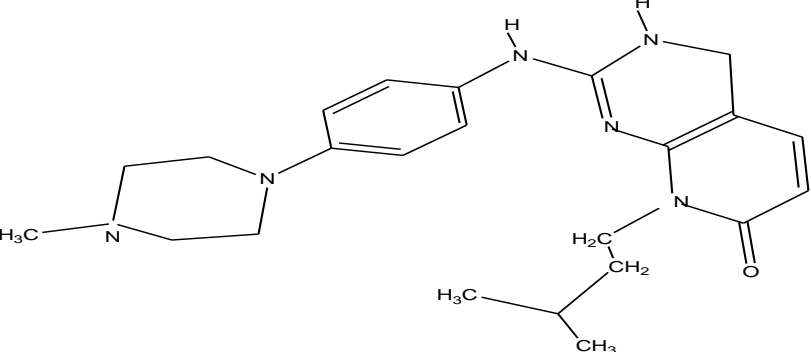
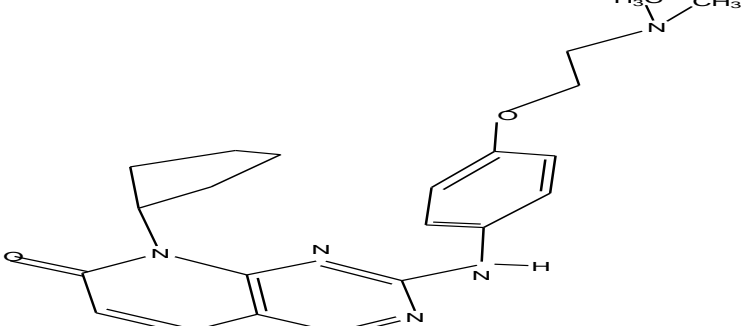
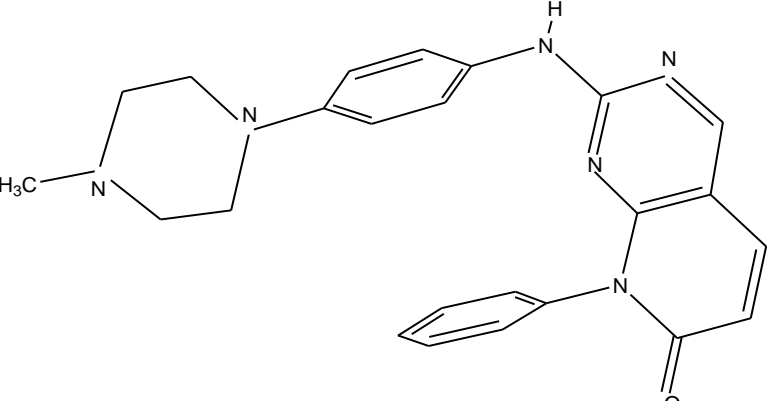
5	 <chem>CC(C)N1C=NC2=C1C(=O)C=C2N(C1=CC=CC=C1)C</chem>	2.161
6	 <chem>CCN1C=NC2=C1C(=O)C=C2N(C1=CC=CC=C1)C</chem>	2.743
7	 <chem>CC(C)N1C=NC2=C1C(=O)C=C2N(C1=CC=C(C=C1)F)C</chem>	3.146
8	 <chem>CC(C)N1C=NC2=C1C(=O)C=C2N(C1=CC=C(C=C1)F)C</chem>	3.093
9	 <chem>CC(C)N1C=NC2=C1C(=O)C=C2N(C1=CC=C(C=C1)OC)C</chem>	2.778

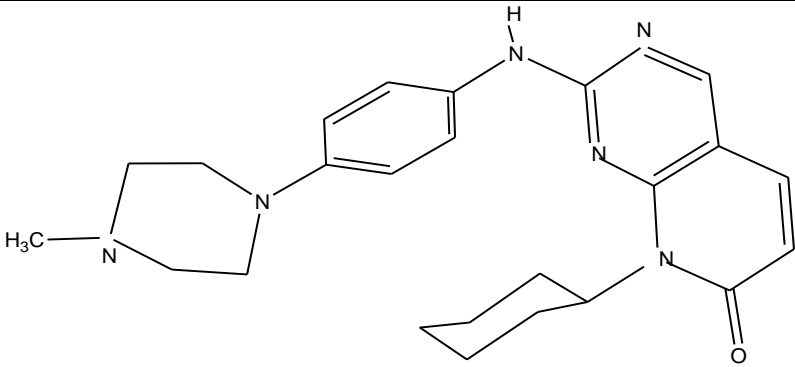
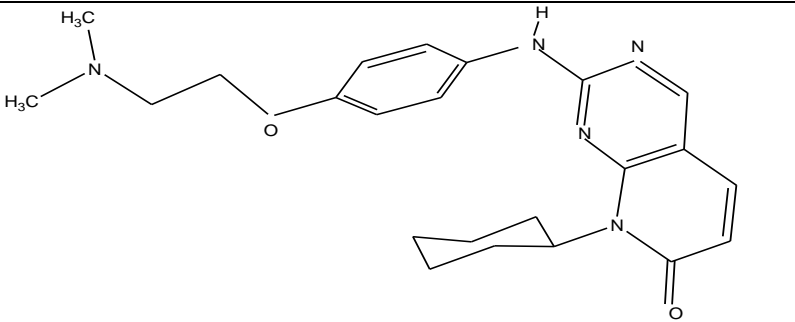
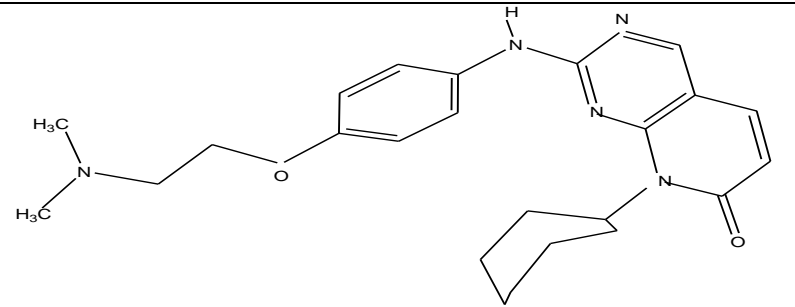
<p>10</p>		<p>3.456</p>
<p>11</p>		<p>2.279</p>
<p>12</p>		<p>2.473</p>
<p>13</p>		<p>3.175</p>
<p>14</p>		<p>2.322</p>

15	 <chem>CCCC(=O)N1C=NC2=C1C=CN2CN(C1=CC=CC=C1)C</chem>	3.892
16	 <chem>CCCC(=O)N1C=NC2=C1C=CN2CN(C1=CC=CC=C1)CC</chem>	2.201
17	 <chem>CCCC(=O)N1C=NC2=C1C=CN2CN(C1=CC(OC)=C(OC)C=C1)CC</chem>	3.261
18	 <chem>CCCC(=O)N1C=NC2=C1C=CN2CN(C1=CC=CC=C1)CC(=O)C</chem>	4.491
19	 <chem>CCCC(=O)N1C=NC2=C1C=CN2CN(C1=CC=C(C=C1)N(C)C)CC</chem>	2.519

20		3.611
21		3.222
22		1.672
23		2.973
24		2.26

<p>25</p>		<p>3.368</p>
<p>26</p>		<p>3.146</p>
<p>27</p>		<p>1.929</p>
<p>28</p>		<p>2.146</p>
<p>29</p>		<p>2.204</p>
<p>30</p>		<p>1.505</p>

31		1.653
32		0.954
33		1.114
34		0
35		2.243

36		0.602
37		1.041
38		0.602

III.3. Méthodologie :

III.3.1. Logiciels utilisé :

Discovery Studio® est une interface graphique intuitive et complète conçue spécifiquement pour faciliter la recherche dans les domaines de la conception de médicaments et de la modélisation des protéines. Il regroupe des applications de référence bien établies telles que Catalyst, MODELER, CHARMM, et d'autres, qui ont fait leurs preuves au fil des années avec des résultats publiés. De plus, Discovery Studio intègre des avancées scientifiques de pointe afin de relever les défis actuels liés à la découverte de médicaments. Ce logiciel s'appuie sur la plate-forme d'exploitation ouverte SciTegic Pipeline Pilot/Scitegic Enterprise Server Platform™, ce qui permet une intégration fluide de la modélisation des protéines, de l'analyse des pharmacophores et de la conception basée sur la structure, ainsi que des applications tierces [4].

III.3.2. Collecte et préparation des données :

La conception informatique de médicament comprend la conception de médicament basée sur les ligands et la structure. Le modèle pharmacophore s'est avéré être un outil de calcul précieux pour la recherche de nouveaux composés Hit/Lead dans différents domaines pathologiques, il permet d'accélérer le processus de découverte de médicaments. Les méthodes 3D-QSAR est largement reconnue comme une approche importante de modélisation de pharmacophore ligand-Based (Basée sur le ligand) [5-7]. Dans le cadre de cette étude, un modèle de pharmacophore 3D-QSAR a été créé en utilisant un ensemble de données comportant 38 composés publiés. Les 38 composés utilisés dans cette étude ont été extraits de travail de NRAVIAN Mark et al [2]. Ces composés ont été testés à l'aide d'un protocole d'essai biologique similaire afin de permettre une corrélation QSAR appropriée. La bioactivité in vitro des inhibiteurs collectés a été exprimée en termes de concentration du composé test nécessaire pour inhiber l'enzyme CDK4 de 50%, c'est-à-dire IC50%. Parmi les 38 composés, 13 inhibiteurs différents ont été sélectionnés pour « training-set » allant d'une activité biologique varie de 1 à 54800 nM. Les inhibiteurs restant ont été utilisés comme « test-set ».

La sélection des deux listes de données "training-set" et "test-set" s'effectue selon les règles suivantes : 1) même mode de liaison et diversité structurale des molécules ; 2) les deux ensembles de données couvrent le plus un large éventail d'activité ; 3) les composés les plus

actifs sont inclus dans l'ensemble de « training- set » car ils fournissent des informations cruciales pour la génération des pharmacophores.

III.4. Résultats et discussion :

III.4.1. Génération de modèles pharmacophores :

La littérature fait état de deux types de modélisation de pharmacophore basés sur les ligands. Le premier est un modèle de pharmacophore qui utilise une caractéristique commune, tandis que le second est un pharmacophore basé sur la 3D-QSAR [8].

L'algorithme HypoGen dans Discovery studio 4.1 (DS) d'accelrys [9] a été utilisé pour générer un modèle de pharmacophore 3D-QSAR permettant de prédire quantitativement l'activité biologique (IC50) des composés étudiés contre CDK4. Les comportements des composés étudiés qui varient de 1 à 54800 nM, dans l'ensemble de « training- set » ont été utilisés pour produire les modèles pharmacophores. Les conformations résultantes (500 pour chaque composé) ont été utilisées pour générer des hypothèses pharmacophoriques. Afin de classer les caractéristiques pharmacophores importantes de l'ensemble de « training.set », une cartographie des caractéristiques a été réalisée à l'aide de DS. Cette cartographie (features) a identifié les caractéristiques suivant donneur de liaison hydrogène (HBD), accepteur de liaison hydrogène (HBA), hydrophobicité (HYD) et positif ionisable (POSI). L'algorithme HypoGen fournit le produit de « training-set », y compris leurs caractéristiques pharmacophore, le tableau III.2 affiche les paramètres statistiques des 10 meilleurs modèles hypothétiques de pharmacophore développés.

Tableau III.2. Résultats statistiques des 10 principales hypothèses pharmacophores générées par l'algorithme HypoGen

N°	R						
	Hypo	total cost	costdifference	RMSD	Training	Max Fit	Features
1	64.4325	442.8825	1.75392	0.978816	9.755	HBA, HBD, HYD, POSI	0.708
2	71.5889	435.7261	2.04057	0.97121	9.82545	HBA, HBD, HYD, POSI	0.703
3	79.3758	427.9392	2.18723	0.96697	8.83573	HBA, HYD, POSI	0.666
4	80.852	426.463	2.15619	0.968025	9.45014	HBA, HYD, POSI	0.64
5	81.3192	425.9958	2.23507	0.965501	8.99571	HBA, HYD, POSI	0.662
6	82.8255	424.4895	2.24283	0.965313	9.3281	HBA, HYD, POSI	0.663
7	83.0836	424.2314	2.26852	0.964471	9.20364	HBA, HYD, POSI	0.654

8	84.2165	423.0985	2.29676	0.963573	9.2783	HBA, HYD, POSI	0.673
9	86.3601	420.9549	2.24976	0.965268	10.0677	HBA, HYD, POSI	0.669
10	90.6081	416.7069	2.57889	0.953682	8.56158	HBD, HYD, POSI	0.715

Fixedcost= 43.3817 **nullcost**= 507.315

Parmi ces 10 modèles, il est nécessaire de sélectionner un modèle pertinent avec total cost le plus bas et plus proche de fixed cost, le cost difference la plus élevée, la valeur RMSD faible et le coefficient de corrélation (R Training) le plus élevé [9]. Selon le tableau III.2 parmi les 10 modèles de pharmacophore générés, le premier modèle (hypo 1) présentait la plus grande "difference cost" de 442.882 bits et la valeur de "total cost " était beaucoup plus proche du "fixed cost" par rapport aux autres molécules. La valeur de "difference cost" la plus élevée d'hypo 1 indique qu'il peut estimer l'activité expérimentale IC50 des composés de training avec une signification statistique supérieure à 90% (figure III.1). Ce modèle a également démontré la plus haute valeur de coefficient de corrélation de 0.978 et la plus faible variance RMSD de 1.753, ce qui indique qu'il possède une meilleure capacité à prédire le comportement expérimental des composés de "training-set".

Tableau III.3. Activité expérimental et estimée des composés de l'ensemble d'apprentissage "training.set" individuel.

Composé No°	Valeur IC50 (nM)		Les erreurs	Fit value	Echelle d'activité	
	Expérimental	Estimé			Expérimental	Estimé
1	55000	180000	+3.2	4.66	+	+
2	4200	10000	+2.4	5.91	+	+
3	1400	1500	+1	6.75	++	++
4	1200	1400	+1.2	6.75	++	++
5	1800	1200	-1.5	6.81	++	++
6	31000	12000	-2.6	5.83	+	+
7	4100	1400	-2.9	6.76	+	+
8	1700	1400	-1.2	6.76	++	++
9	2300	1100	-2.2	6.88	++	++
10	9	4.8	-1.9	9.23	++	++
11	1	2,4	+2.4	9.52	+++	+++
12	4	5.6	+1.4	9.16	++	+++
13	4	6.6	+1.6	9.09	++	+++

Echelle d'activité : +++, IC50 ≤ 1 nM (active); ++, IC50 entre 2 et 4000nM (modérément active); +, IC50>4000nM (inactive).

● PosIonisable, ● accepteur de liaison hydrogène, ● donneur de liaison hydrogène,
● hydrophobe

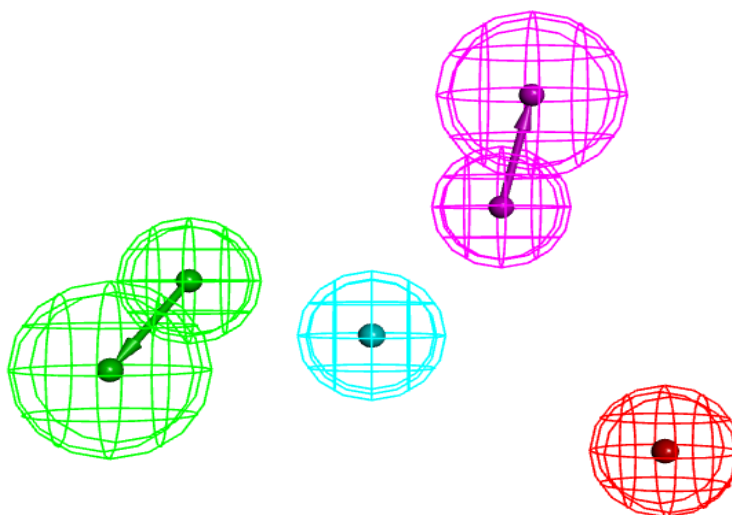


Figure.III.1 : Le meilleur modèle de pharmacophoreHypoGen, Hypo1

III.4.2. Validation du modèle pharmacophore :

Le modèle pharmacophore peut être évalué à l'aide des différentes méthodes de validation. Dans cette partie, nous avons utilisé trois méthodes de validation différentes :a) l'analyse des coûts (costanalysis) ; b) l'analyse des ensembles de test (test-set) et, c) le test de randomisation de Fischer.

III.4.2.1. L'analyse des coûts (cost analysis) :

Le paramètre de coût obtenu par l'algorithme HypoGen dans DS comprend "total cost", "fixedcost"et "nullcost" tableau III.2. Le modèle Hypo 1 (figure III.1) a une différence de coût de 442.882, un coefficient de corrélation de 0.978, et une valeur de RMSD de 1.753, selon le tableau III.1

III.4.2.2. L'analyse des ensembles de test :

Après avoir sélectionné le modèle pharmacophore (Hypo1) qui a montré des résultats positifs lors de l'analyse des couts (costanalysis). Ce modèle a été validé en utilisant 25 composés du test-set qui sont distincts des composés utilisés dans training-set (tableau III.3). en utilisant le même protocole de préparation de "training- set", l'ensemble de "test-set" a été

préparé et utilisé pour évaluer si l'hypothèse était capable de prédire l'activité de composés autres que ceux présentes dans "training- set".la valeur du coefficient de corrélation obtenue pour l'ensemble de composées de test est de $0.710 > 0.6$, tandis que pour l'ensemble de "training-set" elle est de 0.978.

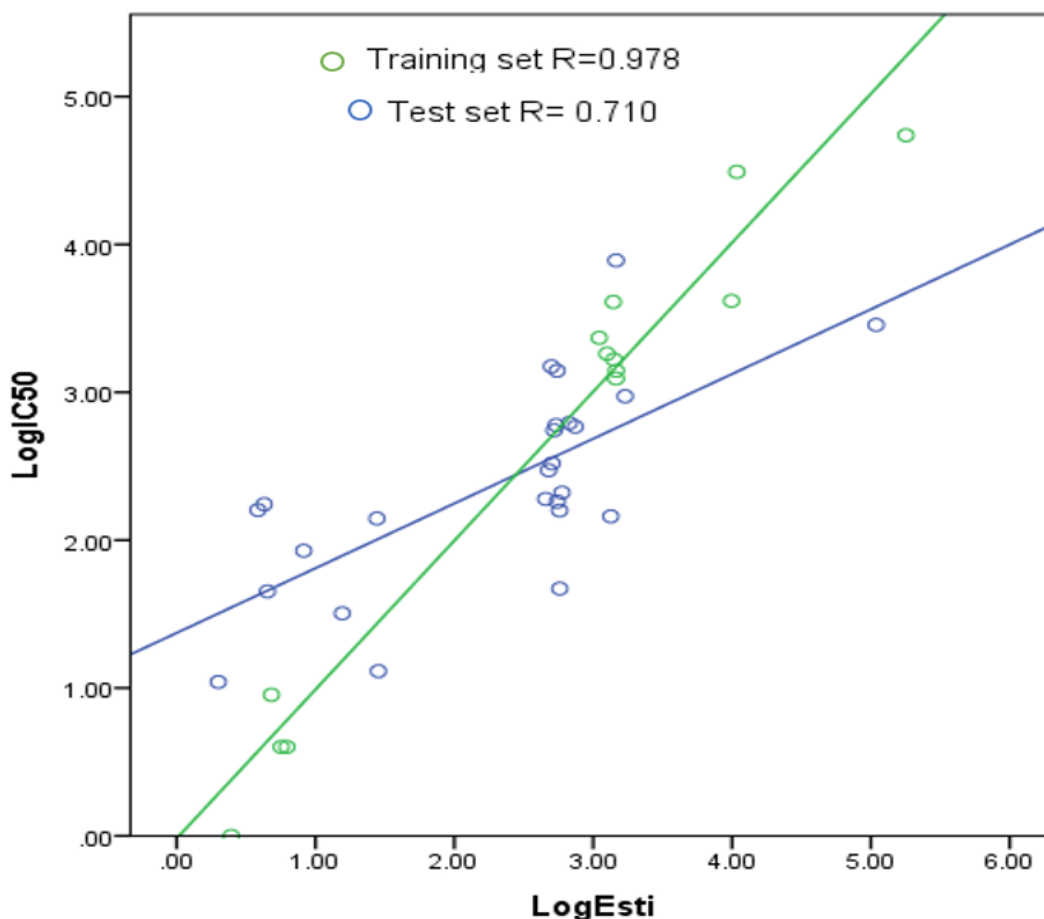


Figure.III.2 : Graphique de corrélation entre les activités expérimentales et estimées à l'échelle logarithmique pour les composés de l'ensemble d'entraînement et de test basés sur Hypo1.

III.4.2.3. Méthodes de randomisation Fischer :

Le test de randomisation de Fischer a été utilisé pour évaluer et valider l'Hypo1. Cette approche suggère que le modèle pharmacophore (Hypo1) n'a pas été créé de manière aléatoire et qu'il existe une réelle corrélation entre les comportements étudiés et les structures de "training-set". Afin de démontrer que le modèle Hypo1 n'a pas été créé par hasard à un niveau de confiance de 95%, sur un total de 19 hypothèses générées qui ont été comparées avec le pharmacophore généré d'origine (Hypo1). Nous avons constaté qu'aucun des pharmacophores générés aléatoirement n'ont obtenu la bonne valeur statistique que Hypo1 (figure III.3) [10].

Le test de randomisation de Fischer confirme ainsi que Hypo1 est statistiquement robuste et n'a pas été généré par hasard car il présente une véritable corrélation dans "training-set".

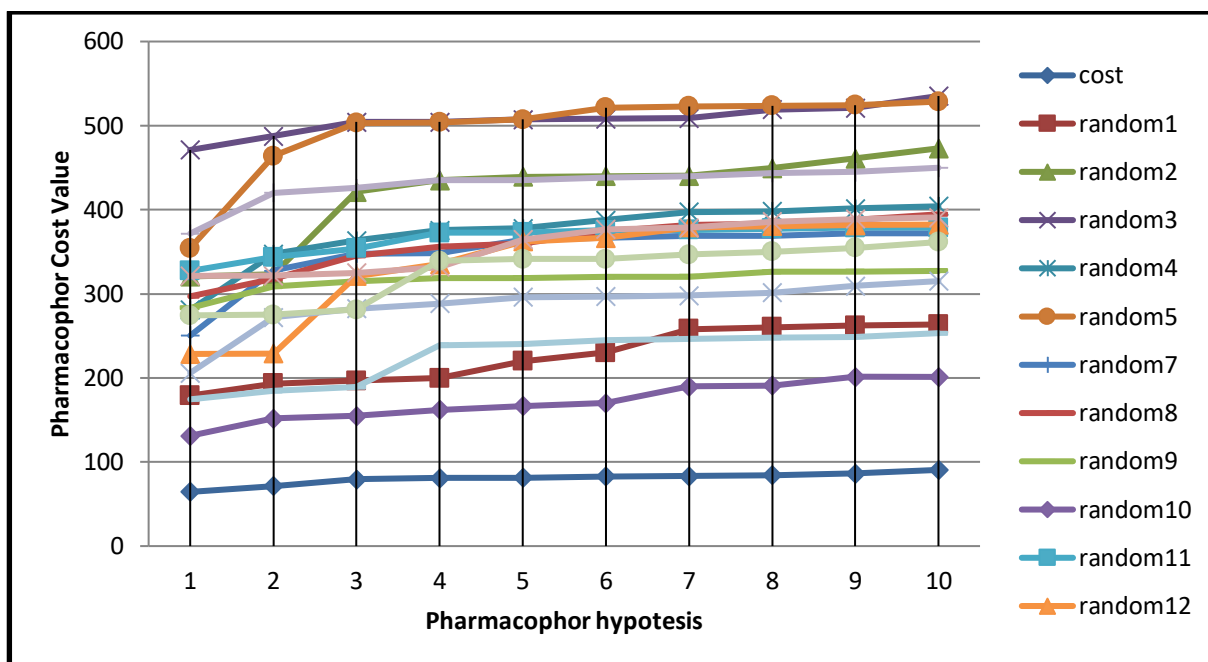


Figure III.3 : La différence de coût entre les runsHypoGen et les runsbrouillés. Le niveau de confiance de 95% a été sélectionné.

III.4.3. Criblage virtuel :

Dans cette section, nous avons réussi à appliquer avec succès une méthode de criblage virtuel afin de classifier de nouveaux composés qui améliorent la fonction des enzymes CDK4 et qui présentent une capacité d'inhibition du cancer du sein. Ainsi, nous avons procédé au téléchargement des fichiers SDF issus de la base de données NCI, qui comprennent un total de 284176 composés, comprenant à la fois des substances chimiques synthétiques et des composés naturels. Ces composés ont été principalement filtrés sur la base de la règle de Lipinski[12], des propriétés de filtration SMARTS et des propriétés ADMET prédites par les descripteurs ADMET du DS [9, 12]. La meilleure méthode de génération de conformères a été utilisée pour produire des conformères pour chaque molécule de la base de données NCI, permettant une énergie maximale de 10 kcal/mol par rapport à celle de la conformation la plus stable. Le modèle pharmacophore validé dans la section précédente a été utilisé pour filtrer l'ensemble des données. L'option Ligand PharmacophoreMapping, qui est couplée à la méthode de recherche optimale/flexible, a été utilisée pour le criblage de la base de données afin de trouver de nouveaux composés à succès qui correspondent à toutes les caractéristiques du pharmacophore. Enfin, les composés collectés ont été filtrés davantage selon le critère selon lequel les composés avaient une valeur d'activité estimée inférieure à 0,5 nM.

III.4.4. Docking moléculaire :

Dans cette partie, nous avons effectué une opération de docking moléculaire afin d'identifier les composés capables de se lier efficacement au site de liaison de l'enzyme CDK4. Le docking moléculaire génère un score pour chaque composé en fonction de l'affinité de liaison entre la protéine et le ligand formant des complexes. L'algorithme LigndFit [12] dans DS a été utilisé pour réaliser cette étude. Plusieurs structures cristallines de l'enzyme CDK4 soient disponibles dans la base de données Protein Data Bank (PDB), aucune d'entre elles n'a de ligand co-cristallisé et elles sont dans un état inactif. Dans cette étude, un modèle hybride de l'enzyme CDK4 construit par Shafiq et al. [13] a été utilisé pour l'étude de docking moléculaire [14]. Le site actif a été défini en utilisant le module "Define active site from receptor" in DS.

Parmi les sept molécules sélectionnées lors du processus de criblage virtuel, nous avons identifié deux composés (à partir de l'amarrage moléculaire) qui interagissent avec le site actif du récepteur CDK4. Les valeurs de score et les interactions de docking des deux meilleurs composés sont répertoriées dans le tableau III.4. Dans cette étude, nous avons toujours commencé avec les deux molécules présentant les meilleures propriétés parmi les composés précédemment étudiés. Le docking de ces composés dans le site actif de la protéine a révélé plusieurs informations intéressantes concernant les interactions qu'ils forment.

Tableau III.4 : Interaction d'amarrage de composés touchés virtuellement criblés.

Nom de composé	Groupes hydrophobes en interaction		Résidu des liaisons H	Distance de liaison H (Å)	Dock Score
Composé 1 (CAP 03438990)	HIS 281		HIS 281 : NE2	2.864	7.16
	ARG 240				
	PRO 280				
Composé 2 (CAP 03466945)	HIS 281		GLN 188 : O	1.654	32.693
	ARG 240		GLU 184 : HA	2.487	
			ASP 241 : OD	2.540	

Pour mieux visualiser et analyser le nombre et le type de liaison formant le complexe de deux composés nous avons utilisé à l'interface graphique "show 2D" du programme **BioviaDiscovery studio**

Les interactions prédites par le docking sont principalement de nature électrostatique. Parmi ces interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène sont très courantes et importantes en raison de leur force, qui se situe entre celle d'une liaison covalente et celle des forces de Van der Waals [15].

A- Etude des interactions du composé 1 :

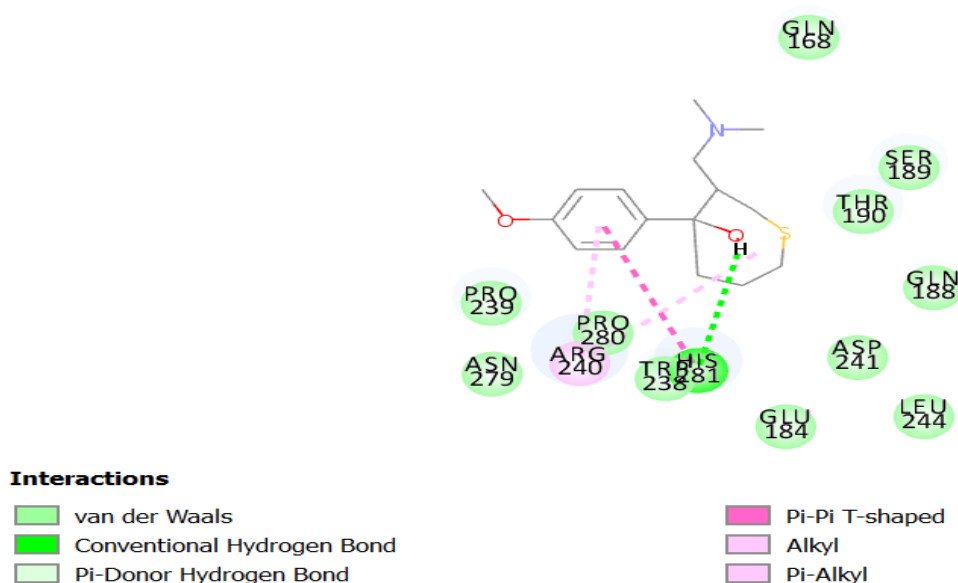


Figure III.4 : la présentation des interactions récepteur-ligand 1 en schéma 2D.

Le composé 1 forme une liaison hydrogène de type (conventional hydrogen bond) avec l'acide aminé HIS 281 comme le montre la figure III.4.

Le schéma graphique 2d indique aussi des interactions hydrophobes réalisées par les alkyles carbonés apolaires colorées en rose impliquées entre le cycle de ligand et le radical d'acide aminé ARG 240.

Une autre interaction hydrophobe nommée pi-pi T-shaped qui s'établit entre le cycle de ligand et l'acide aminé Histamine 281.

B- Etude des interactions de composé 2 :

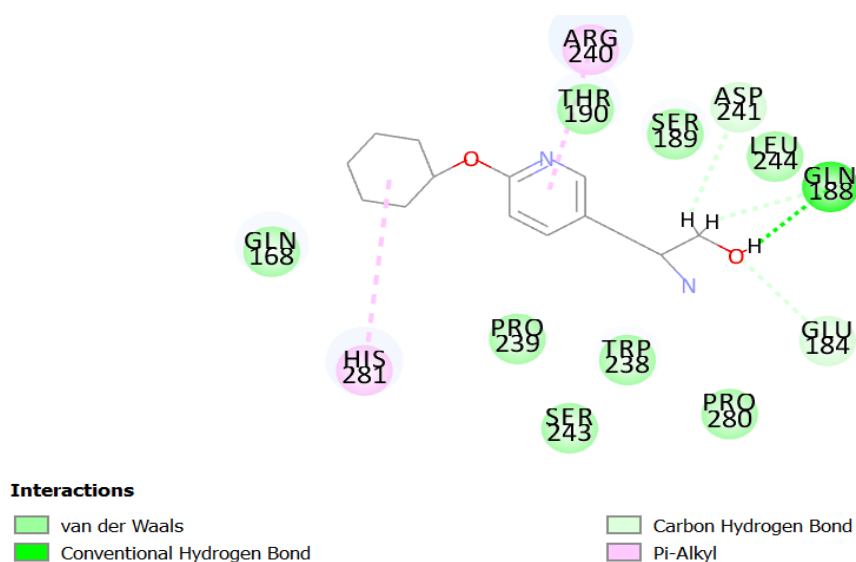


Figure III.5 : la présentation des interactions récepteur-ligand 2 en schéma 2D.

Le deuxième composé forme 4 liaisons hydrogène (l'une de type conventional hydrogen bond, les 3 autres sont de type Carbon Hydrogen bond) avec les acides aminés GLN 188, GLU 184, ASP 241 et GLN 188 respectivement.

Le schéma graphique 2D indiqué aussi en rose les interactions hydrophobes réalisées par les alkyles hydrocarbonées apolaires que nous retrouvons entre les cycles du ligand et les radicaux des aminoacides HIS 281 et ARG 240 formant des interactions Pi-alkyle.

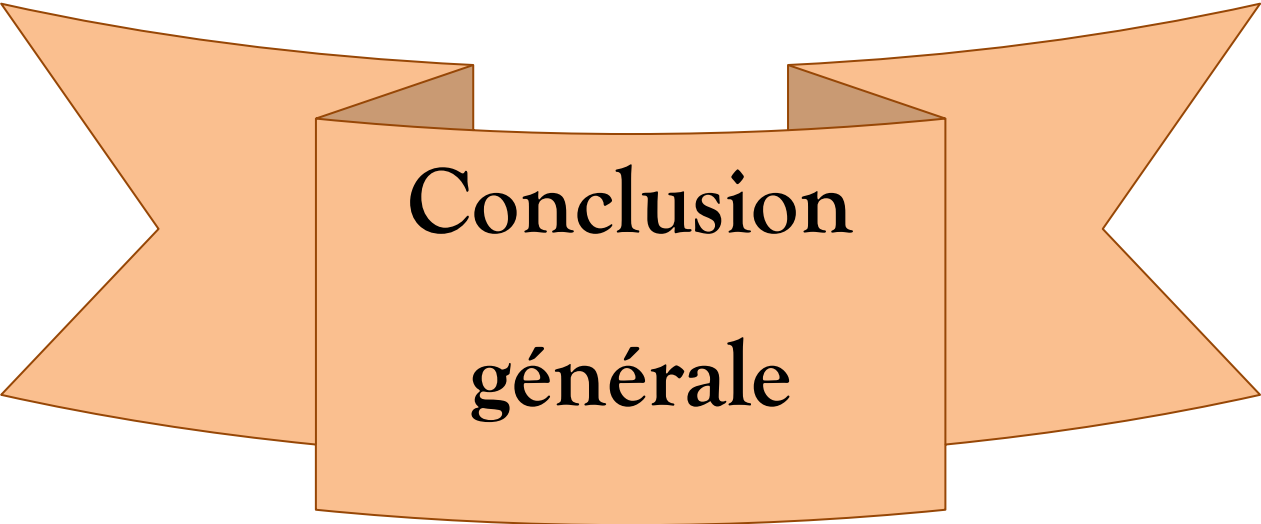
En se basant essentiellement sur les liaisons hydrogène et d'après Anne Imberty et col, les interactions ayant des distances comprises entre 2.5 Å et 3.1 Å sont considérées comme fortes, celles ayant des distances comprises entre 3.1 Å et 3.55 Å sont supposées faibles [16].

Les distances entre les résidus du site actif et les ligands composent 1, composent 2 varient entre 1.654 Å et 2.86 Å, dans ce cas on peut considérer que ces interactions sont des interactions fortes qui stabilisent les complexes formés par ces 2 ligands, et par la suite, une meilleure fixation de ces ligands au niveau du site actif.

Références

- [1]. Kubinyi, H., Folkers, G., & Martin, Y. C. (Eds.). (2006). 3D QSAR in drug design: recent advances. Book
- [2]. Barvian, M., Boschelli, D. H., Cossrow, J., Dobrusin, E., Fattaey, A., Fritsch, A., ... & Zhang, E. (2000). Pyrido [2, 3-d] pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Journal of medicinal chemistry*, 43(24), 4606-4616.
- [3]. Tropsha, A. (2010). Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Molecular informatics*, 29(6-7), 476-488.
- [4]. Studio, D. (2008). Discovery studio. *Accelrys [2.1]*.
- [5]. Rotili, D., De Luca, A., Tarantino, D., Pezzola, S., Forgione, M., Della Rocca, B. M., ... & Caccuri, A. M. (2015). Synthesis and structure–activity relationship of new cytotoxic agents targeting human glutathione-S-transferases. *European journal of medicinal chemistry*, 89, 156-171.
- [6]. Ricci, G., De Maria, F., Antonini, G., Turella, P., Bullo, A., Stella, L., ... & Caccuri, A. M. (2005). 7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases: mechanism of action of potential anticancer drugs. *Journal of biological chemistry*, 280(28), 26397-26405.
- [7]. Di Paolo, V., Fulci, C., Rotili, D., Sciarretta, F., Lucidi, A., Morozzo della Rocca, B., ... & Caccuri, A. M. (2019). Synthesis and characterisation of a new benzamide-containing nitrobenzoxadiazole as a GSTP1-1 inhibitor endowed with high stability to metabolic hydrolysis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 1131-1139.
- [8]. Panda, S. (2017). The Internet of Things: Breakthroughs in Research and Practice.
- [9]. Pradeepkiran, J. A., Kumar, K. K., Kumar, Y. N., & Bhaskar, M. (2015). Modeling, molecular dynamics, and docking assessment of transcription factor rho: a potential drug target in *Brucella melitensis* 16M. *Drug design, development and therapy*, 9, 1897.
- [10]. Pourbasheer, E., Aalizadeh, R., Ganjali, M. R., & Norouzi, P. (2014). QSAR study of $\alpha 1\beta 4$ integrin inhibitors by GA-MLR and GA-SVM methods. *Structural Chemistry*, 25, 355-370.

- [11]. Grkovic, T., Akee, R. K., Thornburg, C. C., Trinh, S. K., Britt, J. R., Harris, M. J., ... & O'Keefe, B. R. (2020). National Cancer Institute (NCI) program for natural products discovery: Rapid isolation and identification of biologically active natural products from the NCI prefractionated library. *ACS chemical biology*, 15(4), 1104-1114.
- [12]. Ponnan, P., Gupta, S., Chopra, M., Tandon, R., Baghel, A. S., Gupta, G., ... & Raj, H. G. (2013). 2D-QSAR, docking studies, and in silico ADMET prediction of polyphenolic acetates as substrates for protein acetyltransferase function of glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Scholarly Research Notices* .
- [13]. Shafiq, M. I., Steinbrecher, T., & Schmid, R. (2012). Fascaplysin as a specific inhibitor for CDK4: Insights from molecular modelling. doi: 10.1471/journal.pone.0042612.
- [14]. Federici, L., Lo Sterzo, C., Pezzola, S., Di Matteo, A., Scaloni, F., Federici, G., & Caccuri, A. M. (2009). Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol to human glutathione s-transferases. *Cancer research*, 69(20), 8025-8034.
- [15]. Brahmi, A. Bouguern, A. (2019). *Caractérisation de nouveaux inhibiteurs de la RIPK1, enzyme de la nécroptose.mémoire.*
- [16]. Imberty, A., Hardman, K. D., Carver, J. P., & Perez, S. (1991). Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin
A. Glycobiology, 1(6), 631-642.



**Conclusion
générale**

CONCLUSION GENERALE

Le cancer du sein demeure la principale cause de décès chez les femmes à travers le monde, ce qui en fait un problème de santé publique majeur. Les CDK4 jouent un rôle dans le développement de cette maladie. Dans le but d'atteindre cet objectif, nous avons mis en place des flux de travail informatiques sophistiqués basés sur les ligands et la structure afin d'explorer les caractéristiques structurelles requises pour une inhibition puissante de CDK4 à l'aide de 38 inhibiteurs différents.

Dans le cadre de cette étude, un modèle pharmacophore 3D-QSAR a été créé. Parmi les 10 autres pharmacophores générés, le meilleur modèle pharmacophore quantitatif (Hypo1) a été sélectionné. Le modèle Hypo1 a été utilisé comme une requête 3D pour effectuer un criblage virtuel de 284176 molécules médicamenteuses à partir de la base de données NCI. En appliquant des paramètres sélectifs, le nombre de molécules a été réduit à 114 hits, qui ont été ancrés aux sites actifs de CDK4 en utilisant le protocole Ligand Fit sur DS. Finalement, deux Hits ont été sélectionnés en se basant sur l'interaction moléculaire, la structure et l'évaluation globale.

En termes de perspectives futures, cette étude pourrait être complétée et prolongée par des études expérimentales *in vitro* et/ou *in vivo* afin de valider nos résultats théoriques et de vérifier l'efficacité de l'approche *in silico*. Cela permettrait de renforcer la fiabilité et la pertinence de notre approche et d'évaluer concrètement son application potentielle dans un contexte réel.