



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

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Réf. : Entrez la référence du document

---

Présenté et soutenu par :  
***BEN AICHA Chahira et BOUDJELAL Hayet***

Le : mercredi 26 juin 2019

### ***Etudes Pharmacocinétique Et Docking Moléculaire Des Inhibiteurs De La BRD4***

---

#### **Jury :**

Mme	<b><i>ZEKRI. Afaf</i></b>	M.A.A	<b><i>Université Med Khider de Biskra</i></b>	<b><i>Présidente</i></b>
Dr	<b><i>OUASSAF. Mebarka</i></b>	M.C.B	<b><i>Université Med Khider de Biskra</i></b>	<b><i>Rapporteur</i></b>
Dr	<b><i>YOUCEF. Oum Hani</i></b>	M.C.B	<b><i>Université Med Khider de Biskra</i></b>	<b><i>Examinatrice</i></b>

Année universitaire : 2018 - 2019



# *Remerciement*

Nous tenons tout d'abord à remercier « ALLAH », qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail .

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur madame : ***OUASSAF.Mebarka*** , pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'orientation, la confiance, la patience et le temps qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions .

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail .



# *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à :*  
*Mes très chers parents, je les remercie pour leur soutien sans*  
*faillite depuis*  
*toujours, leur contribution a été essentielle ;*  
*Mon frère : Fares ;*  
*Mes soeurs : Feryel, Nawel, Nour Elhouda ;*  
*Toute ma grande famille ;*  
*Ma chère binôme « Boudjelal Hayet » et à toute sa famille.*  
*Tous mes amis (es).*

## *Chahira*

*Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de plusieurs*  
*Années d'étude à :*  
*Mes chers et respectueux parents en récompense*  
*de leurs sacrifices et leur*  
*clairvoyance qui m'a servi et me servirait tout*  
*au long de ma vie ;*  
*Mon chère soeur : Souada ;*  
*Mes chers frères : Abd Elhalim, Chouaib, Saber Et Oday ;*  
*Ma chère binôme « Ben Aicha Chahira » et à toute sa famille ;*  
*Tous mes amis (es).*

## *Hayet*

## *Liste des abréviations*

**ADMET** : (absorption, distribution, métabolisme, élimination/ Ttox).

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**AHR** : Aryle hydrocarboné récepteur.

**BD1 /BD2**: tandems bromodomain.

**BD** : Becton Dickinson.

**BET** : bromodomaine et extra-terminales.

**BRD4** : protéine 4 contenant du bromodomaine.

**BRD** : bromodomain.

**BRDT** : BrdT domaine.

**ET** : extra-terminal.

**Fshrg4**: gène 4 homéotique stérile chez la femme.

**G1** : phase G1 (gap) ou intervalle 1 du cycle cellulaire.

**G2** : phase G2 (gap2) ou second intervalle du cycle cellulaire.

**GCN5** : contrôle général de la protéine de synthèse d'acides aminés 5.

**GFP** : Protéine Fluorescente Verte.

**H** : histone.

**IPP** : inhibiteurs de la pompe à protons.

**KAC**: acétylation de la lysine.

**LANA-1** : Anti gène nucléaire 1 associé à la latence.

**MM** : mécanique moléculaire.

**MVD** : Le Molegro Virtuel Docker.

---

**NUT** : protéine nucléaire dans les testicules.

**P-gp** : P-glycoprotéine .

**P/CAF** : facteur associé à la protéine de liaison p300/CREB.

**PHD** : protéine homeodomain.

**RNA POLII**: RNA polymérase II

**SPA-1**: protéine associée à la prolifération induite par le signal.

**SWI/SNF** : Switch/Sucrose Non Fermentable.

**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine.

# Table des matières

<b>Remerciement</b>	<b>ii</b>
<b>Dédicace</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matière</b>	<b>ix</b>
<b>Table des figures</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xiii</b>
<b>Introduction Générale</b>	<b>1</b>
<b>1 Généralités sur les proteines BET bromodomaines</b>	<b>4</b>
1.1 Introduction . . . . .	4
1.2 Les familles de protéines BET . . . . .	5
1.2.1 Caractéristiques de la structure des protéines BET . . . . .	5
1.3 Le protéine 4 contenant bromodomaine (BRD4) . . . . .	9
1.3.1 Définition . . . . .	9
1.3.2 Structure de BRD4 . . . . .	9
1.3.3 Le site active de (BRD4) . . . . .	12
1.3.4 Le rôle de BRD4 . . . . .	12
1.4 Bromodomaine (BRD4) : lecteurs de résidus d'acétyle-lysine . . . . .	14

---

1.5	Fonction biologie de la BRD4 . . . . .	17
1.5.1	Rôle de BRD4 dans la progression du cycle cellulaire .	17
1.5.2	Bromodomaine et orchestration ou remodelage de la chromatine . . . . .	18
1.5.3	Fonction des protéines bromodomaine humaine . . . .	19
<b>2</b>	<b>la pharmacocinétique et docking moléculaire</b>	<b>22</b>
2.1	Introduction . . . . .	22
2.2	La pharmacocinétique d'un médicament . . . . .	23
2.2.1	Absorption . . . . .	24
2.2.1.1	Transport passif . . . . .	24
2.2.1.2	Transport actif . . . . .	25
2.2.1.3	Transport facilité . . . . .	25
2.2.2	Distribution . . . . .	25
2.2.2.1	Fixation aux protéines plasmatiques . . . . .	26
2.2.2.2	Diffusion tissulaire . . . . .	27
2.2.3	Le métabolisme . . . . .	27
2.2.3.1	Les réactions de phases I . . . . .	28
2.2.3.2	Les réactions de phases II . . . . .	30
2.2.4	Élimination . . . . .	30
2.2.4.1	Élimination hépatique . . . . .	31
2.2.4.2	Élimination rénale . . . . .	31
2.2.5	Notion pharmacocinétique et formule calcule . . . . .	32
2.2.5.1	Biodisponibilité . . . . .	32
2.2.5.2	Volume de distribution . . . . .	33
2.2.5.3	Clairance d'élimination . . . . .	34
2.2.5.4	La demi-vie . . . . .	35
2.2.6	Mécanismes généraux de la toxicité . . . . .	35
2.3	Docking moléculaire . . . . .	36

---

2.3.1	Le récepteur . . . . .	37
2.3.2	Le(s) ligand(s) . . . . .	38
2.3.3	Les simulations de docking . . . . .	39
2.3.3.1	Principes théoriques . . . . .	39
2.3.3.2	Algorithmes de docking . . . . .	40
2.3.3.3	Choix de logiciel de MolDock (MVD) . . . . .	42
2.3.3.4	Protocole général de docking . . . . .	42
2.3.4	Interaction protéine-ligand . . . . .	43
2.3.4.1	Les interactions électrostatiques . . . . .	44
2.3.4.2	La liaison hydrogène . . . . .	44
2.3.4.3	Les interactions de Van Der Walls . . . . .	45
2.3.4.4	Les interactions hydrophobes . . . . .	46
<b>3</b>	<b>Méthodes de calculs et résultats et discussions</b>	<b>47</b>
3.1	Introduction . . . . .	47
3.2	Matériels et méthodes . . . . .	49
3.2.1	Matériels . . . . .	49
3.2.2	Méthodes . . . . .	51
3.2.2.1	Étude de docking moléculaire . . . . .	51
3.2.2.2	Évaluation de la ressemblance d'un médicament (drug likeness) . . . . .	57
3.2.2.3	ADMET (absorption, distribution, métabolisme, élimination) . . . . .	57
3.2.3	Résultats et discussion . . . . .	58
3.2.3.1	Résultats du docking moléculaire . . . . .	58
3.2.3.2	Analyse virtuelle des interactions . . . . .	67
3.2.3.3	Règle de Lipinski : . . . . .	74

---

3.2.3.4	Étude les propriétés physico-chimiques des molécules sélectionnés (drug-likeness prediction) . . . . .	77
3.2.3.5	ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination) . . . . .	80
3.2.3.6	Études de prévision de la toxicomanie . . . . .	85
3.2.3.7	Score de bioactivité . . . . .	87
	<b>Conclusion générale</b>	<b>89</b>
	<b>Bibiographie</b>	<b>106</b>

# Table des figures

1.1	Sites de modification post-traductionnels cruciaux et principales caractéristiques des protéines BET et Structure des protéines BET . . . . .	8
1.2	l'organisation de domaine du long BRD4 . séquences conservées de BRD4 BD1et BRD4 BD2 . . . . .	11
1.3	(d) les inhibiteurs de bromodomaine BET 1 , 2 , BI2536 ( 12 ) et BI6727 ( 13 ). (e) Membres de la branche BET de l'arbre phylogenetique bromodomaine. . . . .	16
2.1	Les principales étapes de la pharmacocinétique . . . . .	24
2.2	Les étapes de la phase I,II . . . . .	28
2.3	la réaction de phase I . . . . .	29
2.4	Classification des cytochromes . . . . .	29
2.5	la réaction de phase II . . . . .	30
2.6	Principe général d'un programme de docking . . . . .	40
2.7	Protocole général de docking . . . . .	43
2.8	Interactions électrostatiques . . . . .	44
2.9	liaison hydrogène . . . . .	45
2.10	Interactions de Van Der Walls . . . . .	45
2.11	Interactions hydrophobes . . . . .	46
3.1	Structure de la protéine contenant de bromodomaine 4 . . . . .	52

---

3.2	<b>structure générale de molécule de base</b> . . . . .	53
3.3	Interface graphique de cavité 1 par MolDock . . . . .	56
3.4	la structure de composé L7 . . . . .	60
3.5	la structure de composé L9 . . . . .	61
3.6	la structure de composé L18 . . . . .	62
3.7	la structure de composé L19 . . . . .	63
3.8	la structure de composé L23 . . . . .	64
3.9	la structure de composé L27 . . . . .	65
3.10	la structure de composé Lréf . . . . .	66
3.11	Interactions entre 6e4a et CN750 . . . . .	68
3.12	Interactions entre 6e4a et Ligand 7 . . . . .	69
3.13	Interactions entre 6e4a et ligand 9 . . . . .	70
3.14	Interactions entre 6e4a et Ligand 18 . . . . .	71
3.15	Interactions entre 6e4a et ligand 19 . . . . .	72
3.16	Interactions entre 6e4a et ligand 23 . . . . .	73
3.17	Interactions entre 6e4a –ligand 27 . . . . .	74
3.18	Les diagrammes du résultats du modèles drug likeness . . . . .	80

# Liste des tableaux

2.1	La liaison médicament-protéine plasmatique dépend de la nature du médicament . . . . .	26
3.1	Les substitution des composés du série bioactive . . . . .	53
3.2	les cavités détectées avec l'algorithme de détection de MVD pour 6E 4A . . . . .	55
3.3	Résultats de docking moléculaire des ligands avec la cavité 1de 6e4a . . . . .	58
3.4	Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L7 . . . . .	61
3.5	Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L9 . . . . .	62
3.6	Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L18 . . . . .	63
3.7	Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L19 . . . . .	64
3.8	Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L23 . . . . .	65
3.9	Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L27 . . . . .	66
3.10	Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand Lréf . . . . .	67

---

3.11 les paramètres de Lipinski des dérivés de quinazoline . . . . .	76
3.12 Propriété physicochimique de base des ligands de test et ligand référence . . . . .	78
3.13 L'ADME profile des ligands de test et ligand référence . . . . .	80
3.14 Profil la toxicité des ligands à tester . . . . .	85
3.15 Score de bioactivité des ligands et ligand référence . . . . .	88

# Introduction Générale

*L'ordinateur parfait a été inventé :  
on entre un problème et il n'en ressort jamais !*

*Al Goodman*

Au cours de la dernière décennie, d'importants progrès thérapeutiques ont été réalisés. La chimiothérapie conventionnelle agit sans différenciation sur les cellules à division rapide des tissus normaux et sur les cellules tumorales. Cette absence de spécificité est à l'origine de nombreux effets indésirables, contrairement aux thérapies ciblées, où une plus grande spécificité d'action est observée envers les cellules tumorales et permet d'obtenir des index thérapeutiques plus larges et par conséquent, une moindre toxicité . [87] Ces dernières sont actuellement en plein essor en oncologie et leurs indications s'étendent rapidement . [20] Le cancer correspond à la multiplication anarchique de cellules anormales qui échappent au mécanisme de contrôle cellulaire. Ces cellules prolifèrent pour former une masse tissulaire appelée tumeur qui envahit les tissus normaux avoisinant ; d'où la malignité.[14]

BRD4 est un lecteur épigénétique fortement impliqué dans le développement de différents cancers en permettant la prolifération des cellules tumorales.[4, 141, 122, 60] Même si les autres protéines de la famille BET régulent aussi la transcription, mon projet met l'accent sur BRD4 puis qu'il est le membre de la famille BET le plus caractérisé et décrit comme étant impliqué dans le cancer. [66]

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre les molécules. De même, la découverte de nouvelles molécules activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom "docking", ont été développées. [21]

Le docking moléculaire est une méthode qui prédit la conformation (position et orientation relatives) la plus favorable de deux molécules en interaction et formant un complexe stable. La connaissance de cette conformation préférentielle permet par la suite l'estimation de la force d'association (affinité de liaison) entre ces deux molécules. [8]

Au cours de la recherche et du développement des nouveaux médicaments, il faut tenir compte de tous les processus que le nouveau médicament ( dans une formulation spécifique ) subira après administration aux patients. La discipline qui étudie les processus d'ADME est la Pharmacocinétique : elle s'occupe de décrire le devenir d'un médicament au cours du temps, à Travers le suivi de sa concentration dans l'organisme, depuis son administration jusqu'à son élimination. [39]

Drug-likeness peut être défini comme un équilibre complexe des diverses propriétés moléculaires et les caractéristiques qui déterminent si la structure de la molécule particulière est similaire a des médicaments connus. Notre approche est basée sur une liste de près de 5300 fragments infrastructure distincte avec les grand nombre du drug-likeness associés. Le drug-likeness est calculé avec une équation mathématique. [115] L'objectif de notre travail est de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de la protéine 4contenant bromodomaine en faisant appel aux approches de modélisation des interactions enzyme inhibiteur par docking moléculaire dans les mala-

dies du cancer. Ces méthodes permettent de rechercher *in silico* le mode d'interaction le plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur (cible thérapeutique) ce qui aide à la prédiction de molécules en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser celles-ci. Le premier chapitre est présenté sous forme généralité sur la protéine 4 contenant bromodomain.

Le deuxième chapitre concernera les méthodes *in silico*. L'étude pharmacocinétique et les études de docking seront particulièrement détaillés. Nous décrirons comment ces deux approches peuvent guider l'élaboration de molécules susceptibles de présenter des meilleures affinités pour une cible donnée.

Dans le troisième chapitre, nous avons présenté les résultats de l'étude de l'interaction entre Le protéine 4 contenant bromodomain et des dérivés quinazoline par le programme Le Molegro Virtuel Docker (MVD) v.1.4.5. Pour cette étude, on s'intéresse à déterminer le mode d'interaction du complexe pour la fixation des différents inhibiteurs de cette enzyme, avec une meilleure complémentarité et en calculant l'énergie d'interaction du complexe formé. Le complexe qui a l'énergie d'interaction la plus faible présentera une meilleure activité et par la suite une meilleure inhibition. Nous présenterons également un étude (ADME/Ttox ) et drug-likeness pour les composés sélectionnés.

# Chapitre 1

## Généralités sur les proteines

### BET bromodomaines

*"At the bottom of a hole or well,  
sometimes we see the stars."*

*Aristote*

#### 1.1 Introduction

Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseur cellulaire. Elles sont constituées des milliers d'acides aminés liés en une chaîne linéaire. Ces acides aminés diffèrent dans leur nature chimique, sont liés entre eux par des liens covalents appelés liens peptidiques. Un catalyseur est une substance qui modifie la vitesse d'une réaction chimique mais qui se retrouve inchangée à la fin de la réaction. En termes plus techniques, Un catalyseur est une substance qui abaisse l'énergie d'activation d'une réaction chimique.[29]

Les protéines BET (bromodomaines et extra-terminales) sont une sous-famille de protéines contenant des bromodomaines consistant en Brd2, -3, -4 et -T, qui contiennent chacune des bromodomaines en tandem, un motif extra-terminal et, dans le cas de Brd4, un domaine d'interaction protéine-

protéine C-terminal. Les protéines BET ont suscité un intérêt clinique croissant en raison de leur rôle important dans la santé et la maladie humaines. [85]

BRD4, une protéine liant la chromatine, a été identifiée pour la première fois comme un signet mitotique et impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire . [24]

Depuis sa description originale, la BRD4 est devenue un sujet d'intérêt considérable en tant que cible thérapeutique potentielle à la fois pour le cancer et les maladies auto-immunes.[147]

## **1.2 Les familles de protéines BET**

La famille BET comprend quatre membres mammifères, dont BRD contenant 2 (BRD2), BRD3, BRD4 et BRDT, qui présentent tous deux de hauts niveaux de conservation de la séquence et un recrutement C-terminal plus divergent .[79] De plus, des protéines de la famille BET ont été identifiées dans des réarrangements oncogènes, conduisant à des protéines de fusion hautement oncogènes, et jouent donc un rôle clé dans le développement de plusieurs types de cancer. Cependant, on ne sait toujours pas pourquoi seul un sous-ensemble de cellules provenant de divers types de cancer répond aux inhibiteurs de BET .[123]

### **1.2.1 Caractéristiques de la structure des protéines BET**

Les protéines de la famille BET se localisent toutes dans le noyau et contiennent deux tandems BRDN-terminaux, un domaine extra-terminal (ET) et un domaine de recrutement C-terminal plus divergent, qui présentent tous des niveaux élevés de conservation de séquence. L'analyse d'ho-

logrammes dérivés regroupe huit familles principales de BRD humaines sur 61 BRD humaines, dans lesquelles la famille BET appartient à la sous-famille II .[5]

L'analyse structurale par les BRD de la reconnaissance des peptides acétylés par la lysine dans les histones permet de mieux comprendre les caractéristiques et les différences de sélectivité de la liaison du ligand biologique. Non seulement dans la famille BET, mais dans toutes les BRD, il est probable qu'un ancrage de liaison hydrogène KAC par un résidu d'asparagine conservé ait pour rôle principal de se lier aux résidus KAC .[36]

En outre, le repli de la BRD conservée contient un site de liaison à l'acétyl-lysine profond et en grande partie hydrophobe, composé d'environ 110 acides aminés. Les BRD contiennent 4 hélices  $\alpha Z$ ,  $\alpha A$ ,  $\alpha B$  et  $\alpha C$ , qui forment un faisceau caractéristique antiparallèle à quatre hélices, liées par deux régions de boucle différentes, les boucles ZA et BC .[13] L'hélice  $\alpha Z$  est flanquée d'une région de séquence diverse, dont les inserts sont généralement suivies d'un court segment hélicoïdal dans la boucle ZA.

Le motif conservé suit la séquence générique  $\Phi 1 X 1 X 2 (X 3 ) 2 X 3 X 4 X 5 (X 6) 3$  , comme représentant des résidus hydrophobes, le domaine N-terminal des membres de la famille BET présente spécifiquement des insertions en X .[36] À une extrémité, les extrémités N et C se rejoignent, soulignant l'architecture modulaire de ce domaine et soulignant l'idée que le BRD pourrait jouer le rôle d'unité fonctionnelle pour les IPP. À l'extrémité opposée, la boucle ZA se loge contre la boucle BC, formant une cavité hydrophobe profonde et centrale reconnaissant les épitopes d'acétyl-lysine . [144]

Des structures Co-cristallines à haute résolution ont montré que la première marque de lysine acétylée de l'histone H4 se fixe directement sur l'asparagine conservée. La phénylalanine résiduelle conservée dans les BRD profondément enfoncée dans l'hélice  $\alpha C$  stabilise le segment hélicoïdal C-terminal,

tandis que trois résidus de proline conservés que les ports de boucle ZA peuvent se tasser de manière à former des résidus hydrophobes dans un C stabilisant la conformation de la boucle .

Simultanément, comme la plupart des protéines BRD, la cristallographie aux rayons X vérifie que les BD1 de BRD2, 3 et 4 ont une isoleucine à la position analogue au résidu 162 dans BRD2. Ce résidu « gate keeper », dont la taille varie dans la famille des BRD, contrôle l'accès à une région lipophile comprenant une séquence tryptophane-proline-phénylalanine (étagère WPF) présente dans un certain nombre de BRD .[110] Dans BRD2, BRD3 et BRD4, l'affinité entre la queue H4 et différentes BRD variait, par exemple, BRD4 (1) semblait reconnaître spécifiquement plusieurs marques trouvées sur la queue H4, tandis que BRD4 (2) interagissait avec des combinaisons de deux et trois lysines acétylées. Cependant, des études indiquent que la BRDT nécessite deux résidus de KAC pour une liaison de haute affinité. L'importance de cette étagère a également été soulignée dans BRDT, dans lequel une queue d'histone H4 di-acétylée pour BRDT-BD1 et un deuxième KAC en position 8 se trouvent à travers l'étagère WPF, ce qui a entraîné une augmentation de l'affinité de liaison .[110]

BRD distinguer les différents partenaires de liaison protéiques , car ils maintiennent la diversité de séquence dans les régions de boucle ZA et BC, se liant à des résidus voisins KAC dans la protéine cible ou le peptide. [104] (figure1.1 )

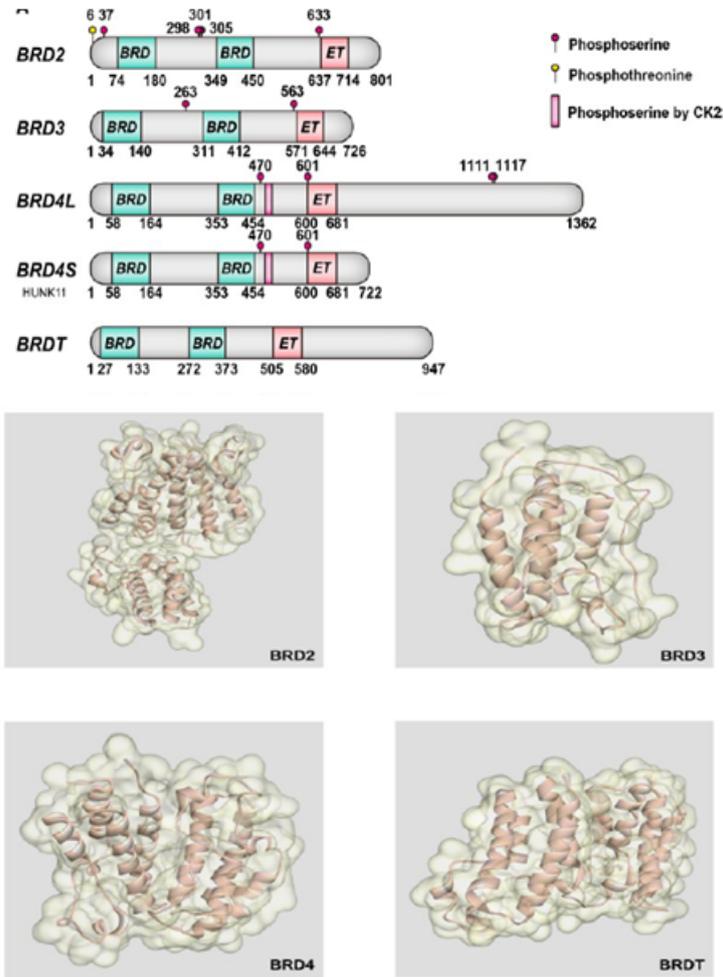


FIGURE 1.1: Sites de modification post-traductionnels cruciaux et principales caractéristiques des protéines BET et Structure des protéines BET

## **1.3 Le protéine 4 contenant bromodomaine (BRD4)**

### **1.3.1 Définition**

La protéine 4 contenant des bromodomains (BRD4) est une protéine nucléaire qui contient deux bromodomains (BD1 et BD2) .[139]

BRD4 interagit avec les lysines acétylées, mais la combinaison exacte de queues d'histones modifiées requises pour recruter BRD4 dans les gènes cibles est inconnue. Par exemple, des tests in vitro indiquent que la liaison de BRD4 peut être supportée par l'histone 3 (H3) diacétylée au niveau des lysines K9 / 14 et par l'histone 4 diacétylée (H4) au niveau des lysines K5 / 12, ainsi que par le H4K5 tétraacétylé. / 8/12/16 peptides. [25]

### **1.3.2 Structure de BRD4**

BRD4, appelée à l'origine Fshrg4 ou Hunk1, a été identifiée en 1988 à partir d'études sur le complexe médiateur mammifère, un Co-activateur multi protéique liant les facteurs de transcription à l'activation de l'ARN Pol II. [58]

Il a trois iso-formes de longueur différente : une longue iso-forme (1362 résidus) et deux formes plus courtes (respectivement 722 et 796 résidus).

BRD4 contient deux N-terminale hautement conservée bromodomains (BD1 et BD2), un domaine ET, et un domaine C-terminal (CTD) (figure 1.2a).

BRD4 BD1 et BRD4 BD2 interagissent avec la chromatine acétylée ainsi que des protéines non histones pour réguler la transcription, la réplication de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et d'autres activités cellulaires. [139]

Malgré leur similarité de séquence (figure 1.2 b), BD1 et BD2 semblent avoir fonctions distinctes raison de leur interaction avec différents histones acétylées-lysine (par exemple, H3 et H4) ou avec protéines transcription. BRD4 BD1 se lie à la marque H4K5AcK8Ac di-acétylée pour ancrer ses protéines associées aux sites promoteurs et activateurs du gène cible dans la chromatine. BRD4 BD2 n'interagit pas avec H3K4ac acétylé séparément, mais présente une interaction forte avec H3K4AcK9Ac di-acétylé.[36] En outre, BRD4 BD2 est associé au recrutement de protéines non histones (par exemple, Twist). [124] Chaque BD de BRD4 est composé d'un faisceau pour la gauche de quatre hélices ( $\alpha Z$ ,  $\alpha A$ ,  $\alpha B$ , et  $\alpha C$ ) reliés par la boucle inter hélicoïdale ZA et la boucle BC, qui constituent la poche de liaison acétyle-lysine active ( Figure 1.2 c ).[36] Les résidus spécifiques ( par exemple, Gln85 de BD1 vs Lys383 de BD2, et Asp144 de BD1 vs His442 de BD2, mis en évidence par des couleurs différentes dans la Figure 1.2 b ) dans les boucles de chaque BD contribuent à la détermination de la spécificité de liaison acétyle-lysine .

La structure corystes de BRD4 BD1 avec H4K8Ac12Ac histone ( figure 1.2 c ) indique que l'acétyle-lysine est reconnue par une cavité hydrophobe centrale et ancrée par une liaison hydrogène avec le résidu d'asparagine 140 (Asn140) . [135] De plus , une seconde interaction est formée entre l'atome d'oxygène d'acétyle-carbonyle et le Tyr97 conservé via une molécule d'eau.

La plupart des inhibiteurs de BRD4 bloquent les interactions entre BRD4 et l'acétyle-lysine en imitant l'acétyle-lysine et en lui faisant concurrence pour la liaison de BRD4.

Ils ont tous un fragment de tête unique qui peut former des liaisons hydrogène critiques avec Asn140 et Tyr 97, comme le fait l'atome O du groupe acétyle. De plus, un petit groupe hydrophobe est habituellement attaché à la fraction qui peut imiter le groupe méthyle de l'acétyle pour occuper la base de la poche.

Parallèlement, leurs interactions avec le «plateau WPF» (W81, P82, F83),

une région hydrophobe de la boucle BC qui comprend le motif Trp / Pro / Phe conservé présent dans tous les bromodomaines de la famille BET, sont également importantes pour les affinités de liaison à BRD4. [16]

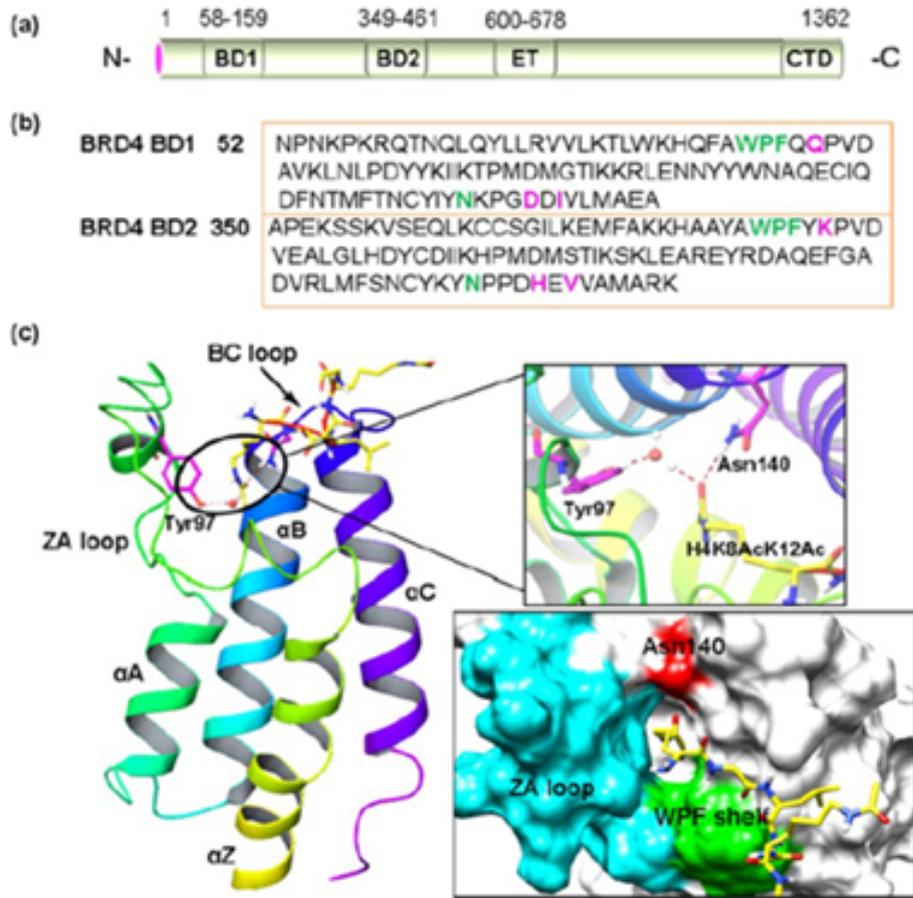


FIGURE 1.2: l'organisation de domaine du long BRD4 . séquences conservées de BRD4 BD1et BRD4 BD2 .

les résidus critiques importants qui peuvent contribuer à la spécificité de la liaison Acétyle -lysine sont mis en évidence dans différentes couleurs. (Panneau de gauche) ruban . représentation de BRD4 BD1 (panneau droite) représentation de surface de la liaison de BRD4 BD1 . Asn140 est surlignée en rouge , et l'étagère WPF est surlignée en vert .

### **1.3.3 Le site active de (BRD4)**

Dalluin et al, et Hudson et al, ont montré que les bromodomaines sont capables d'une interaction faible mais très spécifique à des peptides acétylés dérivés des sites majeurs d'acétylation des histones H3 et H4 .[26, 55]

L'analyse structurale du bromodomaine de P/CAF en complexe avec un analogue de lysine acétylée a montré que son site de liaison est localisé sur la cavité hydrophobe entre les boucles ZA et BC.

Les interactions entre le bromodomaine et l'analogue sont de nature largement hydrophobe et font intervenir des résidus largement conservés. Des études de mutagénèses dirigées sur les résidus en contact avec les lysines acétylées visualisées en cristallographie ont confirmé leur importance dans cette liaison, suggérant que le principal rôle des bromodomaines est cette reconnaissance à la lysine acétylée.

Mais il existe une régulation dans cette reconnaissance et chaque bromodomaine ne reconnaît pas toutes les lysines acétylées. On peut citer comme exemple l'étude de Mujtaba et al qui montre que la liaison entre le bromodomaine de P/CAF et la lysine acétylée K50 d'un peptide Tat est trente fois plus forte que celle avec un peptide H4 acétylé sur sa lysine 16. [97]

En règle générale les différences d'affinité des bromodomaines envers différents ligand acétylés peuvent être expliquées par des différences subtiles dans les séquences primaires des différents bromodomaines.

### **1.3.4 Le rôle de BRD4**

BRD4 est une protéine nucléaire largement exprimée dans les tissus de mammifères, et son expression est induite par la stimulation de mitogène au cours de la G0 /g1 transition dans les lymphocytes, avant l'entrée dans la phase S . [24]

BRD4 localisée dans les noyaux entiers pendant l'interphase devient ex-

clusivement associée à des chromosomes pendant la phase M alors que la plupart des facteurs de réglementation nucléaire sont libérés dans le cytoplasme en réponse à l'arrêt global de la transcription. [24]

De plus, la micro-injection d'un anticorps anti-BRD4 dans les noyaux des cellules H La inhibe complètement l'entrée en mitose, ce qui suggère que BRD4 joue un rôle dans G2/M transition .[24]

Dans une technique de fluorescence perte de photo blanchiment (FLIP), une zone à l'intérieur des cellules vivantes est blanchie de manière répétée, et la perte de fluorescence dans des zones distinctes de la zone blanchie est surveillée. [107, 108] Le taux de perte de signal de fluorescence est fonction de la mobilité d'une protéine, et est diminuée en protéines mobiles lents .

Des essais FLIP utilisant P19 cellules de carcinome embryonnaires transmettes avec BRD4 marqué GFP montrent que GFP-BRD4 fluorescence se perd plus lentement en présence de tri-châtaïne A (TSA), qui est un inhibiteur de l'histone dé-acétylas, ce qui suggère l'affinité de BRD4 pour chromatine est augmenté de acétylation des histones .[25]

En outre, les mutations introduites dans BRD4 bromodomaines conduisent à une plus grande perte rapide d'un signal de fluorescence en présence de TSA, ce qui suggère que bromodomaines interagissent de préférence avec histones acétylées . [25]

Ces conclusions indiquent collectivement que BRD4 est associée à la chromatine et des chromosomes au cours du cycle cellulaire, en interagissant avec les histones acétylées par ses bromodomaines, et est nécessaire pour la progression du cycle cellulaire.

## 1.4 Bromodomaine (BRD4) : lecteurs de résidus d'acétyle-lysine

Les modules de bromodomaine sont des domaines essentiels de reconnaissance des protéines pour la régulation transcriptionnelle .

Les bromodomaines fonctionnent par liaison sélective à N-chaînes latérales de lysine - $\epsilon$ -acétylées, notamment sur les histones et les facteurs de transcription . Des fonctions enzymatiques et d'échafaudage supplémentaires peuvent ensuite être recrutées dans l'ADN via d'autres domaines au sein de la protéine contenant la bromodomaine pour moduler la transcription génique.

Les protéines BET (bromodomaines et extra-terminales) sont une sous-famille de protéines contenant des bromodomaines consistant en Brd2, -3, -4 et -T, qui contiennent chacune des bromodomaines en tandem, un motif extra-terminal et, dans le cas de Brd4, un domaine d'interaction protéine-protéine C-terminal.

Les protéines BET ont suscité un intérêt clinique croissant en raison de leur rôle important dans la santé et la maladie humaines. La BrdT, qui est spécifique au testicule, est devenue une cible prometteuse pour les agents contraceptifs masculins en raison de son rôle dans la régulation de la spermatogenèse.[85] Les autres bromodomaines BET jouent un rôle critique dans un certain nombre de pathologies. [110] En particulier, Brd4 régule la transcription de l'oncogène c-Myc .

À la clinique, plusieurs inhibiteurs pan-BET sont à l'étude contre divers cancers, notamment le myélome multiple, le carcinome médian NUT et le glioblastome multiforme. [23, 35]

En dehors du cancer, Brd4 joue également un rôle dans l'activation virale et la maladie cardiaque. [23, 75, 126, 1] Les petites molécules I-BET 762 ( 1 ) et (+) - JQ1 ( 2 ) [99, 37] , toutes deux basées sur un échafaudage de triazo-

loazépine, ont été les premiers inhibiteurs pan-BET décrits dans la littérature primaire . Récemment, des déficits de mémoire liés au composé 2 chez la souris [63] et une résistance au médicament contre les deux triazoloazépines [38] ont été décrits.

Ces problèmes motivent le développement d'inhibiteurs de BET supplémentaires . De nouveaux chimotypes sont donc souhaitables pour optimiser les propriétés pharmaceutiques des inhibiteurs de BET en tant qu'alternatives au développement clinique. La première synthèse rapportée de 2a été réalisée en quatre étapes, dont trois transformations effectuées dans un pot lors de la dernière étape . [37]

Ensuite, une synthèse évolutive de 2 utilisant des réactifs moins toxiques et le même nombre d'étapes a été décrite.[128] Plusieurs autres échafaudages ont été rapportés en tant qu'inhibiteurs pan-BET. [110, 113, 50, 89, 109, 145] L'inhibiteur le plus accessible rapporté à ce jour a été synthétisé en deux étapes, dont la première était une réaction à plusieurs composants, soulignant la demande de synthèses rapides et faciles.[86] Dans ce rapport, nous décrivons l'utilisation d'un écran virtuel à haut débit optimisé pour le premier bromodomaine de BrdT (appelé ci-après BrdT (1)) afin de découvrir de nouveaux échafaudages de liaison, puis de valider ces composés de plomb ( figure 1.3 ). Les relations structure-activité (SAR), la déconstruction du ligand et la pose de la liaison ont ensuite été explorées pour le composé le plus puissant trouvé dans l'écran virtuel, le composé 3 , qui est particulièrement accessible en raison de sa synthèse facile.

Les tentatives guidées par la structure pour accéder à un nouveau site de liaison à la surface de la protéine de Brd4 (1) sur la base de la structure co-cristalline avec 3 ont conduit à des gains de puissance supplémentaires pour les analogues de 3 .

Pour faciliter les études futures en utilisant 3et des analogues ultérieurs en tant que sondes chimiques, un écran de sélectivité pour les bromodomaines a

également été réalisé, démontrant une sélectivité élevée pour la classe BET des bromodomaines. Ici, nous décrivons une synthèse facile d'inhibiteurs de pan-BET avec une puissance submicromolaire basée sur un nouvel échafaudage de dihydropyridopyrimidine.

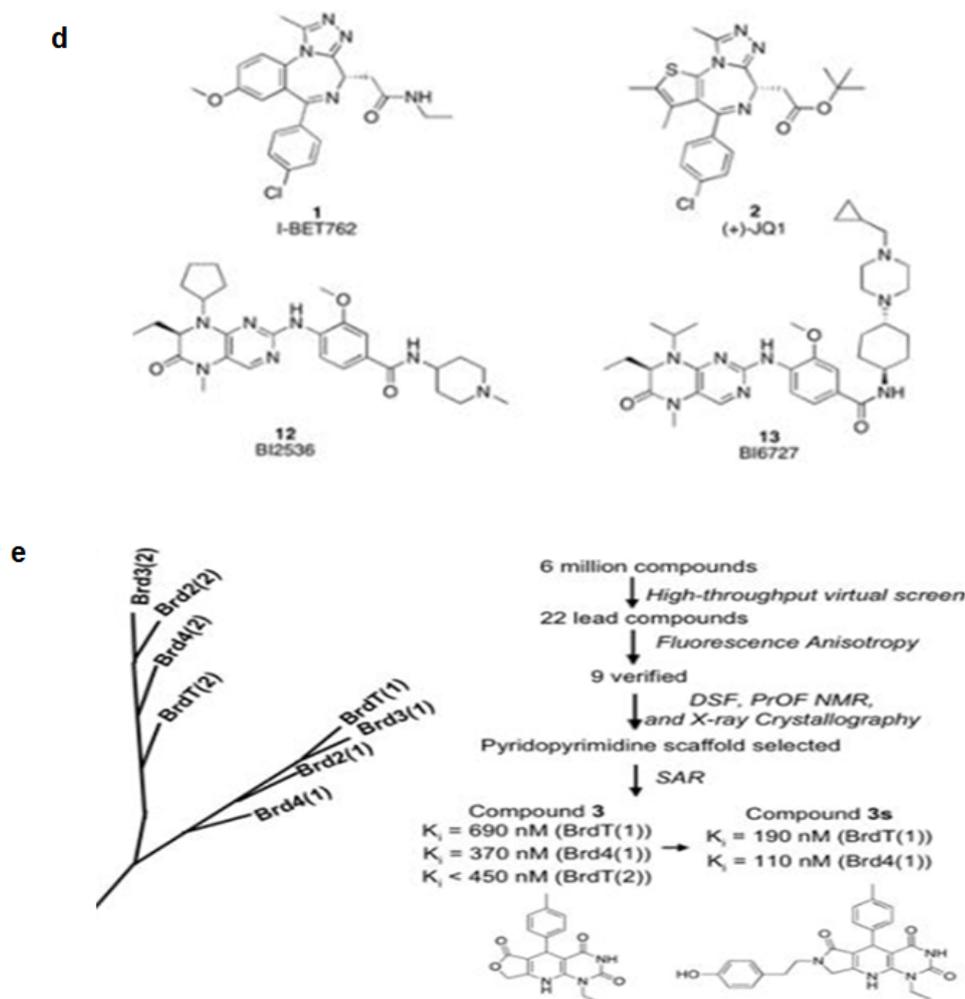


FIGURE 1.3: (d) les inhibiteurs de bromodomaine BET 1 , 2 , BI2536 ( 12 ) et BI6727 ( 13 ). (e) Membres de la branche BET de l'arbre phylogenetique bromodomaine.

## **1.5 Fonction biologie de la BRD4**

### **1.5.1 Rôle de BRD4 dans la progression du cycle cellulaire**

Brd4 est une protéine d'environ 200 kDa exprimée de manière ubiquiste, identifié pour la première fois chez la souris comme étant une MCAP en raison de son activité de liaison aux chromosomes .[24] Comme décrit pour la levure Bdf1 [15] et le Brd2 [61] humain l'association de Brd4 avec la chromatine persiste tout au long du cycle cellulaire . [25]

Une caractéristique unique des protéines BET réside dans leur capacité à s'associer à des chromosomes mitotiques, contrairement à d'autres protéines contenant des bromodomaines, telles que les sous-unités p300, CBP, GCN5 et les complexes hBrm / hSNF2 $\alpha$  et hBrg1 / hSNF2 $\beta$  du complexe de remodelage de la chromatine humain SWI / SNF [96], qui sont généralement déplacés des chromosomes condensés au cours de la mitose.

L'inhibition de la fonction Brd4 de la souris par l'injection d'anticorps anti-Brd4 dans des cellules en prolifération entraîne un arrêt G2/ M [24], probablement en raison d'un déséquilibre entre l'activité Brd4 et SPA-1 nécessaire dans G2 pour la division cellulaire. [32] En revanche, la surexpression de Brd4 dans des cellules en culture entraîne l'arrêt G1/ S .[84] Cela peut être dû à la répression de la fonction du facteur C de réplication induite par Brd4 pendant la réplication de l'ADN [84] Sans surprise, l'inactivation de Brd4 chez la souris est létale embryonnaire [53], et le renversement sévère de Brd4 dans des cellules humaines en culture réduit considérablement la croissance cellulaire .[140] Parce que Brd4, l'efficacité des cellules dans Brd4 +/- est liée à une réduction des taux de Lys-14 acétylée sur H3 et de Lys-12 acétylée à H4, ainsi qu'à un rélargie altéré de Brd4 sur des chromosomes suite à l'élimination des médicaments anti-microtubules qui perturbent la liaison

de Brd4 aux chromosomes [100], il semble que Brd4 joue également un rôle important dans le maintien de l'état d'acétylation globale de la chromatine dans la cellule. Sous cet aspect, il sera intéressant d'examiner si t (15; 19) translocation chromosomique conduit à une insu sancie de Brd4, ce qui peut être corrélé à une augmentation de la ségrégation chromosomique observée dans les cellules Brd4 +/- [100], et si l'expression ectopique de Brd4-Nut, qui provoque également l'arrêt G1/ S [58], peut remplacer (ou antagoniste) une fonction de Brd4.

### **1.5.2 Bromodomaine et orchestration ou remodelage de la chromatine**

Un motif protéique particulier appelé «bromodomaine» a été observé dans de nombreuses protéines qui composent la machinerie modifiant la chromatine. Il a été identifié pour la première fois en 1992 comme signature de 61 à 63 acides aminés .[51] Bien que sa fonction fût inconnue à l'époque, elle a ensuite été identifiée dans des facteurs de transcription, des co-activateurs et d'autres protéines importantes pour la transcription ou le remodelage de la chromatine et ses limites ont été étendues à environ 110 acides aminés.

Le nombre de ces protéines était d'environ quarante au dernier rapport [57, 137] et plusieurs ajouts importants à la famille ont été effectués depuis. La première protéine décrite du bromodomain, la levure Gcn5 [52], s'est avéré nécessaire pour le métabolisme des acides aminés et a été caractérisé en tant que co-activateur de la transcription .[47] Il fournit un composant d'acétylation des histones [127] des complexes de transcription ADA (Adaptateur) et SAGA (Spt-Ada-Gcn5 Acétyle-transférase) [136], ce qui est fondamental et essentiel pour la viabilité .[65] Gcn5 est également lié structurellement aux protéines CBP, p300 et Hat1 [66] de mammifères . Chez les mammifères, CBP et p300 ont également une activité intrinsèque de la HAT [3, 101] et

interagissent avec de nombreux facteurs de transcription importants en tant que Co-activateurs de la transcription. La quasi-totalité des histone acétyltransférases (HAT) des histones nucléaires contient des bromodomaines [137], mais toutes les protéines bromodomaines ne sont pas des THA. Par exemple, d'autres classes de protéines de bromodomaine comprennent MLL, un facteur de transcription putatif [46, 131] qui interagit avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI / SNF [119]; Spt7, un activateur de transcription acide et composant du complexe SAGA [41]; et une superfamille des hélicases qui comprend Snf2, Rsc1 / Rsc2 et Sth1, des composants des complexes SWI / SNF [106] et RSC [11]; Brg1, qui lie RB [132, 95]; et Brahma, qui contacte également RB, est liée à Swi2 / Snf2 [41, 105] et a des fonctions homéotiques dans *Drosophile*. [62, 31, 30]

Le rôle des bromodomaines dans les complexes de transcription a été controversé car leur suppression a des conséquences très différentes : chez les levures, la suppression par Bromodomaine de Spt7 n'a pas de phénotype, de Snf2 provoque une croissance lente, mais la suppression de Sth1, Rsc1 et Rsc2 provoque une létalité. [137]

Une grande partie de l'importance apparente des protéines bromodomaines réside dans le fait qu'elles possèdent une activité HAT intrinsèque ou qu'elles sont associées à des complexes liés à un promoteur qui contiennent une activité HAT ou une histone dés-acétylas (HDAC). Les protéines de bromodomaine sont donc potentiellement des acteurs importants dans le contrôle transcriptionnel d'une grande variété de gènes eucaryotes, y compris ceux qui contrôlent la croissance.

### **1.5.3 Fonction des protéines bromodomaine humaine**

La complexité et la variabilité de la composition en domaines des protéines humaines contenant le BRD, ainsi que l'influence des domaines voisins (tels que le PHD) sur la fonction du BRD lui-même, rendent difficile la

prédiction de la fonction des protéines contenant le BRD en fonction de la séquence . similitude seule. De nombreuses protéines humaines contenant des BRD n'ont pas de fonctions bien caractérisées, bien que certaines aient été impliquées dans des processus pathologiques. Les données les plus récentes sur la fonction des protéines humaines et la présence de BRD chez l'homme sont examinées dans la présente section. Cependant, la fonction spécifique de l'une quelconque des BRD reste a élucider.

La BRD4 joue un rôle important dans divers processus biologiques par le biais de ses deux BRD. Cette protéine fonctionne dans la réponse inflammatoire en tant que Co-activateur de l'activation transcription elle de NF-KB, via la liaison des BRD au résidu acétyle-Lys310 sur la sous-unité RelA de NF-KB .[54]

BRD4 joue également un rôle cellulaire en stimulant la transcription du gène G1 et en favorisant la progression du cycle cellulaire vers la phase S. [90] De plus, BRD4 peut contrôler la transcription des gènes viraux. Par exemple, cette protéine régule la transcription du VIH en induisant la phosphorylation de CDK9 (kinase 9 dépendant de la cycline) au niveau de Thr 29. Résidu dans le complexe d'initiation de la transcription du VIH, inhibant ainsi l'activité de la kinase CDK9 et conduisant a l'inhibition de la transcription du VIH .[146] BRD4 est également implique dans l'inhibition de la dégradation proteasomale de la protéine E2 du papillomavirus .[40]

En outre, BRD4 s'associe au LANA-1 code pour l'herpes virus associe au sarcome de Kaposi par le biais d'interactions moléculaires impliquant la région C-terminale [102] et le domaine extra-terminal [76] de BRD4. De plus, BRD4 et BRD2 interagissent avec la protéine murine -herpes-virus 68 ou f73, qui est nécessaire pour établir la latence virale in vivo .[103]

Enfin, l'activation de BRD4 peut également prédire la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein .[73] Crawford et al ont propose que l'activation de BRD4 manipule la réponse de la tumeur a son microenvironnement in

vivo , entraînant une réduction de la croissance tumorale et des métastases pulmonaires chez la souris .[19]

L'analyse par micro-réseau de plusieurs lignées de cellules tumorales mammaires humaines a démontré que l'activation de BRD4 était prédictive de la progression et / ou de la survie. Ces résultats suggèrent que la dérégulation des voies associées a BRD4 pourrait jouer un rôle important dans la progression du cancer du sein.

# Chapitre 2

## la pharmacocinétique et docking moléculaire

*"What a computer is to me is the most remarkable tool that we have ever  
come up with. It's the equivalent of a bicycle for our minds."*

*Steve Jobs.*

### 2.1 Introduction

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, allant de l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique jusqu'au patient, dans lequel les essais cliniques succèdent au développement pré clinique. L'identification et la mise au point d'une molécule possédant l'activité biologique recherchée se fait lors du développement pré clinique. Elles nécessitent, entre autres, l'investigation de ses propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, et se basent de plus en plus sur des approches informatisées *in silico*, dont les résultats se retrouvent *in vitro* et *in vivo*, dans des cellules voire des organismes modèles. L'un de ces outils informatiques est la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire. Celui-ci consiste à prédire et à reproduire les interac-

tions protéine-ligand[138] , ce qui est considérablement plus facile a mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales.

## **2.2 La pharmacocinétique d'un médicament**

Il est possible de décomposer le circuit du médicament dans l'organisme en quatre phases :

- une phase de résorption, ou d'absorption, qui correspond au passage du médicament de son site d'administration vers la circulation systémique,
- une phase de distribution, correspondant à la diffusion du médicament dans les différents tissus de l'organisme,
- une phase de métabolisme, décrivant la transformation du médicament par l'organisme,
- une phase d'élimination, s'intéressant aux processus d'élimination du médicament par l'organisme.[118]

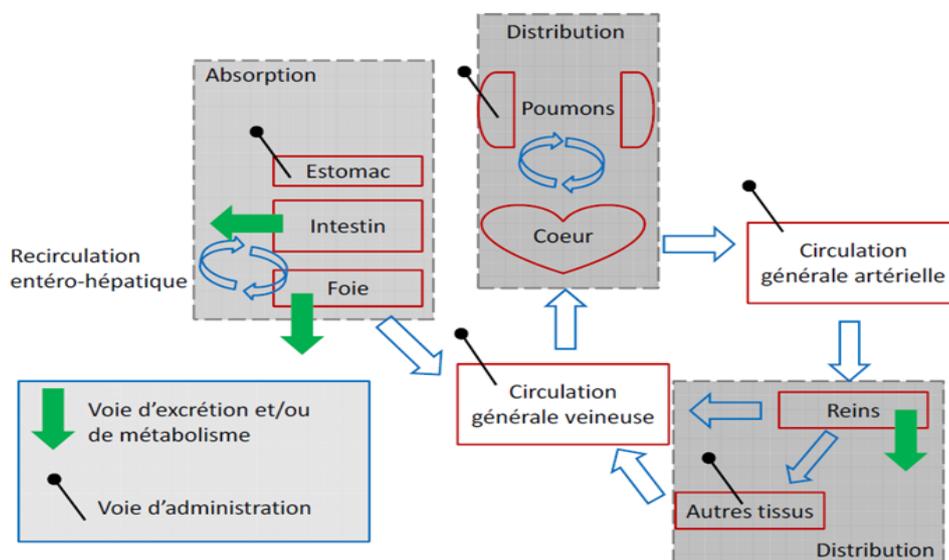


FIGURE 2.1: Les principales étapes de la pharmacocinétique

## 2.2.1 Absorption

L'absorption correspond au passage à travers les membranes biologiques du médicament de son site d'administration jusqu'à la circulation systémique. Elle dépend des caractères physicochimiques du médicament : hydrophilie, lipophilie et taille de la molécule de principe actif. Avant toute absorption, il est souvent nécessaire que le principe actif soit libéré de la forme galénique : dissolution du comprimé ou de la paroi de la gélule. Plusieurs phénomènes interviennent ensuite dans l'absorption des médicaments. D'une manière schématisée, on peut distinguer des phénomènes d'absorption actifs et des phénomènes d'absorption passifs.[112]

### 2.2.1.1 Transport passif

Transport passif ou La diffusion passive. La molécule est soumise à la force imposée par le gradient de concentration électrochimique (résultant du gradient de concentration et du potentiel électrique des membranes) ou à

la pression hydrostatique existant entre les deux faces membranaires des cellules. Cette diffusion peut être paracellulaire ou transcellulaire et ne nécessite aucune source d'énergie.[27]

### **2.2.1.2 Transport actif**

Le transport actif est sélectif, nécessite une dépense d'énergie et peut impliquer un transport contre un gradient de concentration. Les processus de transport actif semblent se limiter à des médicaments présentant d'étroites analogies structurales avec des substances endogènes (p. ex., les ions, les vitamines, les sucres, les acides aminés). Ces médicaments sont habituellement absorbés à partir de sites spécifiques dans l'intestin grêle.[71]

### **2.2.1.3 Transport facilité**

La diffusion facilitée ou le transport facilité. La molécule est associée à un transporteur. Ce dernier peut être paracellulaire ou transcellulaire, ne nécessite, comme dans le cas précédent, aucune source d'énergie, mais une reconnaissance cellulaire de la molécule par la protéine transporteuse spécifique (carrier protéine) ou par le canal. Cette voie est surtout empruntée par les hexoses et les acides aminés en co-transport avec le sodium au niveau de la membrane apicale; elle peut être inhibée de façon compétitive par un analogue structural.[130]

## **2.2.2 Distribution**

Après son entrée dans la circulation générale, le médicament est distribué dans les tissus de l'organisme. La distribution est généralement inégale compte tenu du fait de différences en termes de débit sanguin irriguant les tissus, de fixation aux tissus (p. ex., liée à la teneur en lipides), du pH local et de la perméabilité des membranes cellulaires.[71]

### 2.2.2.1 Fixation aux protéines plasmatiques

Dans la circulation générale, le médicament peut se lier aux protéines plasmatiques, présentes en grande quantité, pour former des complexes. Il s'agit le plus souvent d'une liaison réversible et en équilibre tel que : Seul le médicament libre est actif Différentes protéines plasmatiques et structures cellulaires sont impliquées :

- Albumine++
- Alpha1 glycoprotéine acide (AAG)++
- Lipoprotéines
- Gammaglobulines
- Cellules sanguines ( érythrocytes, polynucléaires, lymphocytes, plaquettes) La fixation aux protéines plasmatiques dépend beaucoup des caractéristiques acido-basiques du médicament. Schématiquement :

TABLE 2.1: La liaison médicament-protéine plasmatique dépend de la nature du médicament

	<b>Type 1</b>	<b>Type 2</b>
Nature du médicament	Acide faible	Base faible / substance non ionisable
Protéine fixatrice	Albumine	glycoprotéine acide
Affinité	Forte	faible
Nombre de sites de fixation	Petit	Grand
Possibilité de saturation	Oui	Non
Possibilité d'interaction	Possible	Improbable

### **2.2.2.2 Diffusion tissulaire**

La distribution se fait principalement dans l'espace extra-cellulaire (volume plasmatique + volume interstitiel) mais aussi dans le milieu intracellulaire. Pour diffuser, les médicaments doivent passer les membranes tissulaires. Dans certains tissus comme le foie, la paroi vasculaire est composée de capillaires discontinus permettant une diffusion facile du médicament. À l'opposé dans d'autres organes comme le cerveau ou la barrière hémato-encéphalique, la paroi vasculaire est composée de capillaires continus difficilement franchissables. Les mécanismes du passage trans-membranaire du médicament sont identiques à ceux exposés pour l'absorption .

La diffusion tissulaire est dépendante :

- des caractéristiques physico-chimiques du médicament (lipophilie) ;
- de la capacité du médicament à franchir les parois vasculaires et cellulaires ;
- de la fixation protéique (sanguine et tissulaire) ;
- du débit sanguin tissulaire (par exemple très élevé pour le foie et le rein et faible pour l'os et la peau).[118]

### **2.2.3 Le métabolisme**

Le métabolisme correspond à la transformation du médicament par l'organisme. Cette transformation est essentiellement réalisée par des réactions impliquant des enzymes. [69] Les réactions métaboliques catalysées par ces enzymes sont classées en deux catégories : phase I et phase II. Les réactions de phase I ont pour but d'augmenter la polarité du substrat principalement grâce à l'oxydation, ainsi qu'à la réduction et à l'hydrolyse. Les réactions de phase II ou de synthèse visent à conjuguer le substrat avec une molécule endogène, rendant le composé plus hydrosoluble et généralement

inactif, à l'exception de rares cas. [64] On distingue 2 grandes phases dans le métabolisme des médicaments :

- les réactions de phases I.
- les réactions de phases II.

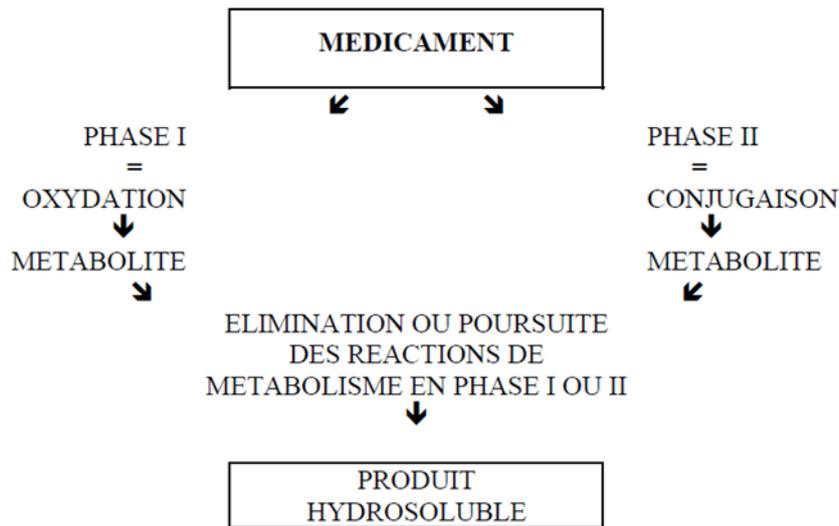


FIGURE 2.2: Les étapes de la phase I,II

### 2.2.3.1 Les réactions de phases I

La majorité des réactions de phase I sont catalysées par les isoenzymes du cytochrome P450. Le rôle principal des isoenzymes est de catalyser une réaction de monooxygénation afin de rendre les substrats plus hydrophiles en y introduisant un groupement polaire grâce à l'oxygène atmosphérique (e.g. oxydation aromatique ou aliphatique) ou en dégageant une fonction pour augmenter la polarité (e.g. désacétylation, déhalogénéation). [49, 48, 6] À la suite du processus métabolique de phase I, certains substrats peuvent être conjugués avec des composés endogènes et subir ainsi une réaction de phase II.



FIGURE 2.3: la réaction de phase I

- Le cytochrome P450 = CYP

C'est une superfamille de mono-oxygénase, ce sont des protéines à noyau hème (hémoprotéine) qui catalysent des réactions d'oxydation nécessitant de l'oxygène et du NADPH. Il existe un grand nombre d'isoenzymes du cytochrome P450 (57 isoenzymes identifiées en 2004 chez l'Homme). les cytochromes P450 sont présents dans le foie dans les microsomes hépatiques mais aussi dans l'intestin, le rein, le poumon. Un CYP n'est pas spécifique d'un substrat : un CYP métabolise plusieurs substrats différents et un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYP.

#### Nomenclature du cytochrome P450

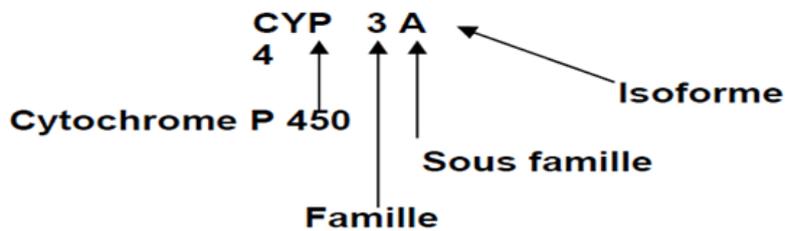


FIGURE 2.4: Classification des cytochromes

Les isoenzymes les plus impliquées dans le métabolisme des médicaments chez l'Homme sont les CYP 3A4, CYP 2D6, CYP 2C9, CYP1A2, CYP 2C19 . [78]

### 2.2.3.2 Les réactions de phases II

Les réactions de phase 2 sont principalement des réactions de conjugaison entre la molécule mère et une biomolécule de l'organisme comme l'acide gluconique, le glutathion ou l'urée. Elles peuvent se produire au niveau des fonctions créées lors de réactions de phase 1. Les métabolites formés sont plus solubles dans l'eau que la molécule mère, ce qui facilite leur élimination dans les urines.[69]

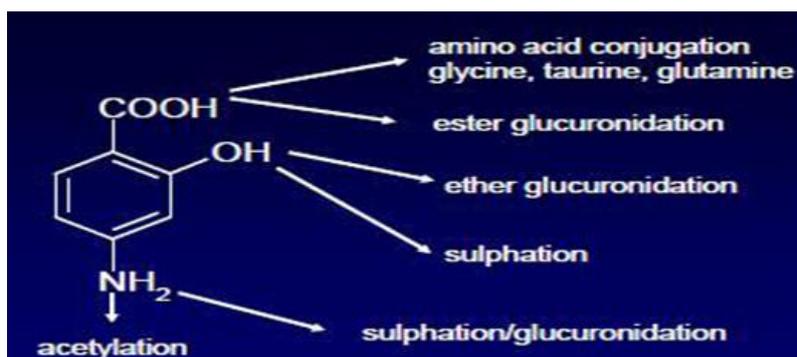


FIGURE 2.5: la réaction de phase II

### 2.2.4 Élimination

L'élimination d'un médicament de l'organisme peut se faire par différentes voies :

- rénale par l'urine ;
- hépatique par la bile ;
- respiratoire dans l'air expiré ;
- cutanée par la sueur ;

- salivaire ;
- dans le lait maternel.

Les principales voies d'élimination sont rénales et hépatiques. Le phénomène de réabsorption du médicament rencontré pour certaines voies d'élimination contribue à diminuer ou à ralentir l'élimination du médicament. Les mécanismes décrits pour l'absorption sont également présents lors de l'élimination (diffusion passive, transport actif et pinocytose).[112]

#### **2.2.4.1 Élimination hépatique**

Outre ses capacités métaboliques, le foie participe à l'excrétion des médicaments hors de l'organisme par le biais du système biliaire. Après excrétion dans la bile, le médicament se retrouve dans la lumière intestinale où il peut être réabsorbé : c'est le cycle entéro-hépatique. [72]

#### **2.2.4.2 Élimination rénale**

La plupart des molécules sont éliminées dans les urines, soit sous forme inchangée, soit sous forme de produits de dégradation. Le plus souvent les médicaments ou leurs métabolites ont une masse moléculaire bien inférieure à 5000 et sont de ce fait filtrés par le glomérule. Seule la partie non fixée est filtrée. La réabsorption tubulaire intervient tout au long du néphron. Il s'agit le plus souvent d'un processus passif qui est influencé par le degré d'ionisation du médicament : seule la fraction non ionisée au Ph urinaire est réabsorbée. Cette propriété est utilisée dans certains surdosages pour accélérer l'élimination du médicament en alcalinisant les urines pour bloquer la réabsorption. Une sécrétion active est également observée pour quelques molécules, entre autres des cations ou anions qui sont sécrétés dans la lumière du tubulé par des systèmes de transport spécifiques, consommant de l'énergie et à capacité saturable. On peut donc observer des phénomènes de compétition. [94]

## **2.2.5 Notion pharmacocinétique et formule calcule**

### **2.2.5.1 Biodisponibilité**

La biodisponibilité comprend toutes les étapes et phénomènes nécessaires pour qu'un médicament quitte son site d'administration avant d'atteindre la circulation générale et par la suite sa cible thérapeutique. L'absorption requiert le passage au travers de plusieurs membranes biologiques ce qui est influencé par la solubilité, la perméabilité du médicament ainsi que le flux sanguin. La fraction de la dose qui rejoint la circulation artérielle systémique est connue sous le terme biodisponibilité (F). La biodisponibilité d'un médicament après administration orale dépend de plusieurs facteurs : degré de dissolution dans les fluides intestinaux, dégradation par les sucs digestifs, métabolisme pré-systémique intestinal et hépatique, et de l'action de transporteurs. En fait, les protéines membranaires intestinales peuvent agir comme transporteurs actifs qui aident à l'absorption du médicament (influx) ou au contraire comme un mécanisme de protection et d'efflux comme la P-glycoprotéine (PGP). L'ensemble des phénomènes contribuant à influencer la biodisponibilité du médicament est connu sous l'effet de premier passage pré-systémique. Après le passage hépatique, on peut observer une excrétion biliaire de certains médicaments (forme inchangée ou métabolites) et surtout après avoir été conjugués à un groupe hydrophile. Une fois dans l'intestin de nouveau, les médicaments conjugués peuvent s'hydrolyser pour être réabsorbés. Ce phénomène appelé recirculation entéro-hépatique peut se répéter plusieurs fois ce qui augmentera la biodisponibilité. Les considérations spéciales de l'absorption des anesthésiques locaux administrés par voie locorégionale à proximité des nerfs périphériques et de la néostigmine en administration épidurale seront traitées dans les sections spécifiques pour chaque médicament .[43]

### 2.2.5.2 Volume de distribution

Il est difficile de quantifier la distribution d'un médicament compte-tenu de l'impossibilité de mesurer les concentrations tissulaires, seul le secteur plasmatique étant facilement accessible. La relation entre la quantité totale de médicament présente dans l'organisme et la concentration observée au niveau plasmatique s'exprime par le Volume de distribution. Connaissant la dose administrée (D) et la concentration plasmatique (C) extrapolée à l'origine  $C_0$  après injection intraveineuse, il est en effet simple de calculer ce Volume de distribution .

$$V = \frac{dose}{C_0}$$

Cette méthode est souvent fautive, à cause de l'imprécision régnant sur l'estimation de cette concentration à l'origine, du fait des phénomènes de distribution qui rendent hasardeuse toute extrapolation. Il est de loin préférable d'utiliser la relation qui existe entre la clairance et la constante d'élimination  $k$ .

$$V = \frac{Cl}{k} = \frac{dose}{(airesouslacourbe)(k)}$$

La valeur obtenue par ce calcul est en fait le volume apparent de distribution qui serait atteint en supposant une répartition homogène de la molécule dans un volume tel que la concentration de médicament serait partout identique à celle du plasma. Si une substance est fortement fixée au niveau tissulaire, la concentration plasmatique sera faible et le volume de

distribution grand et réciproquement. Le volume de distribution n'est cependant pas une représentation anatomique de la répartition de la molécule. Des médicaments comme les antidépresseurs imipraminiques peuvent atteindre des valeurs supérieures à mille litres (au lieu des 40 litres d'eau corporel de l'homme standard : 3 litres plasma + 12 litres de liquide interstitiel + 25 litres de liquide intra-cellulaire) reflétant les très faibles concentrations plasmatiques atteintes après des doses thérapeutiques. [9]

Clofibrate : 0,08 (diffusion tissulaire faible).

Halopéridol : 25,00 (diffusion tissulaire élevée).

### **2.2.5.3 Clairance d'élimination**

Le concept de clairance permet de décrire l'élimination d'une substance par un organisme entier (clairance totale) ou par des mécanismes particuliers (clairance rénale, hépatique, . . .) qui s'additionnent pour concourir à l'élimination totale. Certains organes sont capables d'éliminer une substance à partir du flux sanguin qui le traverse (à un débit  $Q$ ). Le mécanisme d'épuration peut être quelconque (filtration, métabolisme, sécrétion, . . .), mais il entraîne une diminution de la concentration de la substance entre l'entrée dans l'organe (CA) et la sortie de l'organe (CV). Il est possible d'écrire à tout moment que  $CV < CA$ . A partir de la figure 8, il est possible de calculer :

$$\text{Vitesse d'apport} = Q \cdot CA$$

$$\text{Vitesse de sortie} = Q \cdot CV$$

Cette valeur est appelée clairance (CL).

La clairance indique la capacité de l'organe à épurer totalement un volume de fluide par unité de temps. La clairance est soumise à de nombreuses sources de variabilité différentes selon l'organe impliqué. Pour le rein, des variations peuvent être dues à des altérations de la fonction rénale par exemple. Au niveau hépatique, la présence de polymorphismes peut influencer sur la clairance

hépatique d'un médicament. [98]

#### **2.2.5.4 La demi-vie**

la demi-vie d'élimination d'une substance correspond au temps nécessaire pour que la concentration sanguine de cette substance diminue de moitié dans sa phase d'élimination. Elle reflète donc les processus d'élimination et de métabolisme. La même notion peut être étendue à la phase d'absorption par exemple. On parlera alors de demi-vie d'absorption, qui correspond au temps nécessaire pour que la moitié de la quantité d'une substance administrée (par voie orale par exemple) soit absorbée vers la circulation sanguine. [111]

#### **2.2.6 Mécanismes généraux de la toxicité**

Ces mécanismes sont sans doute multiples. Certains sont liés aux mécanismes adaptatifs. Ainsi, la formation de métabolites intermédiaires réactifs par les enzymes de phase I est nécessaire pour l'activité des enzymes de phase II. Mais ces mêmes métabolites peuvent aussi réagir avec des macromolécules cellulaires, notamment l'ADN et former des adduits, ce qui rend compte de leur toxicité, et plus précisément de leur genotoxicité. Des études menées à l'aide de modèles animaux « knock-out » (KO) ont montré que la fonction de détoxification (élimination des xenobiotiques) semblait prépondérante sur celle de bioactivation (production de composés réactifs). Ainsi, des souris CYP1 KO sont plus sensibles à certains genotoxiques que des modèles sauvages. Bien que ces études ne se focalisent pas sur des pesticides, elles peuvent être utilisées comme référence pour appuyer le rôle essentiel des EMX dans les processus de détoxification qui impliqueraient potentiellement des pesticides. L'activité de certains cytochromes P450 peut conduire à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) qui jouent en fonction de leur concentration, soit un rôle dans l'activation de certaines voies de transduction, soit

un effet toxique (adduits a des macromolécules) pour la cellule : c'est le cas par exemple des cytochromes P450 CYP1A1 et CYP2E1 qui sont particulièrement impliqués dans le métabolisme d'agents découplés<sup>59</sup> favorisant la production de ces DRO. [92],[93],[81] D'autres mécanismes de toxicité peuvent être liés au groupe de gènes induits par les récepteurs des xenobiotiques, qui dépasse largement celui des gènes impliqués dans leur métabolisme conduisant à leur élimination. C'est le cas du récepteur de la dioxine (AhR) pour lequel de nouvelles cibles géniques ont été mises en évidence. [82] Outre le métabolisme, les récepteurs nucléaires sont au cœur de la régulation de nombreux réseaux de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation cellulaire, le développement et l'homéostasie. [44] Leur dysfonctionnement peut conduire à diverses pathologies (cancers hormono-dépendants, diabète, obésité, stérilité. . .). Enfin, les mécanismes de toxicité peuvent dépendre de la nature et des fonctions de chaque tissu. Le tissu adipeux stocke une grande quantité de xenobiotiques hydrophobes et les implications de cette fonction ne sont sans doute pas suffisamment appréciées. De même les effets des xenobiotiques et de leurs métabolites sur le développement et le fonctionnement du système nerveux ainsi que sur la barrière hémato-encéphalique ne sont pas assez connus.

## **2.3 Docking moléculaire**

Le Docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) est un nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand). Le terme docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand ». [22]

### **2.3.1 Le récepteur**

Les structures 3D que nous utilisons proviennent de la PDB (« Protein Data Bank », en anglais), les plus grandes archives de données structurales de macromolécules biologiques, comme les protéines et les acides nucléiques (ARN et ADN). Cette banque de données a été établie en 1971 et contenait à l'époque sept structures .[83]

En 2011, plus de 72300 structures 3D, dont environ 67000 structures de protéines sont disponibles et accessibles gratuitement. Elles ont été résolues pour la grande majorité par cristallographie aux rayons X (un peu plus de 63000 structures) du fait que cette technique présente de nombreux avantages, notamment celui de ne pas être limitée par la taille de la protéine. L'étape limitante de cette méthode se situe principalement au niveau de l'obtention de monocristaux diffractant à une résolution suffisante. La RMN fournit, quant à elle, plus de 8800 structures contre seulement 360 dans le cas de la microscopie électronique . [114] De nombreuses informations associées à chaque structure sont accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique via la PDB par un serveur internet (<http://www.rcsb.org/pdb/>). On peut y trouver la séquence correspondante, ses coordonnées atomiques, les conditions expérimentales (par exemple la résolution), des images 3D...etc. Cette base de données est fiable car elle est vérifiée et maintenue par différents centres (RCSB, PDBj, MSD-EBI). Les coordonnées atomiques des structures se trouvent dans un format de référence, appelé pdb, lu par différents logiciels de visualisation, de modélisation, de criblage virtuel...etc. Donc il suffit de consulter la PDB et d'inscrire le nom de la structure pour télécharger le fichier du récepteur au format pdb indispensable à l'opération de docking moléculaire. Le fichier pdb contient diverses informations sur la macromolécule telle que le nom du récepteur, l'équipe qui a résolu la structure, la méthode expérimentale, . . . etc. On y retrouve aussi des informations

sur la structure primaire, les hétéro-atomes (ligand, métaux, résidus modifiés, ... etc.), la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée. Enfin, la dernière section du fichier fournit des informations sur les connections chimiques entre les atomes [83]. Il est important de signaler que certaines protéines ne sont pas encore disponibles dans cette banque de donnée et si cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, il devient alors possible de construire la structure 3D de la cible souhaitée, en utilisant la modélisation par homologie .[28]

### **2.3.2 Le(s) ligand(s)**

En docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules .[91]

- A présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné . La première souvent d'aspect commercial , est constituée de bases de données de structures chimiques appelés chimiothèques ou espaces chimique .[116]
- Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que chemDraw, Arguslab, Titan ou Sybyl pour ne citer que ces exemples.

### **2.3.3 Les simulations de docking**

#### **2.3.3.1 Principes théoriques**

Le Docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique. Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine, le terme Docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand ». Le docking moléculaire a pour but de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur [18].

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (figure 1.10 Principe général d'un programme de docking).

- Le Docking (la première étape) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.

- Le Scoring (la deuxième) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées.

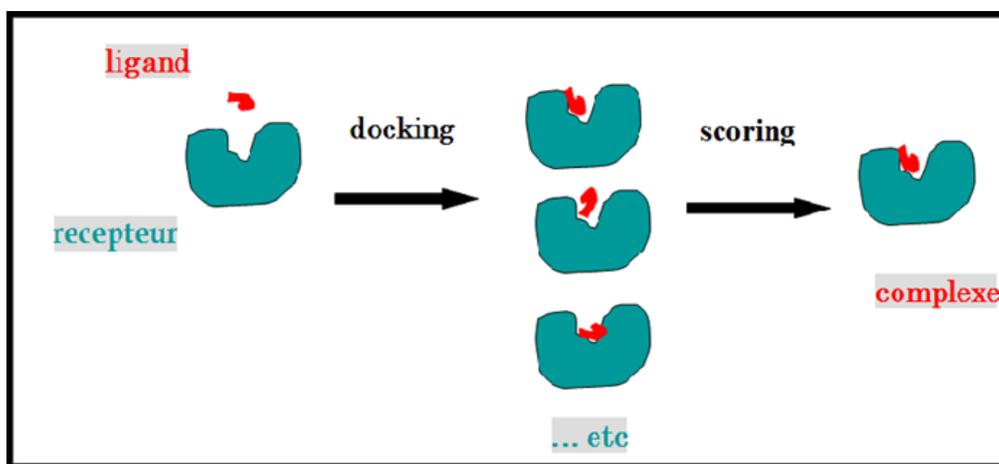


FIGURE 2.6: Principe général d'un programme de docking

### 2.3.3.2 Algorithmes de docking

En principe, un docking peut être fait de façon « manuelle » directement par le modélisateur, en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine à l'aide d'une interface graphique. Ensuite, la géométrie de l'ensemble est optimisée de manière à corriger les problèmes stériques et obtenir un complexe énergétiquement stable. Cette approche est appliquée quand on a une idée précise du mode d'interaction réel du ligand .[56]

Néanmoins, le plus souvent, le mode d'interaction réel n'est pas connu. Dans ce cas tester manuellement toutes les conformations et orientations des ligands s'avère impossible d'un point de vue pratique, même en considérant la protéine comme un corps rigide.

Pour contourner cette difficulté, les algorithmes de docking ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association « protéine-ligand » les plus favorables .[17]

Les algorithmes de docking peuvent être séparés en deux grandes classes: ceux qui ne tiennent pas compte de la flexibilité de la protéine, en traitant celle-ci comme un corps rigide, et ceux qui sont capables de prendre en compte, partiellement la flexibilité du récepteur.

Dans les procédures de docking considérant la protéine comme un corps rigide, la flexibilité du ligand seule est prise en compte pour l'obtention de complexes. Selon la méthode utilisée pour générer les conformères du ligand et les placer dans la cavité catalytique du récepteur, les algorithmes peuvent être sous-divisés en algorithmes de simulation de la mécanique moléculaire et ceux de la dynamique moléculaire[33] de forme, systématique et stochastique. Plusieurs articles de revue décrivant le principe, les points forts et les limitations de ces méthodes sont disponibles .[10]

Toutefois, cette classification doit être considérée avec précaution, puisque un bon nombre d'algorithmes combinent plus d'une méthode pour la génération et l'échantillonnage de conformères du ligand. Dans la plupart des cas, l'utilisation d'algorithmes considérant la protéine comme un corps rigide mène à de bons résultats, principalement quand la protéine a une flexibilité limitée. En effet, dans de tels cas, la structure cristallographique peut être considérée comme plus représentative de l'état de la protéine dans son environnement naturel, ce qui augmente les chances de simuler correctement la complexation des ligands .[34]

Certaines protéines présentent naturellement des régions de grande flexibilité , subissant des réarrangements considérables en présence d'un ligand . Dans ce cas, négliger la flexibilité de la protéine peut mettre en péril la fiabilité des résultats de docking, et rend nécessaire l'utilisation d'approches capables de tenir compte de la flexibilité du système entier. [17]

Des méthodes indirectes ou directes, où la flexibilité de la protéine est partiellement ou totalement prise en compte, sont décrites dans la littérature. Néanmoins, ces méthodes ne sont pas souvent utilisées car le gain en précision par rapport aux algorithmes traditionnels est généralement trop petit par rapport à l'augmentation du temps de simulation .[33]

### **2.3.3.3 Choix de logiciel de MolDock (MVD)**

Dans le domaine de docking moléculaire, plusieurs logiciels ont été utilisés pour étudier les différentes interactions existantes entre deux entités moléculaires (Enzyme ligands). MolDock est un logiciel récemment développé qui donne de bons résultats (algorithme génétique). [29]

La fonction de score de MolDock est une fonction empirique. Ce type de fonction nous permet de choisir les composés ayant la plus grande probabilité d'interagir avec la cible, ne nécessite pas une grande puissance de calcul, ce qui permet de cribler la cible plus rapidement. Ainsi que se démarque par sa capacité à mieux évaluer les ponts H ainsi que les interactions électrostatiques. La procédure d'accueil est composée de trois éléments :

- a** - L'identification de site de liaison.
- b** - La recherche de la meilleure pose parmi les poses possibles.
- c** - La fonction de score .[29]

### **2.3.3.4 Protocole général de docking**

Les approches utilisées actuellement sont exclusivement calculatoires et évaluées par des outils de visualisation. Ces approches peuvent être décomposées en quatre à cinq phases successives ( figure 2.7 ) :

- Choix du mode de représentation des protéines (tout atome, pseudo-atome, grille, etc.),
- Exploration conformationnelle (corps-rigide position/orientation du ligand et/ou flexible position/orientation/forme du ligand),
- Minimisation de la fonction d'évaluation de l'énergie d'interaction (ou fonction de score) des conformations issues de l'exploration,
- Regroupement par ressemblances et classification par évaluation plus fine du score , accompagnée d'une étape non automatique d'évaluation

visuelle des résultats lorsque le score ne permet pas de discriminer la conformation native des différentes conformations générées.

- Une étape optionnelle d'affinement des complexes sélectionnés par minimisation ou dynamique moléculaire.

Un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de modes de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison.[125]

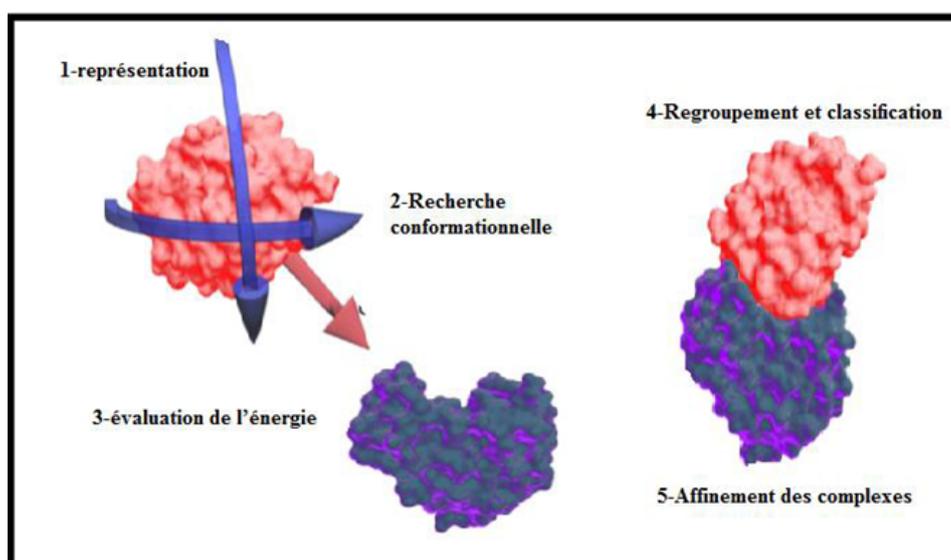


FIGURE 2.7: Protocole général de docking [34]

### 2.3.4 Interaction protéine-ligand

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

### 2.3.4.1 Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques agissent à plus grande distance entre dipôles chargés (figure 2.8). La distance pour une liaison saline, par exemple, est de 3,7 à 4,5 Å, et sa force est de l'ordre de 8 Kcal/mol. En présence de solvant, ces interactions sont favorisées du fait de la polarité et de la petite taille de la molécule d'eau .[129]

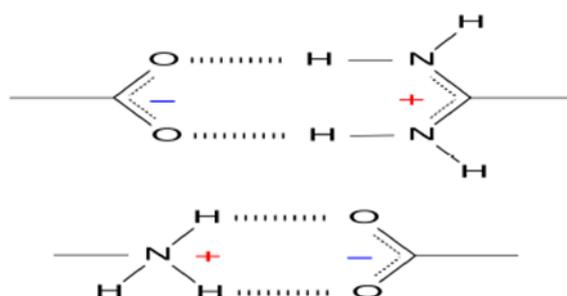


FIGURE 2.8: Interactions électrostatiques

### 2.3.4.2 La liaison hydrogène

Les ponts hydrogène avec une force de l'ordre de 2 à 4 Kcal/mol agissent, dans les systèmes biologiques, à très courte distance (0,9 à 2,8 Å) entre un H lié à un O ou un N avec un O ou un N (figure 2.9). Ils sont peu nombreux et s'adaptent très bien à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°).[125]

L'orientation et la géométrie des liaisons hydrogènes contribuent à la force des liaisons hydrogènes.

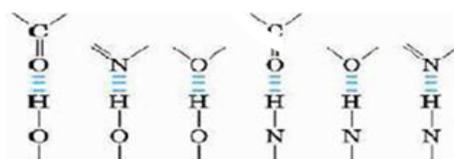


FIGURE 2.9: liaison hydrogène

### 2.3.4.3 Les interactions de Van Der Walls

Les interactions de Van Der Waals sont des dipôles non permanents de faible rayon d'action (figure 2.10). Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice .[70]



FIGURE 2.10: Interactions de Van Der Walls

#### 2.3.4.4 Les interactions hydrophobes

Sont des chaînes organiques saturées ou aromatiques non polaires ayant très peu d'affinité pour l'eau (figure 2.11). Ils ont tendance à se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'environnement aqueux .[134]

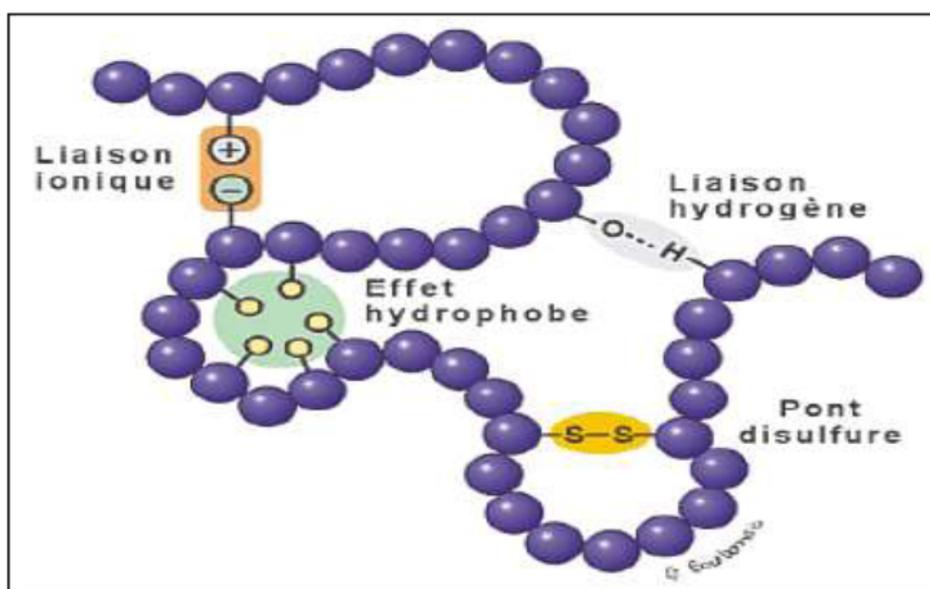


FIGURE 2.11: Interactions hydrophobes

# Chapitre 3

## Méthodes de calculs et résultats et discussions

*"If art interprets our dreams, the computer executes them in the guise of programs!"*  
*Alan J. Perlis.*

### 3.1 Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement c'est définir quels sont les résidus mis en jeu et connaître le type d'interactions et par suite en déduire :

- L'affinité entre deux molécules.
- Les distances entre les acides aminés du site actif de l'enzyme et ceux des inhibiteurs.
- L'énergie d'interaction.

De même, la découverte de nouveaux médicaments activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur af-

finité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisation moléculaire, regroupées sous le nom " d'Amarrage" ou « Docking moléculaire » ont été développées.

Les logiciels de Docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, puisque la plupart des principes actifs sont des petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique. [45]

En plus utilisée "Drug-likeness" pour l'équilibre complexe des diverses propriétés moléculaires d'un composé qui influent sa Pharmacodynamique et pharmacocinétique et permettre d'optimiser son absorption, distribution, métabolisme et élimination (ADME) dans le corps humain et les caractéristiques qui déterminent si la structure de la molécule particulière similaire a des médicaments connus.

Dans ce chapitre on a expliqué les interactions entre les inhibiteurs et la protéine4 contenant de bromodomaine (BRD4) par les méthodes du docking moléculaire. En outre, 27 composés conçus ont été filtrés selon la règle de cinq de Lipinski, ainsi que par des évaluations des paramètres de risque ADMET.

## 3.2 Matériels et méthodes

### 3.2.1 Matériels

L'objectif essentiel de notre travail de master est une initiation aux approches de modélisation par docking moléculaire afin de proposer de nouveaux inhibiteurs de la BRD4 . Pour ce faire, nous avons utilisé les logiciels suivant :

- **Hyperchem (8.07)**

Hyperchem est un logiciel de modélisation moléculaire développé par Autodesk, et distribué par hyper cube, (Ontario, Canada) . C'est un logiciel sophistiqué, qui est connu pour sa propriété, sa flexibilité et sa facilité d'usage. Unissant l'animation et la visualisation 3D, hyperchem peut faire des calculs de mécanique, dynamique moléculaire et même quantiques. [117]

- **LigPlot + v.1.4.5**

les représentations en deux dimensions de la meilleure pose d'accostage pour les dérivés sélectionnés de quinazoline à l'intérieur de l'enzyme cible ont été générées à l'aide de LigPlot + [68]. C'est un programme informatique qui génère l'image 2D schématique des complexes protéine-ligand amarrés.

La structure 3D du complexe amarré est entrée sous forme de fichier PDB et le logiciel produit leurs résidus et liaisons en interaction. Dans la présente étude, LigPlot + a été utilisé pour identifier les résidus en interaction ainsi que les liaisons en interaction entre 6E4A et les inhibiteurs ancrés.

- **Le Molegro Virtuel Docker (MVD)**

le Molegro virtuel docker (mvd) est un logiciel performant permet la prévision des interactions Enzyme-ligand. Il réalise, automatiquement

toutes les étapes du processus. Le MVD offre un amarrage de haute qualité, il utilise une technique d'optimisation basée sur la rentabilité et la productivité [67]. MolDock Score est basée sur un nouvel algorithme heuristique de recherche qui combine l'évolution différentielle avec un algorithme de prévision dans la cavité<sup>1</sup>.

- **ADMETlab**

La plate-forme ADMETlab fournit une interface Web conviviale et librement disponible pour l'évaluation ADMET systématique des composés chimiques sur la base d'une base de données complète comprenant 288 967 entrées. Il contient Quatre modules de fonction sur la plate-forme permettent aux utilisateurs d'effectuer six types des analyses de drogue similaires (cinq règles et un modèle de prédiction), 31 Prévision des points limites ADMET (propriété de base : 3, absorption : 6, distribution : 3, métabolisme : 10, élimination : 2, toxicité : 7), évaluation systématique et recherche dans une base de données / similarité. Nous pensons que cette plate-forme Web facilitera, espérons-le, le processus de découverte de médicament en permettant une évaluation précoce de la similarité du médicament, un criblage virtuel rapide ADMET ou un filtrage et une hiérarchisation des structures chimiques. La plate-forme Web ADMETlab est conçue sur la base du framework Django en Python et est accessible à l'adresse (<http://admet.scbdd.com/>). [59]

- **Molsoft**

MolSoft fournit des services et des outils logiciels menant à la calcul-formatique, à la modélisation, à la découverte, à la bioinformatique et à des formulaires avec des sociétés pharmaceutiques et à la bioinformatique. Il a été fondé par Ruben Abagyan en 1994. Il fournit des outils et des logiciels pour la conception rationnelle des médicaments, la prédiction des structures, la bioinformatique, la visualisation et l'animation moléculaires, la protéomique ( <http://molsoft.com/mprop/>).

Fonctionnalités de MolSoft : Il aide à valider et à construire des modèles structurels pour les cibles protéiques. Il donne accès à l'identification de sites de liaison de ligands biologiques ou de nouveaux sites de régulation allostérique de la protéine d'intérêt. Il fournit la visualisation de molécule et le partage de données. Il aide également à déterminer la position des acides aminés dans l'interaction protéine-protéine. Il aide à concevoir des protéines avec les propriétés souhaitées. Il facilite le criblage de bibliothèques virtuelles de millions de composés en utilisant la procédure révolutionnaire d'amarrage et de notation de MolSoft.[2]

- **Molinspiration**

permet de calculer quelques propriétés physico-chimiques d'un composé organique qui sont : le facteur lipophile  $\log P$ , la superficie topologique de la surface polaire (TPSA), le nombre d'atomes, le poids moléculaire, le nombre d'atomes d'Oxygène et/ou de nitrogène, le nombre d'interactions OH-NH, le nombre d'infractions, le nombre de liaisons rotatives (n rot b) et le volume moléculaire.

D'autres propriétés bioactives ont été calculés : la réception des ligands couplés à la protéine G (GPCRL), la modulation des canaux ioniques (ICM), l'inhibition de l'enzyme Kinase (KI), la réception des ligands nucléaires (NRL), l'inhibition des enzymes Protéases (PI) et l'inhibition des enzymes (EI).[115]

## 3.2.2 Méthodes

### 3.2.2.1 Etude de docking moléculaire

#### A - Préparation de l'enzyme

Le fichier du récepteur utilisé, BRD4 enzyme est téléchargé sous forme PDB via la banque de la protéine ( <http://www.pdb.org> ). Protein Data Bank ou PDB est une collection mondiale de données sur la struc-

ture tridimensionnelle ( structure 3D ) des macromolécules biologiques (protéines essentiellement, et acides nucléiques). Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Parmi plusieurs complexes proposés par la PDB, nous avons choisi le complexe avec le codes 6E4A, car il s'agit des structures correctement définies avec une bonne résolution 1.26 Å, contenant BRD4 (Bromodomain-containing protein 4) récepteur et CN750 comme ligand, le complexe a été téléchargé au format pdb après l'introduction de son code. ( figure 3.1 ). L'élimination des molécules d'eau et les inhibiteurs de Co-cristallisation, nous permet d'obtenir un modèle simplifié de l'enzyme.

Notre étude est basée sur la simplification d'enzyme comme une étape clé et essentielle pour accélérer et simplifier les calculs. Alors on élimine une des deux chaînes avec les molécules de Co-cristallisation et les molécules d'eau. ( figure 3.1 ).

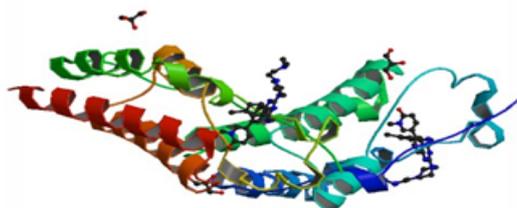


FIGURE 3.1: Structure de la protéine contenant de bromodomaine 4

## B - Préparation du ligand

Les inhibiteurs utilisés dans notre travail sont des dérivés quinazoline [143] L'optimisation de tous les ligands ( tableau 3.1 ) a été effectuée par le programme HyperChem (8.07) en utilisant deux méthodes de calcul :

- la mécanique moléculaire avec le champ de force (MM+).

- la méthode semi empirique AM1.

Les résultats sont enregistrées au format pdb ou mol2. Les molécules sont représenté dans la figure sous dissous.

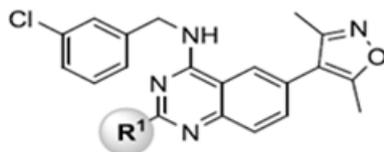
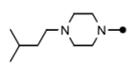
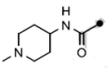
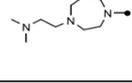
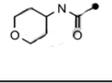
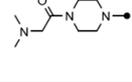
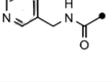
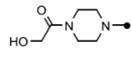
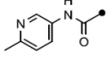
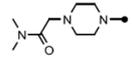
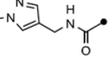
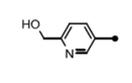
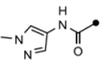
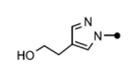


FIGURE 3.2: Structure générale de molécule de base

TABLE 3.1: Les substitution des composés du série bioactive

Molécule	R1	Molécule	R1
1	Cl	15	
2		16	
3		17	
4		18	
5		19	
6		20	
7		21	

8		22	
9		23	
10		24	
11		25	
12		26	
13		27	
14			

### C - Détection des cavités

Molegro virtual Docker (MVD) possède un algorithme de détection de cavités moléculaires dans le volume tridimensionnel du récepteur afin de prédire les sites d'interactions possibles. Cet algorithme basé sur une grille « grid-based » fonctionne comme suit :

Une grille discrète d'une résolution de 0,8 Å couvrant tout le volume de la protéine est créée. A chaque point de cette grille, une sphère de rayon 1,4 Å est placée en vérifiant l'intersection de ces sphères avec celles de Van der Waals des atomes de protéine. Les points de grille qui chevauchent avec les atomes de protéine sont définis comme points inaccessibles et les autres sont considérés points accessibles.

Chaque point accessible de cette grille sera analysé afin de vérifier s'il

fait partie de la cavité par l'insertion des lignes de directions aléatoires à partir de ce point jusqu'à franchir les limites de la grille.

Si la majorité des directions franchissent d'autres points accessibles au cours de leurs chemin ( à revoir défaut au moins 12 sur 16 directions différentes testés ), ce point est considéré faisant partie d'une cavité. Ceci est répété un certain nombre de fois pour définir tous les points accessibles des cavités. La dernière étape consiste à déterminer les régions de cavités en connectant les points voisins.

Les cavités trouvées sont ensuite classées en fonction de leur volume. Par le biais de cet algorithme, nous avons détecté deux cavités Les cavités sont classées selon leur volume (Tableau 3.2).

TABLE 3.2: les cavités détectées avec l'algorithme de détection de MVD pour 6E 4A

Cavité détectée	Volume (Å)
Cavité 1	48,128
Cavité 2	11,776

Nous avons remarqué que le ligand de référence CN750 est placé dans la cavité 1 et entouré par les résidus catalytiques. Nous avons donc décidé de conserver cette cavité comme un centre de recherche ( research center ) pour le processus du docking.

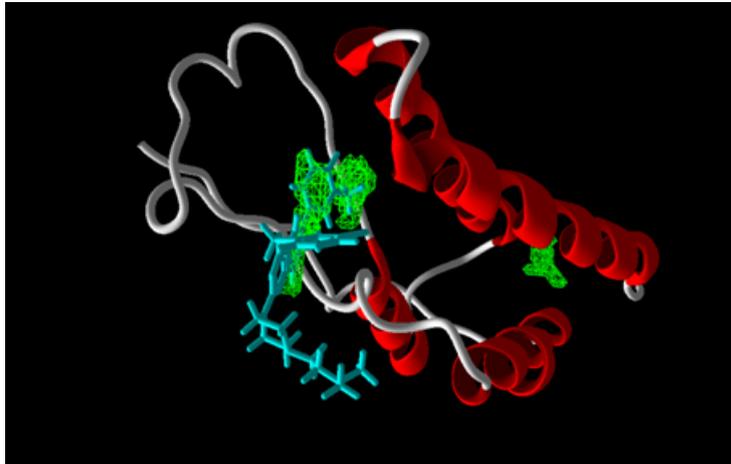


FIGURE 3.3: Interface graphique de cavité 1 par MolDock

#### D - Algorithme de recherche

La fonction d'amarrage utilisée était le MolDock [GRILLE] avec une résolution de grille de  $0.30 \text{ \AA}$ . "L'optimiseur" MolDock a été choisi comme l'algorithme de recherche avec un nombre de tour égale à 30. La meilleurs pose du ligand dans le site actif de l'enzyme a été choisie selon le meilleurs MolDock Score . La fonction d'amarrage "MolDock Score" employée par MVD est une dérivée de la fonction PLP, proposées par Gehlhaar et al1 [42], et développée par Yang et al2.[142]

Cette fonction contient des termes additifs des énergies des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, et des interactions hydrophobiques.

$$E_{\text{score}} = E_{\text{inter}} + E_{\text{intra}}$$

D'où :  $E_{\text{inter}}$  : Energie d'interaction protéine-ligand.

$E_{\text{intra}}$  : Énergie interne de ligand.

### **3.2.2.2 Évaluation de la ressemblance d'un médicament (drug likeness)**

Les structures de tous les dérivés de quinazoline sélectionnés ont été dessinées à l'aide Hyperchem et leurs notations SMILES ont été générées. Les notations de sourire des composés sélectionnés ont été introduites dans le logiciel en ligne molinspiration version 2018.08 ([www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com))[12], pour le calcul des propriétés moléculaires (Log P, Surface totale polaire, nombre de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène, poids moléculaire, nombre d'atomes .) et Le logiciel en ligne molsoft pour prédiction du score de bioactivité pour les cibles de médicaments (ligands de GPCR, inhibiteurs de kinases, modulateurs de canaux ioniques, enzymes et récepteurs nucléaires). Le score de bioactivité et les propriétés de similarité au médicament des dérivés de quinazoline ont été comparés au CN750.

### **3.2.2.3 ADMET (absorption, distribution, métabolisme, élimination)**

Les principales raisons de l'échec des molécules en cours de développement d'un médicament sont le manque d'efficacité chez l'homme et les problèmes de pharmacocinétique. Chaque médicament éventuel doit de se conformer à plusieurs critères de base, tels son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion. Nous avons analysé diverses propriétés pharmacologiques et pharmacodynamiques des molécules sélectionnées. Les propriétés pharmacocinétiques sont la solubilité, l'absorption intestinale, la liaison aux protéines plasmatiques (PPB), la barrière hémato-encéphalique (BBB), l'inhibition du cytochrome P450 et les niveaux d'hépatotoxicité.

Les propriétés pharmacodynamiques (profil de toxicité) étaient la canal

potassique (hERG), la Hépatotoxicité humaine (H-HT), la mutagénicité vis-à-vis de l'AMES, La dose létale médiane (DL50). Dans cette étude, les résultats ont été comparés aux valeurs de molécule de référence.

### 3.2.3 Résultats et discussion

#### 3.2.3.1 Résultats du docking moléculaire

Résultats du Docking moléculaire les dérivés de quinazoline sont reportés dans le **tableau 3.3**, qui présente l'énergie d'interaction entre le ligand et la protéine, marqué par MolDock et l'énergie de liaison hydrogène de chaque ligand. Ces 27 ligands représentent, du point de vue énergétique, une bonne affinité avec les résidus du site actif (**tableau 3.4**).

TABLE 3.3: Résultats de docking moléculaire des ligands avec la cavité 1de 6e4a

Ligand	E-Moldock	E-stérique	E(VdW)	E-Total	liaison-H	MW
L1	-148.386	-152.004	-37.783	-150.219	-4.451	399.273
L2	-147.062	-144.204	-17.505	-147.417	-3.648	393.869
L3	-148.354	-161.780	-44.709	-161.894	-5.431	464.990
L4	-149.758	-143.153	-19.803	-150.830	-1.380	462.974
L5	-161.191	-177.236	-32.558	-165.194	-1.348	520.069
L6	-156.634	-152.779	1.555	-156.219	-7.875	493.000
L7	<b>-173.925</b>	-176.289	-43.105	-168.794	-2.101	534.095
L8	-163.304	-151.549	79.835	-154.701	0.000	519.081
L9	<b>-172.533</b>	-171.745	142.032	-178.248	-4.263	534.095
L10	-150.216	-164.280	-45.703	-160.626	-0.560	534.052

<b>L11</b>	-143.079	-148.250	43.603	-139.975	-5.822	506.984
<b>L12</b>	-154.209	-161.544	-6.616	-156.636	-4.723	534.052
<b>L13</b>	-148.020	-158.558	-19.176	-148.614	-3.341	471.938
<b>L14</b>	-158.270	-159.795	-1.853	-162.884	-4.519	476.958
<b>L15</b>	-165.541	-157.014	74.217	-167.637	-7.971	474.942
<b>L16</b>	-169.601	-160.372	13.900	-169.028	-4.842	488.969
<b>L17</b>	-160.904	-152.950	-13.274	-169.750	-5.290	483.952
<b>L18</b>	<b>-180.047</b>	-169.574	-21.751	-181.542	-4.681	506.042
<b>L19</b>	<b>-171.462</b>	-163.128	61.510	-167.574	-9.704	501.967
<b>L20</b>	-162.671	-161.901	2.213	-166.793	-5.332	501.967
<b>L21</b>	-170.122	-176.655	10.111	-170.441	-3.949	548.079
<b>L22</b>	-165.496	-163.247	150.556	-167.692	-6.081	505.011
<b>L23</b>	<b>-170.730</b>	-170.136	-21.821	-168.118	-5.968	491.969
<b>L24</b>	-166.951	-172.001	-7.78976	-171.206	-7.387	498.964
<b>L25</b>	-159.775	-174.42	-35.852	-173.807	-4.21295	498.964
<b>L26</b>	-169.554	-156.398	-13.976	-169.643	-10.704	503.983
<b>L27</b>	<b>-171.489</b>	-164.502	66.250	-170.455	-8.077	489.957
<b>LRéf</b>	<b>-150.444</b>	-175.510	-40.947	-152.091	-1.854	531.072

Tout les énergies en kcal

**Liaison-H** : Liaison d'hydrogène.

**E-stérique** : Énergie stérique .

**E (VDW)** : Énergie de Van der Waals.

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

**Energie d'interaction(protéine-ligand)** : totale entre la pose et les molécules cibles.

Cette affinité est due essentiellement à la présence des interactions des liaisons hydrogène représentées par une valeur énergétique «HbondScore», et des interactions hydrophobiques de type  $\pi$ - $\pi$  (Van Der Waals) «VDW».

Par les résultats obtenus, on remarque que les complexes formés par les ligands L7, L9, L18, L19, L23 et L27 possèdent une énergie (MolDock Score) le très faible possible par rapport aux autres ligands .

On peut également dire que le complexe formé par le ligand L18 a une énergie d'interaction très basse par rapport aux autres complexes .

L'énergie d'interaction, l'interaction d'hydrogène et E stérique pour les six ligands L7, L9, L18, L19, L23 et L27, Ils sont classés par l'ordre suivants : **L18 < L7 < L9 < L27 < L19 < L23** .

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les interactions mises en jeu entre les résidus de site actif et les ligands L7, L9, L18, L19, L23 et L27 peut former des complexes stables. Les distances mesurées entre ces résidus et les six ligands sont regroupés dans les tableaux suivants .

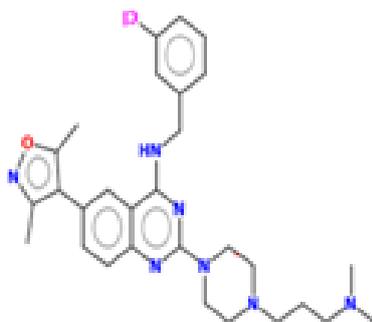


FIGURE 3.4: la structure de composé L7

TABLE 3.4: Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L7

Ligand	E-total d'Inter		Distance d'inter(Å)	Force d'in- ter(Kcal/Mol)
<b>L7</b>	<b>-173,925</b>	liaisons- stérique		
		Phe83...C	3,10	1,22
		Tyr 97...C	3,17	0,81
		Pro 82...C	3,15	0,88
		Pro 82...N	3,09	1,26
		Pro 82...C	2,62	4,15
		Asp 106...C	3,17	0,77
		Met 105...C	2,97	2,00
		Val 87...C	2,92	2,30
		Val87...N	2,84	2,84
		Val 87...C	3,11	1,14
		Leu92...C	3,17	0,80

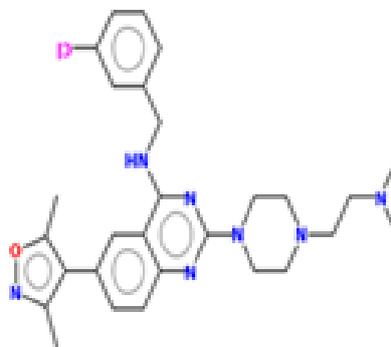


FIGURE 3.5: la structure de composé L9

TABLE 3.5: Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L9

Ligand	E-total d'Inter		Distance d'inter(Å)	Force d'inter (Kcal/Mol)
<b>L9</b>	<b>-172,533</b>	Liaison -H		
		Pro82...N	3,09	-2,48
		Liaison -stérique		
		Pro82...N	3,12	1,10
		Pro82...N	2,85	2,70
		Pro82...C	3,09	1,25
		Pro82...C	2,82	2,91
		Pro82...C	3,18	0,72
		Met132...C	2,48	2,96
		Met132...O	2,65	3,97
		Met105...O	2,77	3,24
		Met105...N	2,82	2,93
		Val87...C	3,19	0,66
		Val87...C	3,12	1,06
		Gln85...C	2,88	2,57
		Asp144...C	2,51	4,79

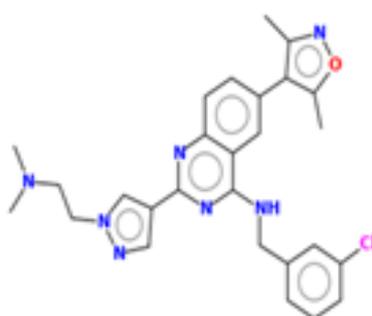


FIGURE 3.6: la structure de composé L18

TABLE 3.6: Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L18

Ligand	E-total d'Inter		Distance d'inter(Å)	Force d'in- ter(Kcal/Mol)
<b>L18</b>	<b>-180,047</b>	<b>Liaison -H</b>		
		Gln85... N	3,00	-0,94
		Asn140...N	2,68	-1,97
		Asn140...O	2,77	-2,38
		<b>Liaison -sté- rique</b>		
		Asp88...C	3,16	0,86
		Gln85...C	2,68	3,76
		Pro82...C	2,62	4,12
		Pro85...C	3,08	1,36
		Pro85...C	2,99	1,88
		Pro85...C	2,92	2,29
		Pro85...C	2,89	2,48
		Asp106...C	2,86	2,66
		Met105...C	3,01	1,77
		Val87...C	2,69	3,71
		Val87...C	2,52	4,75
		Val87...C	3,13	1,04
		Val87...C	2,43	5,30
		Tyr87...O	3,09	1,26
		Lle146...C	2,69	2,09

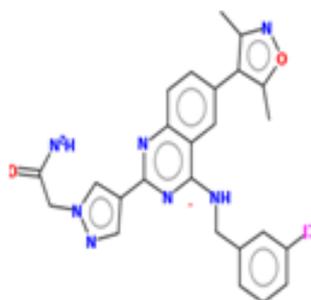


FIGURE 3.7: la structure de composé L19

TABLE 3.7: Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L19

Ligands	E-total d'Inter		Distance d'inter(Å)	Force d'in- ter(Kcal/Mol)
<b>L19</b>	<b>-177.325</b>	<b>Liaison -H</b>		
		Gln85...N	3,16	0,99
		Asn140...N	2,71	-2,50
		Asn140...O	2,71	-2,44
		<b>Liaison- stérique</b>		
		Val87...C	2,48	4,95
		Leu94...C	2,57	4, 41
		Trp81...C	3,11	1,18
		Trp81...C	3,08	1,35
		Pro82...C	2,82	2,90
		Pro82...C	2,90	2,45
		Pro82...C	3,12	1,10
		Asp144...C	2,80	3,05

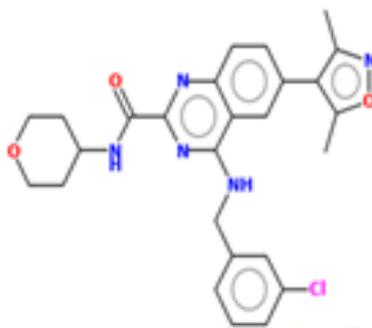


FIGURE 3.8: la structure de composé L23

TABLE 3.8: Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L23

Ligand	E-total d'Inter		Distance d'inter(Å)	Force d'in- ter(Kcal/Mol)
<b>L23</b>	<b>-171.462</b>	<b>Liaison-H</b>		
		Gln85...N	3,17	-1,07
		Asn140...N	2,61	-2,50
		Asn140...O	3,08	2,09
		<b>Liaison- stérique</b>		
		Asp88...C	3,01	1,75
		Asp144...C	2,84	2,79
		Pro82 ...C	3,07	1,40
		Pro82 ...C	3,04	1,56
		Pro82...C	3,02	1,72
		Trp81...C	2,94	2,15
		Leu94 ...C	3,05	1,50
		Val87...C	2,35	5,73

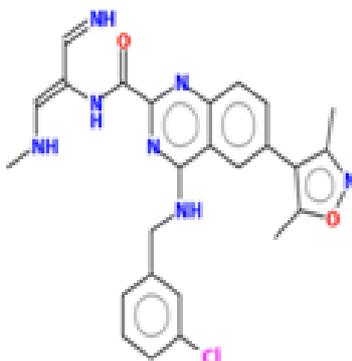


FIGURE 3.9: la structure de composé L27

TABLE 3.9: Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand L27

Ligand	E-total d'Inter		Distance d'inter(Å)	Force d'in- ter(Kcal/Mol)
<b>L27</b>	<b>-171,489</b>	<b>Liaison -H</b>		
		Gln85...N	3,09	-0,98
		Asp140...N	2,80	-2,50
		Asp140...O	2,98	-2,50
		<b>Liaison- stérique</b>		
		Trp81...N	3,18	0,75
		Pro82...C	3,04	1,58
		Pro82...C	3,16	0,86
		Pro82...C	3,01	1,78
		Asp144..C	3,18	0,70
		Leu94...C	2,24	6,44
Val87...C	2,56	4,48		

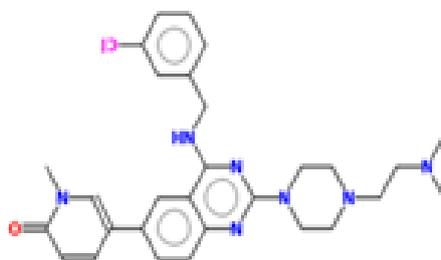


FIGURE 3.10: la structure de composé Lréf

TABLE 3.10: Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes de ligand Lréf

Ligand	E-Inter total		Distance d'inter(Å)	Force d'inter(Kcal/Mol)
Lréf	-150,444	Liaison -H Gln85...N	3,20	-0,90
		Liaison- stérique Asn140...C	2,84	2,82
		Pro82...C	3,06	1,45
		Pro82...C	3,18	0,75
		Pro82...N	2,76	3,27
		Pro82...C	2,81	2,94
		Lys91...C	3,16	0,84
		Gln85...C	3,19	0,67
		Leu92...C	3,17	0,78
		Leu92...C	3,17	0,80

### 3.2.3.2 Analyse virtuelle des interactions

- Étude les interactions CN750 avec 6e4a :

Le complexe ( 6e4a – CN750 ) se caractérise par un énergie Moldock -150.444 kcal/mol. Visuelle du complexe nous révèle une seule liaison hydrogène (  $d = 3.20 \text{ \AA}$  ) avec la fonction amine de piperazine du résidu Gln85 du récepteur ( ligne en pointillé bleu ). Des liaisons stériques avec les résidus : Asn140, Pro82, Lys91, Gln85, Leu92 a eu lieu ( ligne en pointillé rouge ) ( figure 3.11 ).

Le complexe est également stabilisé par des interactions hydrophobiques avec les résidus : Trp81, Leu92, Val87, Pro82, Met105, Phe83, Lle146, Tyr97, Cys136, Asn135, Met132, Tyr139, Asp144.

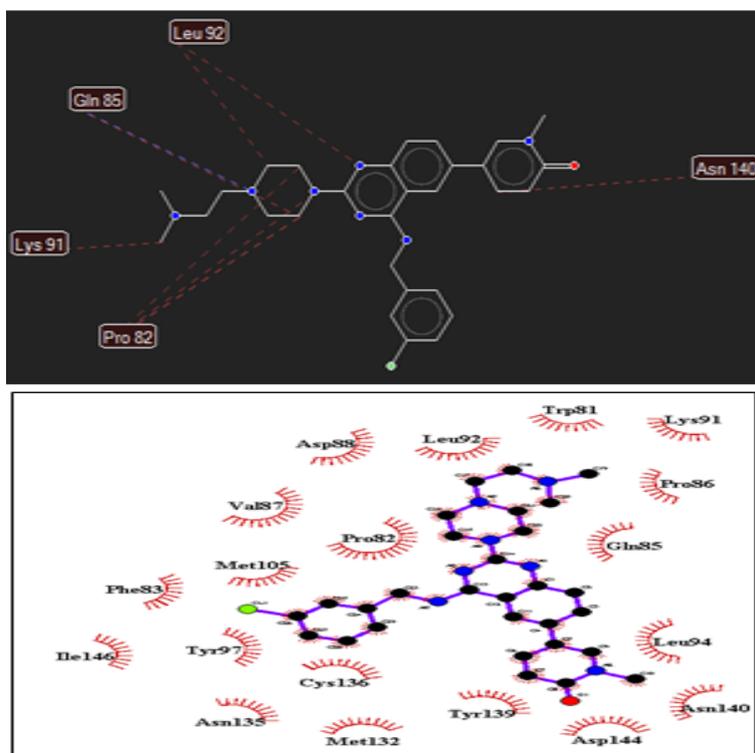


FIGURE 3.11: Interactions entre 6e4a et CN750

- **Étude les interactions ligand7 avec 6e4a :**

Le docking moléculaire du complexe (6e4a – Ligand 7) au sein du site actif de l'enzyme 6e4a donne l'un des meilleurs énergie Moldock -173.925 kcal/mol, ce composé ne forme aucune liaison hydrogène lors de son interaction avec le site actif de la 6e4a ( figure 3.12) au profit des nombreuses interactions hydrophobiques avec les résidus suivants qui stabilisent le complexe : Pro86, Pro82, Gln85, Val87, Phe83, Ile146, Asn140, Cys136, Asp144, Tyr97, Trp81, Leu92. Les résidus : Phe83, Leu92, Val87, Met105, Asp106, Pro82, Tyr97 forment des liaisons stériques avec L7.

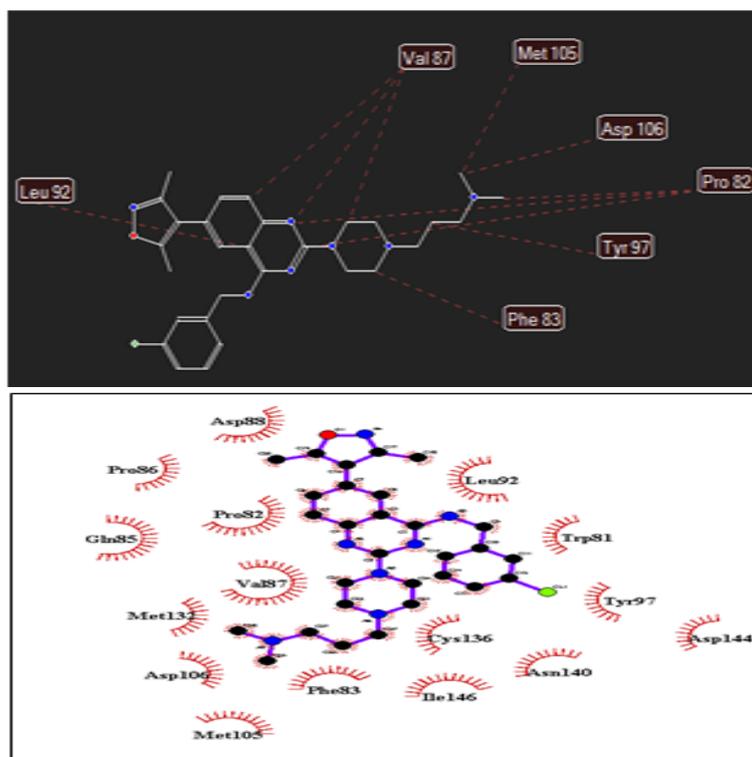


FIGURE 3.12: Interactions entre 6e4a et Ligand 7

- **Étude les interactions ligand 9 avec 6e4a :**

La modélisation de l'interaction ( 6e4a - ligand 9 ) simulé par docking moléculaire avec MVD nous a permis d'obtenir un complexe plus stables ( figure 3.7 ) avec une énergie Moldock égale à -172.533 Kcal/Mol.

Cette énergie résulte de la mise en place d'une seule liaison hydrogène entre l'atome d'azote de ( HN-CH<sub>2</sub>-( C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CL ) ) et le résidu : Pro82. Séparés par une distance 3.09 Å.

Les résidus : Pro82, Met132, Met105, Val87, Gln85, Asp144, forment des liaisons stériques avec le composé L9 et deux liaisons d'autres type d'interactions ( liaisons électrostatiques ) entre ( -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>) ) et Asp144 Asp145 .

Le complexe est stabilisé également par des interactions hydropho-

biques avec les résidus : Met132, Phe83, Val87, Gln85, Cys136, Tyr97, Asn140, Leu94, Ile146, Leu92.

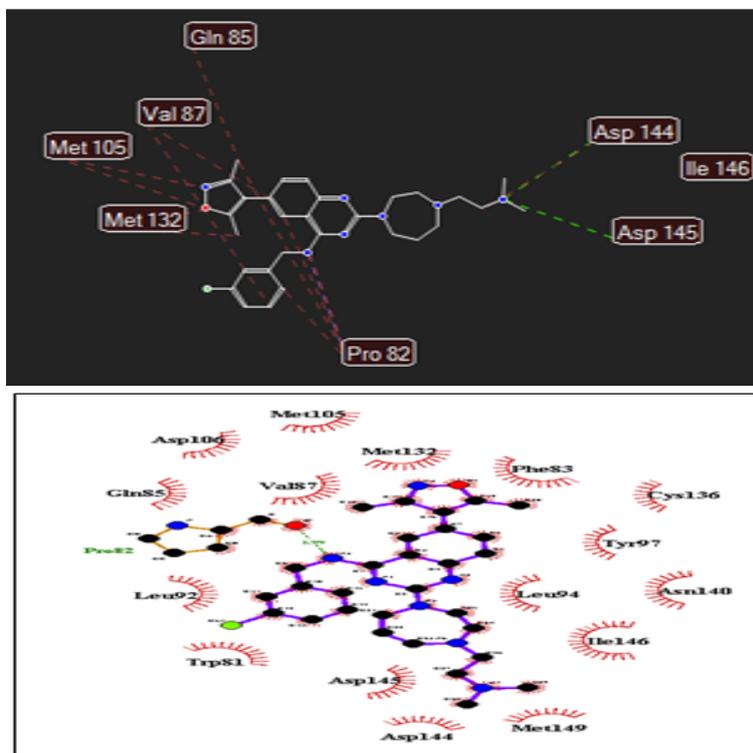


FIGURE 3.13: Interactions entre 6e4a et ligand 9

- **Étude les interactions ligand18 avec 6e4a :**

Après avoir ajouté le radical de ligand 18 . Ce nouveau groupement n'interagit pas avec les résidus de site actif ( figure 3.14 ), mais il change la conformation de ce composé et diminution significative de l'énergie Moldock -180.047 kcal/mol.

Ce composé forme trois liaisons d'hydrogène dont la première se trouve entre l'atome d'azote N du cycle quinazoline et Gln85 séparés par une distance de 3.00Å, la deuxième et la troisième entre la même acide aminée ( Asn140 ) et (l'oxygène , amine) de cycle oxazol ,séparés par les distances 2.68 Å, 2.77 Å .

Les résidus : Asp88, Gln85, Pro82, Pro85, Asp106, Met105, Val87, Tyr87, Ile146 forment des liaisons stériques avec ligand 18 . Des interactions hydrophobiques sont aussi observés avec les résidus : Cys136, Asn140, Pro82, Met105, Phe83, Val87, Pro86, Asp106, Asp88, Leu92, Tyr97, Ile146.

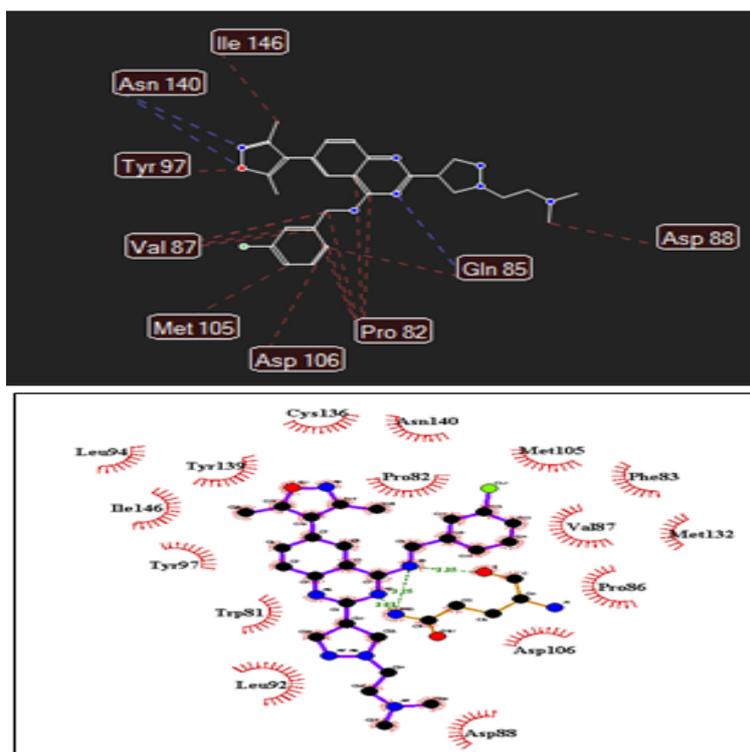


FIGURE 3.14: Interactions entre 6e4a et Ligand 18

- **Étude les interactions ligand19 avec 6e4a :**

La substitution de radicale dans ligand 19 a permis d'augmenter le nombre des liaisons H , entraînant ainsi une diminution de l'énergie Moldock ( -171.462 kcal/mol ) . Ces résultats s'expriment visuellement par la mise en place des nombreuses interactions entre l'enzyme et l'inhibiteur ( figure 3.15 ). On observe la présence de 3 ponts hydrogènes formés, le premier se trouve entre l'atome d'azote N1 du cycle quinazoline et Gln85 séparés par une distance 3.16 Å, la deuxième entre l'oxy-

gène et Asn 140 , la troisième entre la même acide aminée et l'amine d'oxazol séparés les deux par la même distance 2. 71 Å. Les résidus : Val87, Leu94, Trp81, Pro82, Asp144, forment des liaisons stériques avec ligand 19. Enfin, le complexe est stabilisé au sein de la cavité principale de 6e4a par des interactions hydrophobiques par les résidus : Asn140 , Tyr139, Cys136, Asp144, Asp145, Met149, Typ81, Val87, Leu92, Pro82, Tyr97.

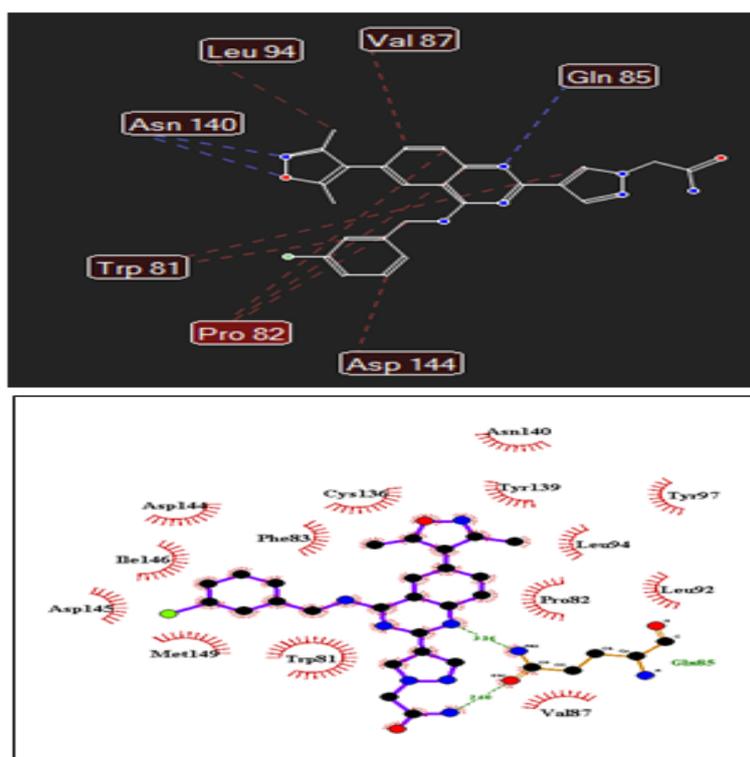


FIGURE 3.15: Interactions entre 6e4a et ligand 19

- **Étude les interactions ligand 23 avec 6e4a :**

Bien que la racine soit modifiée dans le composé 23, les liaisons hydrogènes formées sont similaires à celles du composé 19 avec différence de distance ( 3.17Å ; 2.6Å ; 3.08Å ) ( figure 3.16 ). Le noyau du molécule est stabilise par des interactions hydrophobiques avec les résidus : Met149, Lle146, Asp144, Asp145, Pro82, Lys91, Leu92, Phe83,

Tyr97, Val87, Cys136. Les résidus : Val87, Leu94, Asp88, Pro82, Trp81, Asp144, forment des liaisons stériques avec L23.

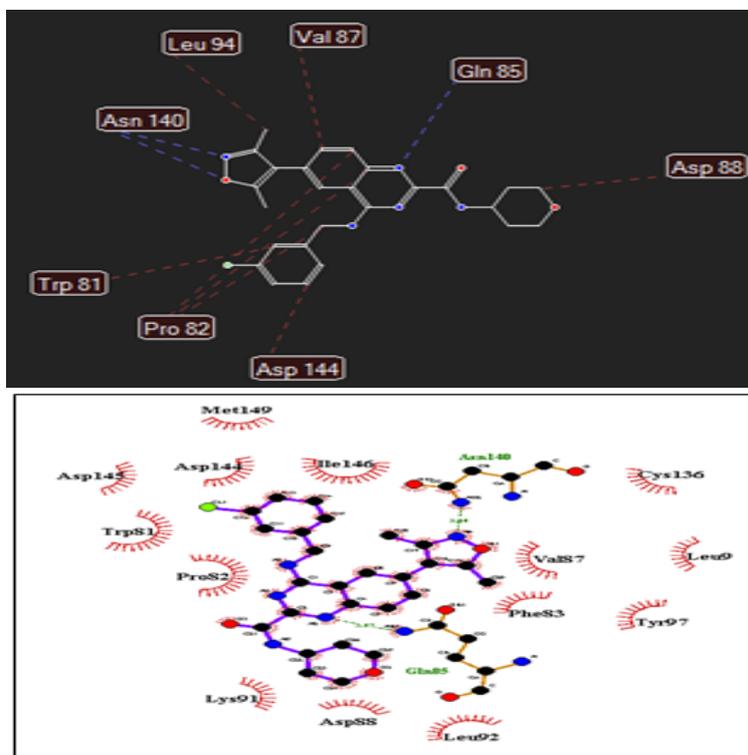


FIGURE 3.16: Interactions entre 6e4a et ligand 23

- **Étude les interactions ligand27 avec 6e4a :**

La visualisation des résultats du docking montre que le complexe ( 6e4a – ligand 27 ) forme plusieurs interactions hydrophobes avec les résidus : Leu92, Val87, Tyr139, Phe83, Tyr97, Ile146, Asn140, Asp144, Met149, Pro82. Le complexe est stabilisé par la même liaisons d'hydrogènes de complexe précédent avec les distances respectivement 3.09 Å , 2.80Å et 2.98 Å.

Les résidus : Trp81, Pro82, Asp144, Leu94, Val 87, forment des liaisons stériques avec ligand 27 ( figure 3.10).

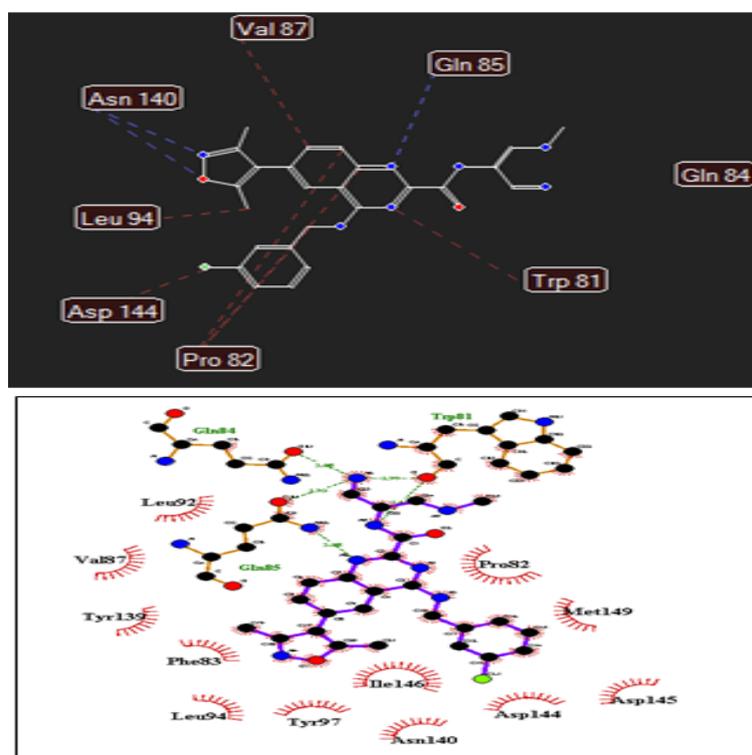


FIGURE 3.17: Interactions entre 6e4a –ligand 27

### 3.2.3.3 Règle de Lipinski :

Chaque médicament éventuel doit de se conformer à plusieurs critères de base, tel son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité. Dans ce contexte, « la règle de 5 » communément appelé « règle de lipinski» permet de déterminer si un composé chimique ayant des propriétés médicamenteuses est susceptible d'être administré par voie orale chez les humains. Selon cette règle, un composé est capable d'être administré par voie orale s'il remplit au moins trois (3) critères des cinq (5) suivants :

- Un poids moléculaire maximum de 500 g/mol ( $PM \leq 500$ ) .
- Un coefficient de partition  $\log P \leq 5$ .

- Le nombre de donneurs de liaisons Hydrogène , atomes d'azote ou oxygène avec un ou plusieurs atomes d'hydrogènes  $\leq 5$ .

- Le nombre d'accepteurs de liaisons Hydrogène , atomes d'azote ou oxygène  $\leq 10$ .

- Log P est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. Le  $\text{LogP} = \text{Log} (C_{\text{oct}} / C_{\text{eau}})$ , doit être compris entre -2 et 5. Cette valeur permet de déterminer le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. S'il est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement [77].

- Les liaisons hydrogènes augmentent la solubilité dans l'eau et doivent être rompues pour que le composé pénètre dans et à travers la membrane bicouche lipidique. Ainsi, un nombre croissant de liaisons hydrogène se divise de la phase aqueuse dans la membrane bicouche lipidique pour la perméation par diffusion passive [120].

- Le poids moléculaire (MW) est lié à la taille de la molécule. Lorsque la taille moléculaire augmente, une cavité plus grande doit être formée dans l'eau pour solubiliser le composé.

- Le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène (O et N atomes) et le nombre de donneurs de liaison hydrogène (NH et OH) se sont révélés critiques dans un contexte de développement de médicaments car ils influencent l'Absorption et la perméation [7].

TABLE 3.11: les paramètres de Lipinski des dérivés de quinazoline

Composé	N°ON	N°OHNH	M (uma)	LogP	Nombre de violations
<b>L7</b>	8	1	534.11	5.35	2
<b>L9</b>	8	1	520.08	5.08	2
<b>L18</b>	8	1	502.02	4.27	1
<b>L19</b>	9	3	487.95	3.42	0
<b>L23</b>	8	2	491.98	3.87	0
<b>L27</b>	9	4	487.97	3.19	0
<b>Lréf</b>	8	1	532.09	4.89	1

PM : poids moléculaire ;

nOH,NH : nombre de donneurs de liaisons H ;

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

logP : coefficient de partition calculé .

Les résultats du (tableau 3.11) montrent que :

- Les valeurs de coefficient de partage supérieur à 5 pour les composés L7, L9 qui montrent que ces composés ont une faible solubilité dans l'eau et donc une faible absorption et pénétration en raison d'une faible perméabilité due à la propagation négative.

On observe aussi des valeurs de coefficient de partage inférieur à 5 pour les composés L18, L19, L23 et L27 on peut dire que Ces composés sont trop lipophiles. Donc, ils ont une bonne perméabilité à travers la membrane biologique, et une meilleure liaison aux protéines plasmatiques, l'élimination par le métabolisme, mais une mauvaise solubilité et la tolérance gastrique .

- On remarque que les composés L7, L9 et L18 ayant des masses mo-

léculaire supérieur à 500 DA , l'augmentation du poids moléculaire réduit la concentration en composé à la surface de l'épithélium intestinal, réduisant ainsi l'absorption . L'augmentation de la taille entrave également la diffusion passive à travers les chaînes latérales aliphatiques très serrées de la membrane bicouche . Mais les autres composés L19, L23 et L27 ont des valeurs de masse moléculaire inférieure à 500 DA donc les composés sont solubles et traversent facilement les membranes cellulaires .

- Le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène (O et N atomes) est inférieur à 10 et le nombre de donneurs de liaison hydrogène (NH et OH) est inférieur à 5, dans toutes les composés donc ils sont bons Absorption et perméation. Á l'issue de ce test, les composés L19 , L23, L18 et L27 se présentent comme étant de nouveaux inhibiteurs théoriques de BRD4, pouvant être administrés par voie orale, ce conformément à la règle de Lipinski.

#### 3.2.3.4 Étude les propriétés physico-chimiques des molécules sélectionnés (drug-likeness prediction)

Les propriétés moléculaires liées au caractère médicamenteux ont été calculées à l'aide le logiciel MolSoft et sont présentées dans le (tableau 3.12).

Notez dans le tableau que les valeurs de solubilité des composés étudiés est faible (la valeur optimale d'est supérieure à  $-4 \log \text{ mol / L}$  (en raison du grand volume de composés (plus de 450)), où la solubilité du médicament est souvent intrinsèquement liée à la taille de particule du médicament quand une particule devient plus petite, le rapport surface / volume augmente, la plus grande surface permet une plus grande interaction avec le solvant, entraînant une solubilité accrue. Composés avec des valeur des  $\log P$  élevés sont plus apolaires et ont une faible solubilité dans l'eau. [88]

La solubilité des médicaments dans l'eau affecte de près leur activité bio-

TABLE 3.12: Propriété physicochimique de base des ligands de test et ligand référence

Propriété physico-chimique	L18	L19	L23	L27	Lréf
LogD7.4	2.991	2.628	2.981	2.894	2.837
Mol logs (mol/l)	-6.58	-6.66	-7.28	-6.87	-5.06
Mol PSA (Å <sup>2</sup> )	69.52	90.27	83.21	102.47	55.66
Mol Vol (Å <sup>3</sup> )	482.47	537.83	460.83	472.68	558.14
Drug-likeness score	1.84	2.15	1.78	1.49	2.39

logique. C'est l'un des facteurs importants déterminant la biodisponibilité orale. Une faible solubilité nuit à une bonne et complète absorption orale.

La lipophilicité est représentée par le descripteur logD, est utilisée pour aider à prédire la perméabilité in vivo des composés actifs dans la découverte de médicaments.

Le coefficient de distribution, est le descripteur approprié pour les composés ionisables puisqu'il est une mesure de la solubilité différentielle dépendant du pH de toutes les espèces dans le système octanol / eau. Pour le coefficient de distribution D les valeurs obtenues sont dans l'intervalle  $1 < \text{Log D7-4} < 3$  : C'est une gamme idéale. Ces composés ont généralement une bonne absorption intestinale, grâce à un bon équilibre solubilité / perméabilité à la diffusion passive.

TPSA (Surface polaire topologique) est un paramètre physicochimique très utile des composés qui donne des informations sur la polarité des composés. La surface polaire (PSA) qui est formée par des atomes polaires d'une molécule. C'est un descripteur qui montre une bonne corrélation avec le transport moléculaire passif à travers les membranes, et permet donc d'estimer les propriétés de transport des médicaments.

Nous remarquons que tous les composés étudiés ont des valeurs inférieures

à 140 Å<sup>2</sup> ce qui montre la bonne prédiction de la biodisponibilité orale et le transport à travers les membranes.

La ressemblance à un médicament (drug-likeness) est définie comme un équilibre complexe de diverses propriétés moléculaires et caractéristiques de structure (principalement l'hydrophobie, la distribution électronique, les caractéristiques de liaison hydrogène et la taille de la molécule) qui déterminent si une molécule donnée est similaire au médicament connu. MolSoft utilise des empreintes digitales chimiques pour prédire le score de similarité des drogues.

Comme le montre la ( figure 3.18 ), la couleur verte indique un comportement autre que celui de la drogue et la couleur bleue est considérée comme semblable à la drogue (drug-likeness). Les scores calculés de similarité au médicament sont présentés dans le ( tableau 3.12) . Les composés ne sont ni nuls ni négatifs et doivent donc être considérés comme des médicaments similaires.

Ce résultat assure que les molécules testées sont de bonnes molécules bio-actives pouvant être utilisées comme inhibiteurs du BRD4.

Le score maximum (drug-likeness) s'est révélé être de (2.15) pour L19. score est très comparables au ligand de référence (2.39), ( tableau 3.6).

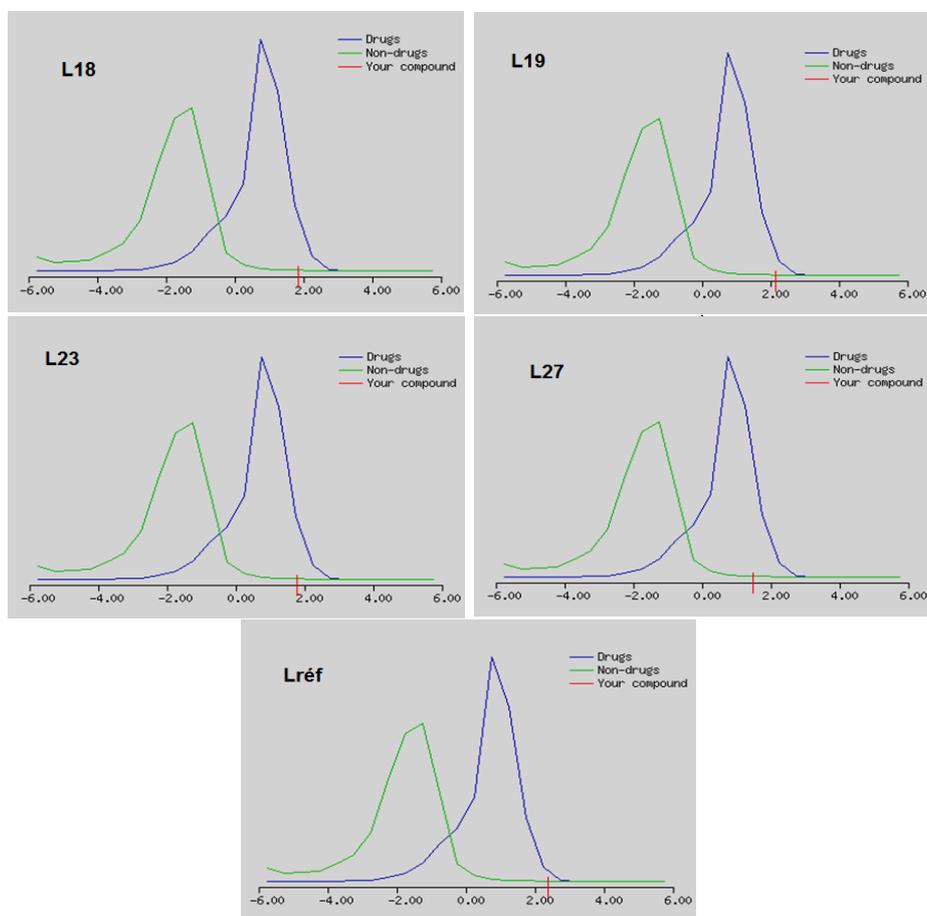


FIGURE 3.18: Les diagrammes du résultats du modèles drug likeness

### 3.2.3.5 ADME (absorption, distribution, métabolisme, élimination)

Les paramètres ADME prédites ont été résumées dans le tableau suivant :

TABLE 3.13: L'ADME profile des ligands de test et ligand référence

Catégorie	Propriété	L19	L23	L27	L18	Lréf
Absorption	Caco-2 (cm/s)	-5.394	-5.246	-6.071	-5.122	-5.071
	HIA	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		0.731	0.699	0.682	0.760	0.768

<b>Distribution</b>	VD (l/kg)	-0.464	-0.22	-0.408	0.433	0.616
	BBB	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
		0.788	0.855	0.705	0.862	0.864
<b>Métabolisme</b>	CYP1A2- Inhibiteur	0.608 (+)	0.563 (+)	0.533 (+)	0.655 (+)	0.360 (-)
	CYP1A2- Substrat	(-) 0.411	(-) 0.416	(-) 0.454	(+) 0.535	(+) 0.586
	CYP3A4- Inhibiteur	(+) 0.900	(+) 0.850	(+) 0.864	(+) 0.902	(+) 0.647
	CYP3A4- Substrat	(+) 0.530	(+) 0.578	(+) 0.582	(+) 0.658	(+) 0.760
	CYP2C19- Inhibiteur	(+) 0.701	(+) 0.697	(+) 0.749	(-) 0.492	(-) 0.078
	CYP2C19- Substrat	(-) 0.314	(-) 0.387	(-) 0.331	(+) 0.550	(+) 0.515
	CYP2C9- Inhibiteur	(-) 0.388	(-) 0.401	(+) 0.556	(-) 0.304	(-) 0.244
	CYP2D6- Inhibiteur	(+) 0.568	(+) 0.554	(+) 0.558	(+) 0.657	(+) 0.576
	CYP2C9- Substrat	(-) 0.393	(-) 0.423	(-) 0.379	(-) 0.444	(-) 0.375
	CYP2D6- Substrat	(-) 0.346	(-) 0.410	(+) 0.514	(-) 0.448	(-) 0.493
<b>Excrétion</b>	Clairance (ml/min/kg)	1.229	1.285	1.218	1.598	1.47
	Demi de vie (t <sub>1/2</sub> ) (h)	1.981	1.935	1.83	2.107	1.915

**Absorption :** L'absorption peut être conçue en termes simples comme le processus de déplacement d'un médicament d'un site d'administration extravasculaire dans la circulation systémique. Ce processus est en effet très complexe et dépend des nombreux paramètres dont la perméabilité et la solubilité du composé sont des facteurs cruciaux. Comme nous avons déjà analysé le paramètre de solubilité l'étude précédente, nous poursuivons ici avec la perméabilité. En ce qui concerne les médicaments oraux, une fois qu'ils atteignent le tractus gastro-intestinal, ils doivent pouvoir se déplacer à travers les membranes biologiques pour pénétrer dans la circulation systémique. La perméation peut se produire via la diffusion transcellulaire, la diffusion paracellulaire et les mécanismes médiés par le transporteur.

Les propriétés ADMET, dérivées du serveur ADMETLAB, révèlent que le ligand 18 a une meilleure absorption intestinale (HIA) que le CN750. Une HIA élevée indique que le composé peut être mieux absorbé par le tractus gastro-intestinal lors d'une administration orale.

Les cellules Caco-2 constituent une lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique, dans certaines conditions de culture, ces cellules ont la capacité de se différencier spontanément en cellules intestinales polarisées pour former un épithélium imitant une barrière intestinale fonctionnelle (présence de microvillosités, jonctions serrées, transporteurs spécifiques, enzymes du processus de métabolisation, etc.).

Le test sur cellules Caco-2 permet d'évaluer la perméabilité intestinale d'un composé chimique, c'est-à-dire sa capacité à traverser la paroi intestinale pour atteindre la circulation sanguine et se répartir dans le corps.

La valeur optimale : supérieure à -5.15. nous notons que le ligand 18 donne le meilleur score par rapport aux autres molécules.

**La distribution :** la distribution médicament fait référence à la distribution du composé dans différents compartiments de l'organisme. Parmi les paramètres pouvant être étudiés *in silico* avec un certain degré de précision,

on peut citer la pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BBB) ou du système nerveux central (SNC) .

Les résultats de pénétration à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB) se sont avérés être les meilleurs pour le ligand 18 et, pour le ligand 23, sont proches de ceux de la molécule de référence CN750.

Le serveur ADMETLAB donne également une valeur prévue pour le volume de distribution (DV), qui est la constante de proportionnalité entre la quantité de médicament dans le corps et les concentrations plasmatiques, il est exprimé en unités de volume. Calcule une dose de charge pour atteindre immédiatement les concentrations efficaces. Le résultat révèle une valeur raisonnable pour le ligand 18 par rapport au CN750.

Volumes de distribution les plus importants : avec les substances les plus lipophiles.

Il est connu qu'une forte pénétration est nécessaire pour la plupart des médicaments devant pénétrer dans le système nerveux central (SNC). Une molécule doit d'abord traverser la barrière hémato-encéphalique avec des mécanismes de diffusion passive transcellulaire et / ou de transport actif. Cependant, la pénétration de la BHE doit être minimisée pour les médicaments ne faisant pas partie du système nerveux central afin de réduire le risque d'événements pharmacologiques indésirables et d'une neurotoxicité potentielle. Il a été suggéré que, globalement, comparés aux médicaments ne faisant pas partie du système nerveux central, les médicaments du système nerveux central ont tendance à être plus lipophiles (une valeur de log D comprise dans la plage de 1 à 3 est recommandée), plus rigides, de poids moléculaire inférieur ( $\leq 500 Da$ ) moins d'accepteurs des liaisons hydrogène ( $\leq 5$ ), moins des charges formelles (notamment des charges négatives) et un PSA plus faible ( $\leq 80 \text{ \AA}$ ). Ici, ensembles de données par ordre : L18 et Lréf (86%), L23 (83%), L19 (78%) et L27 (70%) (tableau 3.7).

**Métabolisme** : La super famille du cytochrome P450 joue un rôle im-

portant dans le métabolisme et la clairance du foie, et les isoformes les plus importantes sont le CYP1A2, le CYP2A6, le CYP2C9, le CYP2C19, le CYP2D6, le CYP2E1 et le CYP3A4 .[133] Ainsi, l'inhibition des isoformes du cytochrome P450 peut provoquer des interactions médicamenteuses dans lesquelles les médicaments coadministrés ne sont pas métabolisés et s'accumulent à des niveaux toxiques .[80]

Le ligand 18 était un substrat / non inhibiteur dans la majorité des enzymes cyp450, Ceci est dû à sa caractère lipophilie.

La lipophilie composée joue un rôle majeur dans le substrat liaison aux cytochromes P450 dans les systèmes mammifères et cela a une incidence sur la clairance globale de ces composés. En gros, plus la valeur de log P est grande pour un produit chimique, plus il sera avide de se lier à un P450 donné enzyme, bien que, après un certain point, l'affinité de liaison (et probablement la clairance) vont commencer à baisser avec log P, car le composé deviendra trop hydrophobe.[74]

les dérivés L23, L27, L19 et L18 d'être métabolisé par l'enzyme CYP3A4 (Tableau3.10). Le CYP 3A4 est connu pour métaboliser la moitié des médicaments.

la plupart (sauf L18) eux ont présenté une inhibition des isomères du cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2D9 et CYP2D6).

Ils démontrent une bonne interaction avec les protéines oxydantes, ils peuvent donc être utilisés comme inhibiteurs puissants et actifs de ces protéines.

### **Élimination :**

La demi-vie ( $t_{1/2}$ ), généralement exprimée en heures, correspond au temps nécessaire pour que la quantité (ou la concentration) d'un médicament dans le plasma diminue de moitié.  $t_{1/2}$  Proportionnel au volume de distribution Vd ; est inversement proportionnel à la Clairance.

Clairance plasmatique, La capacité globale de l'organisme à éliminer une

molécule est la clairance, définie comme le volume de plasma totalement épuré par unité de temps ; elle est ainsi habituellement exprimée comme un débit en ml/min.

Le test révèle que toutes les molécules ont donné des résultats ( $t_{1/2}$  et Clairance) proches de ligand de référence.

### 3.2.3.6 Études de prévision de la toxicomanie

La prédiction *in silico* de la similarité des médicaments, associée à d'autres outils ADME / Tox, offre un éventail d'opportunités qui aident à accélérer la découverte de nouvelles cibles et conduisent finalement à des composés ayant une activité biologique prédite. ( tableau 3.14 ) décrit les paramètres de toxicité dans notre ligands.

TABLE 3.14: Profil la toxicité des ligands à tester

Catégorie	Propriété	L19	L23	L27	L18	Lréf
Toxicité	<b>hERG</b>	(+) 0.768	(+) 0.922	(+) 0.674	(+) 0.876	(+) 0.936
	<b>H-HT</b>	(+) 0.922	(+) 0.95	(+) 0.81	(+) 0.79	(-) 0.422
	<b>Ames</b>	(+) 0.552	(+) 0.528	(-) 0.374	(+) 0.56	(-) 0.348
	<b>LD50(mg/kg)</b>	1600	1000	1000	1500	2000

Les essais toxicologiques fondés sur les mécanismes, entre autres, traitent du rôle des canaux ioniques dans les réactions indésirables aux médicaments, le canal génique humain associé au canal potassique (canal hERG) étant le représentant principal. Le canal hERG est responsable de la repolarisation du ventricule et donc essentiel pour une activité cardiaque normale.

L'inhibition peut entraîner une arythmie cardiovasculaire grave, et même des cas de mort subite ont été rapportés. Comme il s'agit d'une protéine à forte promiscuité, elle est considérée comme un anti-cible classique du profilage de la sécurité [121]. Tous les ligands ont une probabilité de blocage HREG inférieure à celle du ligand de référence.

Le test de toxicité AMES est utilisé pour savoir si un composé est mutagène ou non. Comme pour le ligand de référence, **Le ligand 27** testé **avait** un test de toxicité AMES négatif, ce qui signifie que les ligands sont non mutagènes. Le profil cancérogène a également révélé que les ligands étaient non cancérogènes, à l'instar du ligand de référence.

Le score d'hépatotoxicité prédit la nature hépatotoxique des composés chimiques.

Les valeurs H-HT des composés se situent dans la plage de 0.79 à 0.95. Par conséquent, les composés sont susceptibles de présenter une hépatotoxicité. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les niveaux de dose hépatotoxiques.

Les informations importantes obtenues du serveur admetLAB étaient la dose DL50 calculée. En comparant les doses de DL50, un composé contenant une dose inférieure est plus mortel que le composé ayant une DL50 supérieure. D'après nos observations, nous avons constaté que tous les ligands avaient la plus élevée le DL50, comparé au CN750. Les valeurs de DL50 vont de 1000 mg / kg à 1600 mg / kg. Ces hautes des valeurs de DL50 suggèrent une sécurité plus élevée de ces composés, même à des doses élevées, comme indiqué par les études computationnelles.

Avec ces résultats encourageants, tous les composés peuvent être explorés plus avant pour une modification structurelle et des investigations détaillées afin d'arriver à de nouveaux agents potentiellement plus puissants avec une meilleure activité thérapeutique. Notre étude admetlab a révélé que, en comparant et en analysant tous les paramètres, L18 pouvait être projetée comme

un puissant inhibiteur de BRD4. Ses propriétés ADMET ont montré beaucoup de similitude avec ligand référence CN750 qui est déjà dans l'essai clinique avancé.

### **3.2.3.7 Score de bioactivité**

Le score de bioactivité des molécules sélectionnés a également été évalué à l'aide de l'outil serveur Molsoft Cheminformatics ( <http://www.molsoft.com> ) modèles de criblage développés pour quatre classes de médicaments importantes, à savoir les ligands de GPCR, les bloqueurs de canaux ioniques, les inhibiteurs de kinase et les ligands de récepteurs nucléaires.

L'activité biologique est prédite par le score de bioactivité classé dans trois plages différentes :

- a) Si le score de bioactivité est supérieur à 0.00, avoir une activité biologique considérable.
- b) Si le score de bioactivité est compris entre 0.5 et 0.00, avoir une activité modérée.
- c) Si le score de bioactivité est inférieur à -0.50, avoir une inactivité.

Les résultats de la présente étude ont démontré que les composés étudiés sont des molécules biologiquement actives et produiront les actions physiologiques en interagissant avec les ligands de GPCR, l'inhibiteur de kinase et l'inhibition de l'enzyme.

Les molécules 23 et 27 possèdent un score de bioactivité pour l'activité du modulateur de canal ionique se situait entre 0.00 et -0.50, suggérant une interaction modérée avec cette cible. les autres molécules étant inactives vis-à-vis de cette cible médicament. Des résultats similaires sont obtenus pour l'inhibition de la protéase et seul le composé 23 a un score supérieur à -0.50, Les scores de bioactivité du ligand des récepteurs nucléaires, de l'inhibition de l'enzyme se situaient dans la gamme inférieure à 0.00 suggèrent une inactivité biologique des molécules.

Le résultat de cette étude a été trouvé que les molécules sélectionnées sont biologiquement actives. Le composé le plus prometteur a été identifié comme 18 pour lequel un score de bioactivité de 0.31, 0.44 et 0.11 a été obtenu pour le ligand GPCR, l'inhibiteur de kinase et l'inhibition de l'enzyme respectivement.

TABLE 3.15: Score de bioactivité des ligands et ligand référence

Molécules	GPCR li- gand	Modula- teur de canal ionique	Inhibiteur Kinase	Ligand de récepteur nucléaire	Inhibiteur de pro- téase	Inhibiteur d'enzymes
<b>L18</b>	0.31	-0.13	0.44	-0.24	-0.19	0.11
<b>L19</b>	0.19	-0.18	0.34	-0.32	-0.18	0.06
<b>L23</b>	0.29	0.10	0.29	-0.24	0.05	0.10
<b>L27</b>	0.21	0.01	0.25	-0.31	-0.01	0.13
<b>Lréf</b>	0.34	0.01	0.56	-0.14	-0.03	0.25

# Conclusion générale

Ce travail autour de la conception d'inhibiteur de haute affinité de Brd4 protéine. Dans un premier temps nous avons appliqué un criblage virtuel des 27 molécules de dérivés de Quinazoline en vers le site actif de l'enzyme 6e4a (BRD4) nous a permis d'évaluer leur score et de faire ressortir les composés : (L7, L9, L18, L19, L23 et L27) comme des inhibiteurs potentiels et puissants de la brd4. Grâce au programme VMD, nous avons pu visualiser le positionnement correct de ces composés dans la cavité catalytique de la brd4 en prenant comme repère l'emplacement de l'inhibiteur de référence CN750 ce qui apporte la preuve de la sélectivité de ces composés envers le site actif étudié.

Les différentes interactions entre ces ligands et les résidus du site actif ont montré une bonne affinité avec des ligands étudiés tels que le résidu catalytique Leu92 et Val87 qui ont établi des interactions avec la majorité des dérivés quinazoline. En outre, des liaisons hydrogène dans la plupart des complexes sont établis avec les résidus Gln85 et Asp140.

L'analyse des résultats obtenus permet de déterminer deux types d'interactions responsables de l'affinité de ces ligands à ces enzymes, les liaisons hydrogènes et interaction de VDW. Cette affinité traduit la stabilité du ligand étudié dans le site actif et favorisent leur fixation ce qui aurait pour résultat une inhibition potentielle d'enzyme cible. Le ligand L18 s'avère être le meilleur inhibiteur parmi les six ligands car il forme le complexe le plus stable avec brd4.

Dans un deuxième temps, nous avons validé la règle de Lipinski sur les 6 meilleurs inhibiteurs de la protéine 4 contenant bromodomaine, Les résultats montrent que les composés L18, L19, L23 et L27 s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères imposés par la règle de Lipinski.

Enfin, Nous avons appliqué une étude ADME ( d'absorption, de digestion, de métabolisme et d'excrétion ) et Drug-likeness pour déterminer les propriétés physico-chimiques et des propriétés bioactives des 4 composés. Les quatre composés ont un profil pharmacocinétique et de toxicité acceptable.

Les résultats montrent que Le composé L18 a une meilleure absorption intestinale (HIA) et a une bonne probabilité de pénétration à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB) se sont avérés être les meilleurs que la molécule de référence CN750.

Le ligand 18 était un substrat / non inhibiteur dans la majorité des enzymes cyp450, Ce ci est dû à sa caractère lipophilie.

En plus, le composé L18 à un score de bioactivité de 0,31, 0,44 et 0,11 a été obtenu pour le ligand GPCR, l'inhibiteur de kinase et l'inhibition de l'enzyme respectivement.

Ces résultats montrent que le composé L18 peuvent se présenter de nouveau inhibiteur de protéine 4 contenant bromodomain pour le traitement anti cancéreux.

# Bibliographie

- [1] P ANAND et al. “BET Bromodomains Mediate Transcriptional Pause Release in Heart Failure”. In : *Cell* (2013), p. 569–582.
- [2] P.P BALGIR et M SHARMA. “Biopharmaceutical Potential of ACE-Inhibitory Peptides”. In : *Proteomics Bioinformatics* (2017), p. 173.
- [3] A.J BANNISTER et T KOUZARIDES. “The CBP co-activator is a histone acetyltransferase”. In : *nature* (1996), p. 641–643.
- [4] M. G BARATTA et al. “An in - tumor genetic screen reveals that the BET bromodomain protein, BRD4, is a potential therapeutic target in ovarian carcinoma”. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015), p. 232–237.
- [5] A.J BARR et al. “Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome”. In : *Cell* (2009), p. 352–363.
- [6] P.H BEAUNE. “Les cytochromes P450 humains”. In : *Thérapie* (1993), p. 521–526.
- [7] G. W BEMIS et M. A MURCKO. “The Properties of Known Drugs. 1. Molecular Frameworks”. In : *Medicinal Chemistry* (1996), p. 2887.
- [8] H BOUCHERIT. “Etude théorique des interactions intervenant dans l’inhibition de la méthionine aminopeptidase de mycobacteriumtuberculosis par diverses molécules”. Thèse de doct. Université mentouri constantine, 2012.

- [9] P BRAIUCA et al. “Computational”. In : *Trends Biotechnology* (2006), p. 419–425.
- [10] B.D BURSULAYA, M TROTOV et R ABAGYAN. “Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking.” In : *Computer-Aided Molecular Design* (2004), p. 755–763.
- [11] B.R CAIRNS et al. “RSC, an essential, abundant chromatin - remodeling complex”. In : *Cell* (1996), p. 1249–1260.
- [12] *Calculation of molecular properties. Molinspiration*. Consulté le : 2018. URL : <http://www.molinspiration.com>.
- [13] G CALORI et al. “Prevalence, metabolic features, and prognosis of metabolically healthy obese Italian individuals : the Cremona Study”. In : *Diabetes Care* (2011), p. 210–215.
- [14] G CHARLEMAGNE. *études des propriétés cytotoxiques et unive antiradicalaires d’extraits de feuilles et de galles*. 2009.
- [15] P. CHUA et ROEDER. “Bdf1, a yeast chromosomal protein required for sporulation”. In : *Mol. Cellule. Biol* (1995), p. 3685–3696.
- [16] C.W CHUNG et al. “Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET family bromodomains”. In : *J Med Chem* (2011), p. 3827–3838.
- [17] R.D CLARK et al. “Consensus Scoring For Ligand/Protein Interactions”. In : *Molecular Graphics And Modelling* (2002), p. 281.
- [18] C.R CORBEIL, Englebienne P et N MOITESSIER. “Docking Ligands Into Flexible And Solvated Macromolecules-1. Development And Validation Of Fitted 1.0.” In : *Journal Of Chemical Informatic Modelling* (2007), p. 435–449.
- [19] N.P CRAWFORD et al. “Bromodomain 4 activation predicts breast cancer survival”. In : *Proc Natl Acad Sci USA* (2008), p. 6380–6385.

- [20] D CUNNINGHAM et al. “Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer”. In : *N Engl J Med* (2004), p. 337–345.
- [21] I DAOUD. “Modélisation de l’interaction des ions de métaux lourds avec des colorants”. Thèse de doct. Université Abou Bekr Belkaid, 2015.
- [22] E.B DE OLIVEIRA. “Simulation moléculaire appliquée à l’acétylation de flavonoïdes catalysés par des lipases : influence des structures de la lipase et des flavonoïdes sur la régiosélectivité de la bioconversion”. Thèse de doct. Nancy : Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009.
- [23] J.E DELMORE et al. “BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target C-Myc”. In : *Cell* (2011), p. 904–917.
- [24] A DEY et al. “A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G2-to-M transition”. In : *Mol. Cellule. Biol* (2000), p. 6537–6549.
- [25] A DEY et al. “The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis”. In : *Proc. Natl. Acad. Sci* (2003), p. 8758–8763.
- [26] C DHALLUIN et al. “Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain”. In : *Nature* (1999), p. 491–496.
- [27] F DOSSOU-YOVO. “Modification de la biodisponibilité orale des médicaments : interactions “ Herb-Drugs ” “ Drugs- Drugs””. In : (2014).
- [28] D DOUGUET. “Etude des interactions protéine-protéine et protéine-ligand par bio- et chimie-informatique structurale : Identification de petites molécules bio-actives”. Thèse de doct. Université de Nice-Sophia Antipolis, 2007.

- [29] K EL HADJ SAID. *Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire*. 2016.
- [30] L.K ELFRING et al. "Genetic analysis of brahma : the Drosophila homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2". In : *Genetics* (1998), p. 251–265.
- [31] L.K ELFRING et al. "Identification and characterization of Drosophila relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2". In : *Mol Cell Biol* (1994), p. 2225–2234.
- [32] A FARINA et al. "Bromodomain protein Brd4 binds to GTPase - activating SPA - 1, modulating its activity and subcellular localization". In : *Mol.Cell.Biol* (2004), p. 9059–9069.
- [33] M FEHER. "Consensus Scoring For Protein–Ligand Interactions." In : *Drug Discovery Today* (2006), p. 421–428.
- [34] N FÉREY et al. "Docking De Protéines En Réalité Virtuelle : Une Approche Hybride et Multimodale". In : *2e Soumission A Rsti* (2008), p. 10.
- [35] P FILIPPAKOPOULOS et S KNAPP. "Targeting Bromodomains : Epigenetic Readers of Lysine Acetylation". In : *Nat Rev Drug Discovery* (2014), p. 337–356.
- [36] P FILIPPAKOPOULOS et al. "Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family". In : *Cellule* (2012), p. 214–231.
- [37] P FILIPPAKOPOULOS et al. "Selective Inhibition of BET Bromodomains". In : *Nature* (2010), p. 1067–1073.
- [38] C.Y FONG et al. "BET Inhibitor Resistance Emerges From Leukaemia Stem Cells". In : *Nature* (2015), p. 538–542.

- [39] E FONTANA. *Les inhibiteurs "suicides" des Cytochromes P450 : Etablissement d'une banque de données, mise au point d'un test de screening et études structures-activité concernant des substrats furaniques du CYP 3A4*. 2005.
- [40] D GAGNON et al. "Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain- containing protein 4". In : *J Virol* (2009), p. 4127–4139.
- [41] L.J GANSHEROFF et al. "The *Saccharomyces cerevisiae* SPT7 gene encodes a very acidic protein important for transcription in vivo". In : *La génétique* (1995), p. 523–536.
- [42] D. K GEHLHAAR et al. "Docking Conformationally Flexible Small Molecules Into a Protein Binding Site Through Evolutionary Programming". In : *Proceedings of the Fourth International Conference on Evolutionary Programming* (1995), p. 615–627.
- [43] W.J GELDENHUYS et al. "Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery". In : *Drug Discovery Today* (2006), p. 127–132.
- [44] H GRONEMEYER, JA GUSTAFSSON et V LAUDET. "Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily". In : *Nat Rev Drug Discov* (2004), p. 950–964.
- [45] A GROSDIDIER. "Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de Nouvelles molécules actives". Thèse de doct. Université Joseph Fourier, 2007.
- [46] Y GU et al. "The t(4;11) chromosomal translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene". In : *Cell* (1992), p. 701–708.

- [47] L GUARENTE. “Transcriptional coactivators in yeast and beyond”. In : *Trends Biochem Sci* (1995), p. 517–521.
- [48] F.P GUENGERICH. “Characterization of human cytochrome P450 enzymes”. In : *FASEB J* (1992), p. 745–748.
- [49] F.P GUENGERICH. “Human cytochrome P-450 enzymes”. In : *Life Sci* (1992), p. 1471–1478.
- [50] D HAY et al. “The Design and Synthesis of 5 - and 6 - Isoxazolylbenzimidazoles as Selective Inhibitors of the BET Bromodomains”. In : *Med Chem Comm* (2013), p. 140–144.
- [51] SR HAYNES et al. “The bromodomain : a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins”. In : *Nucl Acids Res* (1992), p. 2603.
- [52] A.G HINNEBUSCH et G.R FINK. “Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*”. In : *Proc Nat’l Acad Sci USA* (1983), p. 5374–5378.
- [53] D HOUZELSTEIN et al. “Growth and Early Postimplantation Defects in Mice Deficient for the Bromodomain-Containing Protein Brd4”. In : *Mol. Cell. Biol* (2002), p. 3794–3802.
- [54] B HUANG et al. “BRD4 coactivates transcriptional activation of NF- $\kappa$ B via specific binding to acetylated RelA”. In : *Mol Cell Biol* (2009), p. 1375–1387.
- [55] B.P HUDSON et al. In : *J Mol Biol* (2000), p. 355–370.
- [56] A JAIN. “Scoring Functions For Protein-Ligand Docking”. In : *Current Protein And Peptide Science* (2006), p. 407–420.
- [57] F JEANMOUGIN et al. “The bromodomain revisited”. In : *Trends Biochem Sci* (1997), p. 151–153.

- [58] Y.W JIANG et al. “Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways”. In : *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998), p. 8538–8543.
- [59] Dong JIE et al. “ADMETlab a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database”. In : *Cheminform* (2018), p. 22–23.
- [60] M JUNG et al. “Targeting BET bromodomains for cancer treatment”. In : *Épigénomique* (2015), p. 487–501.
- [61] T KANNO et al. “Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells”. In : *Mol.Cell* (2004), p. 33–43.
- [62] J.A KENNISON et J.W TAMKUN. “Dosage-dependent modifiers of Polycomb and Antennapedia mutations in *Drosophila*”. In : *Proc Natl Acad Sci USA* (1988), p. 8136–8140.
- [63] E KORB et al. “BET Protein Brd4 Activates Transcription in Neurons and BET Inhibitor Jq1 Blocks Memory in Mice”. In : *Nat Neurosci* (2015), p. 1464–1473.
- [64] D.R KRISHNA et U KLOTZ. “Extrahepatic metabolism of drugs in humans”. In : *Clin Pharmacokinet* (1994), p. 144–160.
- [65] M.H KUO et al. “Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histone H3 and H4 at specific lysines”. In : *Nature* (1996), p. 269–272.
- [66] F LAMOUREUX et al. “Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle”. In : *Nat. Commun* (2014), p. 3511.
- [67] I LAOUAR. “Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas des inhibiteurs de l’acétylcholinestérase”. Thèse de doct. Université d’EL-Oued, 2015.

- [68] R.A. LASKOWSKI et M.B SWINDELLS. “LigPlot+ : Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery”. In : *Journal of Chemical Information and Modeling* (2011), p. 2778–2786.
- [69] M LAURENT.BOURGUIGNON. “Modélisation pharmacocinétique - pharmacodynamique et techniques de simulation appliquées à l'évaluation de stratégies thérapeutiques en infectiologie”. Thèse de doct. L'université claudes bernard lyon 1, 2009.
- [70] B AL-LAZIKANI, Xiang JUNG JAND Z et Honig B. “Protein structure prediction”. In : *Curr. Opin. Chem. Biol* (2001), p. 51–56.
- [71] J LE. “Distribution des médicaments dans les tissus”. In : *Édition professionnelle du Manuel MSD* (2019).
- [72] P.h LECHAT. “Pharmacologie”. In : *Service de pharmacologie clinique* (2006), p. 74.
- [73] G LEROY, B RICKARDS et SJ FLINT. “The double bromodomain proteins BRD2 and BRD3 couple histone acetylation to transcription”. In : *Mol Cell* (2008), p. 51–60.
- [74] D.F LEWIS, M.N JACOBS et M DICKINS. “Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism”. In : *Drug Discov Today* (2004), p. 530–537.
- [75] Z LI et al. “The BET Bromodomain Inhibitor JQ1 Activates HIV Latency Through Antagonizing Brd4 Inhibition of Tat-Transactivation”. In : *Nucleic Acids Res* (2013), p. 277–287.
- [76] Y.J LIN et al. “Solution structure of the extraterminal domain of the bromodomain-containing protein BRD4”. In : *Protein Sci* (2008), p. 2174–2179.

- [77] C. A LIPINSKI et al. “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings”. In : *Elsevier, Advanced Drug Delivery Reviews* (1997), p. 25.
- [78] C LOICHOT et M GRIMA. “Métabolisme des médicaments”. In : *Module Pharmacologie Générale DCEM1* (2004), p. 2–3.
- [79] J LOVÉN et al. “Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers”. In : *Cellule* (2013), p. 320–334.
- [80] T LYNCH et A PRICE. “The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects”. In : *Am Fam Physician* (2007), p. 391–396.
- [81] A MARCHAND, R BAROUKI et M GARLATTI. “Regulation of NAD (P) H : quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity”. In : *Mol Pharmacol* (2004), p. 1029–1037.
- [82] A MARCHAND et al. “2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression and counteracts the negative effect of insulin”. In : *Mol Pharmacol* (2005), p. 444–452.
- [83] L MARTIN. “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”. Thèse de doct. Université Montpellier 2, 2006.
- [84] T MARUYAMA et al. “A Mammalian Bromodomain Protein, Brd4, Interacts with Replication Factor C and Inhibits Progression to S Phase”. In : *Mol. Cellule. Biol* (2002), p. 6509–6520.
- [85] MM MATZUK et al. “Small-molecule inhibition of BRDT for male contraception”. In : *Cell* (2012), p. 673–684.

- [86] M.R MCKEOWN et al. “Biased Multicomponent Reactions to Develop Novel Bromodomain Inhibitors”. In : *J Med Chem* (2014), p. 9019–9027.
- [87] J.L MERLIN. In : *pharmacologie* (2008), p. 51–62.
- [88] Ishikawa MINORU et Hashimoto YUICHI. “Improvement in Aqueous Solubility in Small Molecule Drug Discovery Programs by Disruption of Molecular Planarity and Symmetry”. In : *J. Med. Chem* (2011), p. 1539–1554.
- [89] O MIRGUET et al. “Discovery of Epigenetic Regulator I-BET762 : Lead Optimization to Afford a Clinical Candidate Inhibitor of the BET Bromodomains”. In : *J Med Chem* (2013), p. 7501–7515.
- [90] K MOCHIZUKI et al. “The bromodomain protein BRD4 stimulates G1 gene transcription and promotes progression to S phase”. In : *J Biol Chem* (2008), p. 9040–9048.
- [91] A MONGE. “Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche « in silico » de nouveaux composés bioactifs”. Thèse de doct. Université d’Orléans, 2006.
- [92] Y MOREL et R BAROUKI. “Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress”. In : *J Biol Chem* (1998), p. 26969–26976.
- [93] Y MOREL, N MERMOD et R BAROUKI. “An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression : role of H(2)O(2) and NFI”. In : *Mol Cell Biol* (1999), p. 6825–6832.
- [94] M.S MOUKSASSI. “Études pharmacocinétiques exploratoires de certains médicaments utilisés en analgésie post-opératoire”. Thèse de doct. Université de Montréal, 2012.

- [95] C MUCHARDT et M YANIV. “The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth”. In : *Sem Cell Dev Biol* (1999), p. 189–195.
- [96] C MUCHARDT et al. “The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis”. In : *EMBO J* (1996), p. 3394–3402.
- [97] S MUJTABA et al. “Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain”. In : *Mol Cell* (2002), p. 575–86.
- [98] A.J MULHOLLAND. “Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis.” In : *Drug Discovery Today* (2005), p. 1393–1402.
- [99] E NICODEME et al. “Suppression of Inflammation by a Synthetic Histone Mimic”. In : *Nature* (2010), p. 1119–1123.
- [100] A NISHIYAMA et al. “Brd4 Is Required for Recovery from Antimitotic Drug-induced Mitotic Arrest : Preservation of Acetylated Chromatin”. In : *Mol. Biol. Cell* (2006), p. 814–823.
- [101] V.V OGRYZKO et al. “The transcriptional co-activators p300 and CBP are histone acetyltransferases”. In : *Cell* (1996), p. 953–959.
- [102] M OTTINGER et al. “Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus LANA-1 interacts with the short variant of BRD4 and releases cells from a BRD4- and BRD2/RING3-induced G1 cell cycle arrest”. In : *J Virol* (2006), p. 10772–10786.
- [103] M OTTINGER et al. “The interaction of the - herpesvirus 68 orf73 protein with cellular BET proteins affects the activation of cell cycle promoters”. In : *J Virol* (2009), p. 4423–4434.

- [104] K.A PAPAVALASSILOU et AG PAPAVALASSILOU. “Bromodomains : pockets with therapeutic potential”. In : *Tendances Mol Med* (2014), p. 477–478.
- [105] M.J PAZIN et J.T KADONAGA. “SWI2/SNF2 and related proteins : ATP-driven motors that disrupt protein- DNA interactions ?” In : *Cell* (1997), p. 737–740.
- [106] C.L PETERSON et J.W TAMKUN. “The SWI-SNF complex : a chromatin remodeling machine ?” In : *Les tendances Biochem Sci* (1995), p. 143–146.
- [107] R.D PHAIR et T MISTELI. “High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus”. In : *Nature* (2000), p. 604–609.
- [108] R.D PHAIR et T MISTELI. “Kinetic modelling approaches to in vivo imaging”. In : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* (2001), p. 898–907.
- [109] S PICAUD et al. “RVX-208, an Inhibitor of BET Transcriptional Regulators with Selectivity for the Second Bromodomain”. In : *Proc Natl Acad Sci USA* (2013), p. 19754–19759.
- [110] R.K PRINJHA, Witherington J et K LEE. “Place your BETs : the therapeutic potential of bromodomains”. In : *Trends in pharmacological sciences* (2012), p. 146–153.
- [111] Z QIAN et al. “Recent progress in engineering / hydrolase-fold family members”. In : *Biotechnology Journal* (2009), p. 26–34.
- [112] Lakshmi. R. “Étude de la relation entre le volume de distribution et le poids corporel chez les patients traités par amikacine”. Thèse de doct. Université de lorraine, 2012.
- [113] X RAN et al. “Structure-Based Design of -Carboline Analogues as Potent and Specific BET Bromodomain Inhibitors”. In : *J Med Chem* (2015), p. 4927–4939.

- [114] *RCSB PDB. RCSB PDB statistics*. Consulté le : 2011. URL : <http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general-information/pdb-statistics/index>.
- [115] S REKKAB. "Drug Design" et synthèse de nouveaux calix[8]arènes sulfoniques flexibles à activités anticorrosive et anticoagulante". Thèse de doct. Université constantine 1, 2014.
- [116] G RENVEZ. "Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking". Thèse de doct. l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2010.
- [117] D.W RITCHIE. "Evaluation of protein docking prediction using Hex 6.3 in CAPRI rounds 1 and 2". In : *Proteins* (2003), p. 98–106.
- [118] W.A RITSCHEL. *Handbook of Basics Pharmacokinetics*. Drug Intelligence Publications, Inc, 1986.
- [119] O ROZENBLATT-ROSEN et al. "The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex". In : *Proc Nat'l Acad Sci USA* (1998), p. 4152–4157.
- [120] T SALAH et al. "Molecular Geometry, Electronic Properties, MPO Methods and Structure Activity/Property Relationship Studies of 1,3,4-Thiadiazole Derivatives by Theoretical Calculations". In : *Reviews in Theoretical Science* (2015), p. 355.
- [121] M.C SANGUINETTI et M TRISTANI-FIROUZI. "hERG potassium channels and cardiac arrhythmia". In : *Nature* (2006), p. 463–469.
- [122] M. F SEGURA et al. "BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy". In : *Cancer Res* (2013), p. 6264–6276.

- [123] J SHI et Vakoc CR. “The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition”. In : *Mol Cell* (2014), p. 728–736.
- [124] J SHI et al. “Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer”. In : *Cancer Cell* (2014), p. 210–225.
- [125] W SOUFI-LALOUT. “Contribution a la modélisation des interactions dans les biomolécules : Cas de la Maladie de Parkinson”. Thèse de doct. Université abou bekr belkaïd de tlemcen, 2016.
- [126] J.I SPILTOIR et al. “BET Acetyl-Lysine Binding Proteins Control Pathological Cardiac Hypertrophy”. In : *Mol Cell Cardiol* (2013), p. 175–179.
- [127] K STRUHL. “Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms”. In : *Genes Dev* (1998), p. 599–606.
- [128] S.S SYEDA, S JAKKARAJ et GI GEORG. “Scalable Syntheses of the BET Bromodomain Inhibitor JQ1”. In : *Tetrahedron Lett* (2015), p. 3354–3457.
- [129] S TENIOU. *Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses*. 2012.
- [130] B THORENS. “Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes”. In : *Am J Physiol* (1996), p. 541–53.
- [131] D.C TKACHUK, S KOHLER et M.L CLEARY. “Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias”. In : *Cell* (1992), p. 691–700.
- [132] D TROUCHE et al. “RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1”. In : *Proc Nat'l Acad Sci USA* (1997), p. 11268–11273.

- [133] P VASANTHANATHAN et al. “Classification of cytochrome P450 1A2 inhibitors and noninhibitors by machine learning techniques”. In : *Drug Metab Dispos* (2009), p. 658–664.
- [134] A.V VESELOVSKY et al. “Protein-protein interactions : mechanisms and modification by drugs”. In : *Pub.Med* (2002), p. 405–22.
- [135] F andBlankenfeldt W VOLLMUTH et Geyer M. “Structures of the dual bromodomains of the P-TEFb-activating protein Brd4 at atomic resolution”. In : *J Biol Chem* (2009), p. 36547–36556.
- [136] L WANG, L LIU et S.L BERGER. “Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo”. In : *Genes Dev* (1998), p. 640–653.
- [137] F WINSTON et CD ALLIS. “The bromodomain : a chromatin-targeting module?” In : *Nature Struct Biol* (1999), p. 601–604.
- [138] S WODAK et J JANIN. “analysis of protein-protein interactions”. In : *J. Mol. Biol.* 124 (1978), p. 323–342.
- [139] S.Y WU et C.M CHIANG. “The double bromodomain - containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation”. In : *J. Biol. Chem* (2007), p. 13141–13145.
- [140] S.Y WU et al. “Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing”. In : *Genes Dev* (2006), p. 2383–2396.
- [141] A WYCE et al. “BET inhibition silences expression of MYCN and BCL2 and induces cytotoxicity in neuroblastoma tumor models”. In : *PLoS One* (2013), e72967.
- [142] J-M YANG et c.c CHEN. “GEMDOCK : A Generic Evolutionary Method for Molecular Docking”. In : *Proteins* (2004), p. 288–304.

- [143] S-M YANG et al. “Discovery and lead identification of quinazoline-based BRD4 inhibitors”. In : *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* (2018), p. 4–5.
- [144] L ZENG et M ZHOU. “Bromodomain : an acetyl-lysine binding domain”. In : *FEBS Lett* (2002), p. 124–128.
- [145] G ZHANG, SG SMITH et M-M ZHOU. “Discovery of Chemical Inhibitors of Human Bromodomains”. In : *Chem Rev* (2015), p. 11625–11688.
- [146] M ZHOU et al. “Bromodomain protein BRD4 regulates human immunodeficiency virus transcription through phosphorylation of CDK9 at threonine 29”. In : *J Virol* (2009), p. 1036–1044.
- [147] J ZUBER et al. “RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia”. In : *nature* (2011), p. 524–528.

## Résumé

La protéine 4 contenant bromodomain joue un rôle important pour le traitement de nombreuses maladies cancéreux . Dans ce mémoire, une étude des interactions moléculaires entre la BRD4 et ses inhibiteurs ( les dérivés de quinazoline ) a été réalisée grâce à des outils de modélisation ( docking moléculaire ) moléculaire. Les résultats ont montré que L7, L9, L18, L19, L23 et L27 étaient de puissants inhibiteurs de BRD4, alors que les meilleurs composés présentaient des réactions de liaison hydrogène avec les résidus Gln85, Asp140 et Pro82 dans le site catalytique. En outre, nous avons utilisé Molinspiration et Web ADMETLAB pour calculer les propriétés ADMET et Drug-Likeness des composés cibles, respectivement. Parmi des six composés, il existe quatre composés n'a violé pas les paramètres de Lipinski et d'ADMET, ce qui en fait des agents potentiellement pour les activités biologiques et nous les proposons comme inhibiteurs de protéines . Ces résultats fournissent une potentielle pour développer des inhibiteurs de la BRD4.

**Mots clés :** Docking Moléculaire, dérivés de quinazoline , BRD4. ADMET et Drug-Likeness.

## Abstract

Bromodomain-containing protein 4 plays an important role in the treatment of many cancerous diseases. In this thesis, a study of the molecular interactions between brd4 and its inhibitors quinazoline derivatives was carried out using molecular modeling tools (molecular docking). The results showed that L7, L9, L18, L19, L23 and L27 were potent inhibitors of BRD4, while the best compounds exhibited hydrogen bonding reactions with Gln85, Asp140 and PRO82 residues in the catalytic site. In addition, we used Molinspiration and Web ADMETLAB to calculate the ADMET and Drug-Likeness properties of the target compounds, respectively. Among the six compounds, there are four compounds that did not violate the parameters of Lipinski and admits, making them potentially agents for biological activities and we propose them as protein inhibitors. These results provide a potential for developing inhibitors of BRD4.

**Keywords :** Virtual Molegro Docker ; Molecular Docking ; quinazoline derivatives ; BRD4. ADMET et Drug-Likeness.