



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie - Biologie Cellulaire et Moléculaire

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

**Modélisation par Docking moléculaire de l'interaction
Enzyme-Inhibiteur : Cas de la Tyrosine kinase-JAK2 en
tant-que cible thérapeutique impliquée dans les
pathologies du sang**

Présenté et soutenu par:

DEKKICHE Zakia
BENAICHE Soulef

Le : 03/07/2018

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHIKHI A. (Professeur - UFM Constantine1).

Rapporteur : BENSEGUENI A. (Professeur -UFM Constantine 1)

Examineur : MOKRANI E.H. (Maître assistant «A» -UFM Constantine 1)

Année universitaire : 2017-2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

Tout d'abord à remercier Allah qui nous a donné le courage, la patience et la volonté qui nous ont permis de reprendre les études universitaires après une longue rupture et pour finir ce travail.

*Nous remercions les plus profonds et les plus vifs à notre encadreur **BENSEGUENI – A** Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour ses conseils précieux, ses orientations, sa patience qui ont donné vie à ce travail.*

*Nos remerciements les plus vifs à **Mr. CHIKHI. A.** Professeur à L'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour son aide, ses conseils et pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements également **Mr MOKRANI E.H** Maitre-assistant 'A' à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour son aide, ses orientations, ses conseils et pour avoir d'examiner ce travail et l'enrichir par ses propositions.*

Enfin, on espère que ce mémoire sera à la hauteur de ses attentes et pourra compenser au moins une partie des efforts et du temps qu'elle a bien voulu me consacrer.

Nous remercions toutes personnes ayant contribué et aidés de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.



DEDICACES

Je dédie ce travail :

*En premier lieu à mes parents, qui me sont très chers en témoignage
à leur soutien pendant toute ma vie et leurs prières tout au long de mes études,
car aucun mot ne pourra exprimer ma haute gratitude
et profonde affection.*

*A mes frères et sœurs : Lynda, Rania, Taouba, Oussema et Tasnim. Pour leurs
encouragements permanents et leur soutien moral.*

Et de ma grande famille DEKKICHE.

*A mes médecins qui m'ont donné le courage et l'espoir pour continuer
mon étude sans complication et de m'encouragé de maîtriser
tous les obstacles et les difficultés.*

*A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments Zahia, Hamama,
Fouzia, Wahiba, Assia, Rayenne, Amina, Inas, Asma, Lynda et Salma.*

A mon binôme Soulef.

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

A tous mes enseignants durant les années des études.

A que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin.

A tous ceux qui, m'ont donné la force de continuer.

Zakia

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance .J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A

mon mari plus chère de mon cœur Mohamed, qui m'a encouragé, qui m'a donnée la force et la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés.

A

mes fleurs et mes fruits d'amours, mes petits-enfants : Rania, Louardi Abdallah et ma dernière poupée Rayenne.

A mes chers frères et leurs femme : Salim, Mohamed et Mohamed el Hadi. Pour leurs amours et leurs sacrifices sans limites.

A ma seule sœur Souad et son mari boubakeur.

A mes beaux-parents: Ahmed et Hanifa.

A mes belles sœurs : Sihem ; Mira,et Zahira Pour son soutien moral.

A mes beaux frères.

A mes grands familles : BENAICHE et BERHAIL.

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université: Lynda, Selma, Asma, Yousra, Zakia, wahiba, Assia et Meriem.

A Amina, Salsabile, Laila, Fouzia et Samia.

A tous mes collègues de promotion de master et spécialement : Amira, Maroua, Rayenne.

A mon binôme Zakia.

A mes collègues du travail au sein de l'A.P.C.de Constantine et surtout ma directrice de la Direction des Ressources Humaines Melle C.Atika.

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.

Soulef

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Revue bibliographique

Chapitre I : Pathologies du sang.

1. Maladie de Vaquez.....	3
1.1. Mécanisme d'action	3
1.2. Symptômes.....	4
1.3. Traitements.....	4
1.3.1. Les saignés réguliers (phlébotomie).....	4
1.3.2. Les mylosuppresseurs.....	4
1.3.3. Inhibiteur de TK-JAK2.....	4
2. La leucémie	5
2.1. Types de leucémies.....	5
2.2. La cause	6
2.3. Les symptômes	6
2.4. Le diagnostic.....	6
2.5. Traitements	6

Chapitre II : Inhibiteur de la tyrosine kinase.

1. Les tyrosines kinases (TK)	7
1.1 Structure.....	8
1.2 Classification des Tyrosine kinase.....	8
1.3 Les Tyrosine kinases cytoplasmiques	9
1.3.1 Protéine de famille Src	9
1.3.2 Protéine de famille Abl.....	9
1.3.3 Protéine de famille JAK.....	9
2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase	9
2.1 Mécanisme d'action	10
2.2 Principales cibles thérapeutiques.....	10
2.3 Les classes des inhibiteurs des TK	10
A. ITK ciblant Abl-Bcr	11
1. Imatinib.....	11
1.1. Formule chimique	11
1.2. Mécanisme d'action.....	11
2. Nilotinib.....	12
2.1. Formule chimique.....	12
2.2. Mécanisme d'action.....	13
3. Dasatinib.....	13
3.1. Formule chimique	13
3.2. Mécanisme d'action.....	14
B. Inhibiteurs des tyrosines kinases liées à l'EGF.....	14
1. Gefitinib.....	14
1.1. Formule chimique	14
1.2. Mécanisme d'action.....	15
2. Erlotinib	15
2.1. Formule chimique	15
2.2. Mécanisme d'action.....	16
C. Nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinase.....	16

1. Bosutinib	16
1.1. Formule chimique	16
1.2. Mécanisme d'action	16
D. ITK-JAK2	17
1. Pacritinib	17
1.1. Formule chimique	17
1.2. Mécanisme d'action	17
2. Lestaurtinib	17
2.1. Formule chimique	17
2.2. Mécanisme d'action	18
3. Ruxotinib	18
3.1. Formule chimique	18
3.2. Mécanisme d'action.....	19
4. Momélotinib	19
4.1. Formule chimique	19
4.2. Mécanisme d'action	19
5. Fedratinib	19
5.1. Formule chimique	20
5.2. Mécanisme d'action	20

Chapitre III : Docking moléculaire

Introduction.....	21
1. Le Docking moléculaire	21
2. Les outils du Docking moléculaire	22
2.1 Ligand.....	22
2.2 Récepteur.....	23
3. Comparaison et superposition de molécules.....	23
3.1 Définition du RMS.....	24
4. les programmes du docking.....	24

Partie pratique

Chapitre IV : Matériel et Méthodes

1. Matériel.....	26
1.1 Microordinateurs.....	26
1.2 Programme.....	26
1.3 Banques de données.....	26

1.3.1 PDB.....	26
1.3.2 Pubchem.....	26
2. Méthodes.....	27
2.1.Préparation de la protéine	27
2.2.Préparation de ligand.....	28
2.3.Génération du protomol.....	28
2.4. Docking Moléculaire.....	29
2.5. Règle de Lipinski.....	29

Chapitre V : Résultats et Discussion

1. La fiabilité du programme Surflex.....	31
1.1.Test RMSD	31
1.2. L'analyse visuelle.....	32
1.3. Conclusion	34
2. Etude des interactions "Inhibiteurs-Enzyme".....	34
3. Proposition des nouveaux inhibiteurs	36
3.1.Le complexe TKJAK2-Composé 425	37
3.2. Le complexe TKJAK2-Composé 120	38
3.3. Le complexe TKJAK2-Composé 14.....	39
3.4. Le complexe TKJAK2-Composé 67.....	40
3.5. Le complexe TKJAK2-Composé 426.....	41
3.6. Le complexe TKJAK2-Composé 76.....	41
3.7. Le complexe TKJAK2-Composé 414.....	42
3.8. Le complexe TKJAK2-Composé 149.....	43
3.9. Le complexe TKJAK2-Composé 427.....	44
3.10. Le complexe TKJAK2-Composé 384.....	45
3.11. Conclusion de visualisation	46
4. Application de la règle de Lipinski	47
Conclusion	48

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Liste des Figures

<u>Figure N°1</u> : La polyglobulie de Vaquez.....	3
<u>Figure N°2</u> : spécifiques de polyglobulie : Erythrose Coloration rouge.....	4
<u>Figure N°3</u> : Vue microscopique de la leucémie.....	5
<u>Figure N°4</u> : Réaction de phosphorylation de tyrosine par addition d'un groupement phosphate catalysé par la tyrosine kinase	7
<u>Figure N° 5</u> : Représentation schématique du domaine kinase d'une protéine tyrosine kinase.	8
<u>Figure N° 6</u> : Mode d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)	10
<u>Figure N° 7</u> : Structure chimique de l'Imatinib.....	11
<u>Figure N° 8</u> : Mécanisme d'action de l'Imatinib sur Bcr-Abl.....	12
<u>Figure N° 9</u> : Structure chimique de Nilotinib.....	12
<u>Figure N°10</u> : Mode de liaison du nilotinib à Bcr-Abl.....	13
<u>Figure N° 11</u> : Structure chimique du Dasatinib.....	13
<u>Figure N° 12</u> : Mode de liaison du dasatinib à Bcr-Abl.....	14
<u>Figure N° 13</u> : Structure chimique du Gefitinib.....	14
<u>Figure N° 14</u> : Mode de liaison du gefitinib à l'EGFR.....	15
<u>Figure N° 15</u> : Structure chimique de l'Erlotinib.....	15
<u>Figure N° 16</u> : Structure chimique du Bosutinib.....	16
<u>Figure N°17</u> : Structure chimique du Pacritinib.....	17
<u>Figure N°18</u> : Structure chimique de Lestaurtinib.....	18
<u>Figure N°19</u> : Structure chimique de Ruxolitinib	18
<u>Figure N°20</u> : Structure chimique de Momelotinib	19
<u>Figure N°21</u> : Structure chimique de Fedratinib.....	20
<u>Figure N°22</u> : Stimulation du Docking et scoring	22
<u>Figure N°23</u> : Comparaison des programmes de docking les plus cités.....	24
<u>Figure N°24</u> : Représentation des différents ligands de référence.....	27
<u>Figure N° 25</u> : Représentation par VMD de la protéine 4JIA avec le ligand pdb 1K3 positionné dans la cavité catalytique.....	28
<u>Figure N° 26</u> : Protomol généré pour le complexe 4JIA (coloré en blanc).....	29
<u>Figure N° 27</u> : Résultats en % obtenus par Surfex à deux intervalles de RMSD (Å).....	31

<u>Figure N° 28</u> ; Superposition de la géométrie des Inhibiteurs obtenu par rayon-X (coloré en rouge) et celle calculée par docking moléculaire avec Surflex (coloré en vert).....	34
<u>Figure N° 29</u> : Structure de 5-(4-methoxyphenyl)-N-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine (1K3).....	35
<u>Figure N° 30</u> : Mode d'interaction du 1K3 avec le site actif de la TK-JAK-2.....	36
<u>Figure N° 31</u> : Mode d'interaction du composé 425 avec le site actif de la TK -JAK2	37
<u>Figure N° 32</u> : Mode d'interaction du composé 120 avec le site actif de la TK -JAK2.....	38
<u>Figure N° 33</u> : Mode d'interaction du composé 14 avec le site actif de la TK -JAK2.....	39
<u>Figure N° 34</u> : Mode d'interaction du composé 67 avec le site actif de la TK -JAK2.....	40
<u>Figure N° 35</u> : Mode d'interaction du composé 426 avec le site actif de la TK -JAK2.....	41
<u>Figure N° 36</u> : Mode d'interaction du composé 76 avec le site actif de la TK -JAK2.....	42
<u>Figure N° 37</u> : Mode d'interaction du composé 414 avec le site actif de la TK -JAK2.....	43
<u>Figure N° 38</u> : Mode d'interaction du composé 149 avec le site actif de la TK -JAK2.....	44
<u>Figure N° 39</u> : Mode d'interaction du composé 427 avec le site actif de la TK -JAK2.....	45
<u>Figure N° 40</u> : Mode d'interaction du composé 384 avec le site actif de la TK -JAK2.....	46

Liste des Tableaux

<u>Le Tableau N°1</u> : Principaux programmes du docking moléculaire.....	25
<u>Le Tableau N° 2</u> : Les codes PDB des complexes "Tyrosine kinase humaine -inhibiteur" avec Leur résolution	27
<u>Le Tableau N° 3</u> : Valeurs de RMSD 26 complexes TK-JAK2-inhibiteur étudiés.....	32
<u>Le Tableau N°4</u> : Les codes PDB de complexe "Tyrosine kinase humaine -inhibiteur" avec Leur score et IC50.....	34
<u>Le Tableau N° 5</u> : Les scores des 10 meilleurs similaires obtenus suite au docking moléculaire avec la TK-JAK2.....	36
<u>Le Tableau N°6</u> : résultats de la règle de Lipinski sur les 10 composés.....	46

Liste des Annexes

Annexe N°1 : Tableau RMSD de 100 complexes.

Annexe N°2 : Les scores des collections des similaires de 1K3.

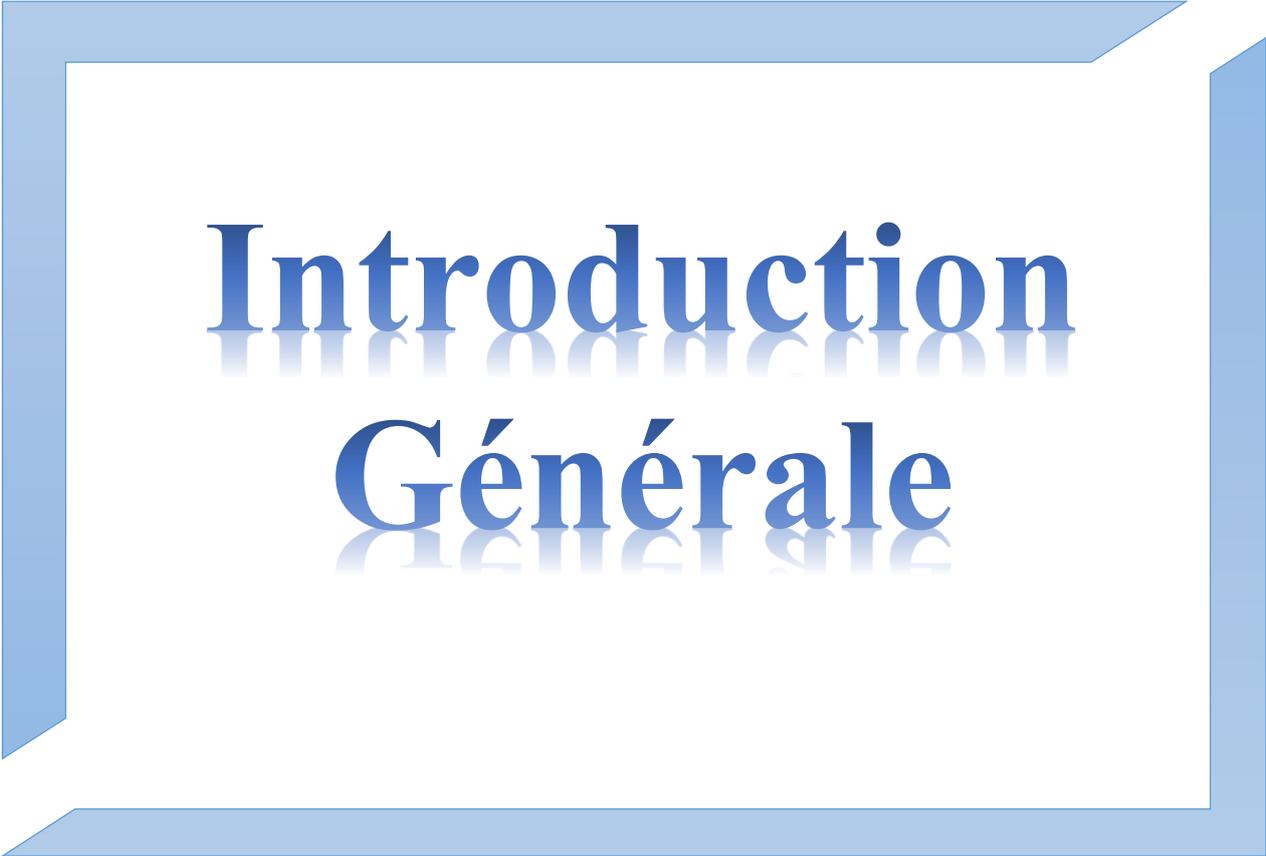
Annexe N°3 : Structures des meilleurs similaires du 1K3.

Annexe N°4 : Les noms chimiques des meilleurs similaires de 1K3.

Liste des abréviations

3D	Trois dimensions
Å	Angström
Abl	Abelson
ADME	Absorption Distribution Metabolisme Excretion
ADN	Acide Désoxy ribo Nucléique
AH	Accepteur d'Hydrogène
ARN	Acide Ribo Nucléique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Bcr	Breakpoint cluster region
BTK	Tyrosine Kinase de Bruton
CHC	Carcinomes Hépatocellulaire
CYP	Cytochrome P387
DH	Donneur d'Hydrogène
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FLT3 (gène)	Fms-like tyrosine kinase 3(recepteur)
GFME	Glioblastoma Foundation Michele Esnault
GIST	Tumeurs Stromales Gastro Intestinales
HER	Human Epidermal growth factor Receptor
IC50	Inhibitory concentration 50.
IL3	Inter Leukine 3
IL6	Inter Leukine 6
INSR	Insulin Receptor
ITK	Inhibiteur Tyrosine Kinase
JAK-1	Janus Kinase-1
JAK-2	Janus Kinase-2
JAK-3	Janus Kinase-3
KDa	Kilo Dalton
Ki	Constante d'inhibition
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAM	Leucémie Aiguë Myéloblastique
LF	Liaison Flexible
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LogP	Coefficient de Partage Eau/Octanol
Nm	Nano molaire
PDB	Protein Data Bank (banque de donnée protéique). Protein Data Bank European (banque de donnée protéique European).
PDBe	Protein Data Bank European (banque de donnée protéique European).
PDBj	Protein Data Bank Japan (banque de donnée protéique Japan).
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor

PM	Poids Moléculaire
r	Coefficient de corrélation linéaire.
RCSB PDB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RET	Résistance Evaporative Thermique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMS	Root Mean Square
RMSD	Root Mean Square Dérivation
RTK	Récepteurs Tyrosine Kinases
SRC	Sarcome
TK	Tyrosine Kinase
TKJAK2	Tyrosine Kinase-JAK2
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VMD	Visual Molecular Dynamics



Introduction

Générale

Introduction général

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 [1]. Ces dernières sont actuellement en plein essor en oncologie et leurs indications s'étendent rapidement [2].

Ces médicaments anticancéreux ciblent des anomalies moléculaires spécifiquement présentes au niveau des cellules tumorales, notamment des kinases présentes au sein des voies de signalisation impliquées dans l'oncogenèse [3]. Parallèlement Les tyrosines kinases (TK) sont des enzymes, qui jouent un rôle majeur dans la signalisation cellulaire par l'intermédiaire de facteurs de croissance,

L'autoactivation des tyrosines kinases liées à l'acquisition d'anomalies génétiques au cours de l'oncogenèse est un phénomène fréquemment observé. L'ensemble de ces éléments justifie le fait que le développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase, qui sont des petites molécules d'administration orale qui agissent sur la portion intracellulaire des protéines membranaires ou non membranaires, les inhibiteurs tyrosine kinase (ITK) se fixent de manière compétitive sur les sites de liaisons de l'ATP et bloquent ainsi l'autophosphorylation et inhibent les voies de transduction du signal. Par conséquence, la signalisation cellulaire en aval est interrompue, rétablissant ainsi le contrôle de la prolifération de la survie cellulaire. Dans les tumeurs solides, les inhibiteurs de tyrosine kinase induisent également une inhibition de l'angiogenèse et de la diffusion métastatique [4].

Ils sont indiqués dans le traitement intéressant de nombreux cancers tels que les cancers du poumon, la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), cancer thyroïdien, du sein, du rein, les carcinomes hépatocellulaire (CHC) entre autres [5].

L'objectif de notre travail est de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de la tyrosine kinase en faisant appel aux approches de modélisation des interactions enzyme-inhibiteur par docking moléculaire dans les maladies du sang, notamment la maladie de Vaquez et de la Leucémie . 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.

Dans notre travail de l'initiation à la recherche, il nous a semblé judicieux, dans un premier temps, de tester la fiabilité du programme de docking moléculaire « *Surflex* » utilisé dans cette étude. Pour cela, un test a été réalisé : le test consiste à calculer la déviation en angströms ou RMSD, entre la géométrie du ligand conçue par le logiciel et celle déterminée expérimentalement.

Dans un deuxième temps, nous avons modélisé les interactions de nombreux similaires structuraux obtenus à partir d'un inhibiteur choisi selon des critères particuliers dont score son élevé et sa faible IC50. Le docking moléculaire de ces structures envers le site actif de la tyrosine kinase nous permettra de faire ressortir les inhibiteurs les plus puissants vis-à-vis de cette enzyme.

Enfin, l'application de la règle de Lipinski dite « la règle de 5 » nous permettra de vérifier la biodisponibilité par voie orale des inhibiteurs proposés.



Chapitre I :
Pathologies
du Sang

Parmi les différentes pathologies cancéreuses faisant intervenir les tyrosines kinase sujet de notre travail, nous avons choisi deux pathologies sanguines notamment la maladie de Vaquez et la leucémie myéloïde chronique (LMC).

1. Maladie de Vaquez

Cette maladie se caractérise par un excès de globules rouges, provoquant un épaissement du sang et exposant la personne atteinte au risque de thrombose. Elle est aussi désignée comme la polyglobulie primitive ou la polyglobulie de Vaquez et appartient au groupe des syndromes myéloprolifératifs. Elle survient généralement après 50 ans et touche chaque année 10 à 15 personnes sur 100 000. Un traitement bien mené permet au malade de mener une vie normale. On découvre le gène de la Janus kinase 2 sur le chromosome 9. Le gène peut subir une mutation, entraînant la maladie de Vaquez, dont le principal signe clinique est une prolifération des globules rouges. [4]



Figure N°1 : La polyglobulie de Vaquez.

Une personne atteinte par la maladie de Vaquez est donc exposée au risque de thrombose veineuse profonde, de crise cardiaque, d'accident vasculaire cérébral et d'embolie pulmonaire, causés par des caillots de sang dans le cœur, le cerveau et le poumon.

1.1. Mécanisme d'action

TK-JAK2 phosphoryle une variété de protéines intracellulaires sur leurs résidus tyrosine, une fois activée par le récepteur sur lequel elle est liée. La liaison du ligand au récepteur entraîne une auto-phosphorylation de JAK2 qui se dimérise et vient phosphoryler des résidus tyrosines sur son récepteur. Par la suite, cette phosphorylation vient attirer d'autres molécules de signalisation (des STATs, par exemple) pour les phosphoryler à leur tour. Ces substrats sont des facteurs de transcription. Ils migreront jusqu'au noyau et moduleront l'expression de gènes cibles. Ces cascades de phosphorylation entraînent ultimement :

- La prolifération cellulaire (par la voie des MAP3-Ks).
- L'inhibition de l'apoptose (par la voie des PI3-Ks/AKT).
- La croissance cellulaire (par la voie des STAT1 et STAT5).
- La vitesse de migration (en activant des protéines du cytosquelette).
- La différenciation des cellules myéloïdes (inconnue).

Par ailleurs, JAK2 a un rôle très important lors de l'embryogenèse au niveau de l'hématopoïèse. Le knock-out du gène codant JAK2 chez la souris entraîne la mort au 12^e jour de grossesse par absence de globules rouges [4].

1.2. Symptômes

Le plus souvent par un hémogramme pratiqué lors d'un bilan.

- Par une érythrose apparue progressivement, cutanéomuqueuse, plus visible au niveau du visage et des mains.
- Par des signes cliniques liés à l'hyperviscosité (signes vasculaires ou neuro-sensoriels): céphalées, vertiges, troubles visuels, paresthésies, thrombose veineuse ou thrombose artérielle.
- Par un signe lié au syndrome myéloprolifératif, principalement prurit à l'eau et splénomégalie.



Figure N°2 : spécificités de polyglobulie : Erythrose Coloration rouge .

1.3. Traitements

On ne guérit pas de la maladie de Vaquez, mais des traitements permettent au malade de mener une vie normale et de limiter les risques vasculaires associés [5].

1.3.1. Les saignées régulières (phlébotomies)

Elles constituent le traitement d'urgence des malades symptomatiques et le premier traitement de tous les patients. Visent à réduire le volume total de sang dans l'organisme pour améliorer la circulation sanguine.

1.3.2. Les myélosuppresseurs

Le taux de globules rouges peut être réduit au moyen de médicaments dits « Myélosuppresseurs ».

1.3.3. L'inhibition de TK-JAK2 :

L'inhibition enzymatique de TK-JAK2 est un nouveau traitement ciblé, qui nous intéresse dans le présent travail ou l'on trouvera de développer à côté des inhibiteurs classiques tels-que tels-que: Pacritinib (SB1518), Lestaurtinib (CEP-701), Le Ruxolitinib Jakavi (INCBO18424) , Momelotinib (CYT387) et Fedratinib (TG101348 ; SAR302503) d'autres inhibiteurs théoriques de cette cible thérapeutique à partir d'un inhibiteur appelé 1K3 que l'on trouve au niveau de la Proteine Data Bank (PDB) complexé à la TK-JAK2 [5].

2. La Leucémie

La maladie de Vaquez peut entraîner à long terme de graves complications telles qu'une hypertrophie de la rate (splénomégalie), des maladies cardiaques, une leucémie et une myélofibrose idiopathique.

La transformation en leucémie aiguë survient dans environ 10 % des cas après 10 ans d'évolution et 15 % après 15 ans. Elle est volontiers précédée par une phase de myélodysplasie. Le pronostic est sombre, avec généralement une survie limitée à quelques mois. Comme la transformation en myélo-fibrose, la transformation en leucémie aiguë fait partie de l'histoire naturelle de la maladie de Vaquez [6].

La leucémie est un type de cancer qui affecte le sang et la moelle osseuse.

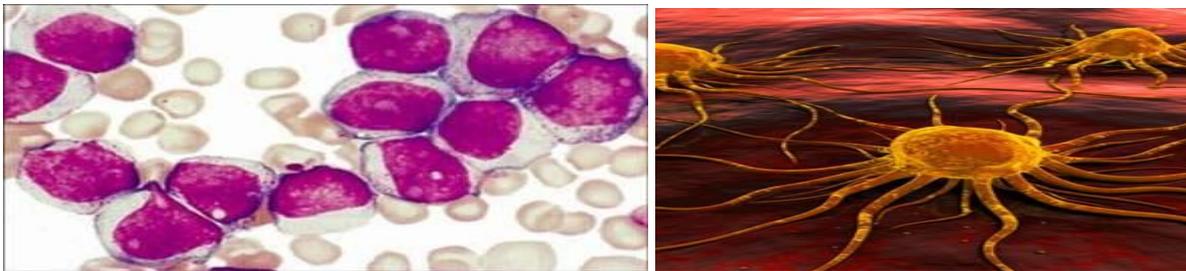


Figure N°3 : Vue microscopique de la leucémie

La leucémie est un cancer qui prend naissance dans les cellules souches du sang. Ces dernières sont des cellules de base qui se transforment en différents types de cellules qui ont des fonctions distinctes [7].

Les cellules souches du sang deviennent des cellules souches lymphoïdes ou des cellules souches myéloïdes.

- Les **cellules souches lymphoïdes** se transforment en lymphocytes, un type de globules blancs, qui aident à combattre les infections et à détruire les cellules anormales.
- Les **cellules souches myéloïdes** deviennent des globules rouges, des granulocytes, des monocytes ou des plaquettes. Les globules rouges transportent l'oxygène vers tous les tissus du corps. Les granulocytes et les monocytes sont des types de globules blancs qui détruisent les bactéries et aident à combattre les infections. Les plaquettes forment des caillots dans les vaisseaux sanguins endommagés afin d'arrêter les saignements. Dans le cas de la leucémie, il y a une surproduction de cellules blastiques, qui se développent anormalement et ne deviennent pas des cellules sanguines matures.

2.1. Types de Leucémies

Il existe 4 types principaux de leucémies. Elles sont d'abord classées selon le type de cellule souche du sang à partir duquel elles se développent. Et ensuite elles sont subdivisées en fonction de la rapidité à laquelle la maladie se développe et évolue.

Ces 4 types sont la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), la leucémie aiguë myéloblastique (LAM), la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et la leucémie myéloïde chronique (LMC).

Chez l'adulte, les leucémies les plus courantes sont la LLC et la LAM [4].

2.2. la cause :

Dans toutes les leucémies myéloïdes chroniques, on retrouve un réarrangement entre le chromosome 9 et le chromosome 22. Une partie du chromosome 9 va se retrouver insérée sur le chromosome 22. Le produit de cet accolement est un gène codant pour une protéine appelée la tyrosine kinase Bcr-Abl. Cette protéine va inciter les cellules souches myéloïdes à se diviser pour produire une quantité exagérée de granulocytes.

2.3. les symptômes

Les symptômes de la leucémie chronique sont relativement peu spécifiques et peuvent consister en une fatigue ou une perte de poids, une sensibilité aux infections, une dyspnée en cas d'anémie. La splénomégalie (augmentation de la rate) est très fréquente.

2.4. Le diagnostic

Est suggéré sur la prise de sang qui montre une augmentation des neutrophiles avec présence d'une myélémie, c'est-à-dire présence de cellules jeunes à tous les stades de leur développement. De manière constante, on observe également une augmentation des autres globules blancs de la lignée granulocytaire, les éosinophiles et les basophiles. Parfois, les autres lignées peuvent être inhibées et on peut voir une anémie ou une thrombopénie [7].

2.5. Traitements

Pour le traitement de cette maladie. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) dont le chef de file est l'Imatinib ont profondément révolutionné la prise en charge thérapeutique et le pronostic de cette hémopathie. Actifs par voie orale et bien tolérés, ils sont bien adaptés à une prise en charge des patients non hospitalisés. Ces traitements ambulatoires ont permis de meilleures réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires, associées à une meilleure qualité de vie des patients. Plusieurs molécules inhibant cette activité sont utilisées.

La mise en évidence de la résistance à l'Imatinib liée au développement de mutations de Bcr-Abl a favorisé le développement d'autres inhibiteurs comme le Nilotinib et le Dasatinib. Certaines mutations ne sont sensibles qu'à l'une ou à l'autre de ces deux molécules et la mutation T315I est responsable d'une résistance aux trois inhibiteurs. Un inhibiteur cible cette redoutable mutation a été développée : le Ponatinib [8].

Dans notre travail, nous envisageons de développer des inhibiteurs théoriques potentiellement plus puissants de l'enzyme TK-JAK2 par modélisation par docking moléculaires à partir de complexes de celle-ci existant au niveau de la PDB.



**Chapitre II:
Inhibiteurs
de la
Tyrosine kinase**

1. Les tyrosines kinases (TK)

Une tyrosine kinase est une transférase qui catalyse la réaction :



Ces enzymes agissent comme « interrupteurs » d'activation/inhibition de nombreuses fonctions cellulaires. [9]

Ces enzymes, jouent un rôle majeur dans la signalisation cellulaire en aval des facteurs de croissance. Les tyrosines kinases catalysent des réactions de phosphorylation des résidus tyrosine de leur substrat en transférant le phosphate situé en gamma (γ) de l'adénosine triphosphate (ATP) vers une protéine effectrice impliquée dans de nombreux processus de régulation cellulaire [10,11].

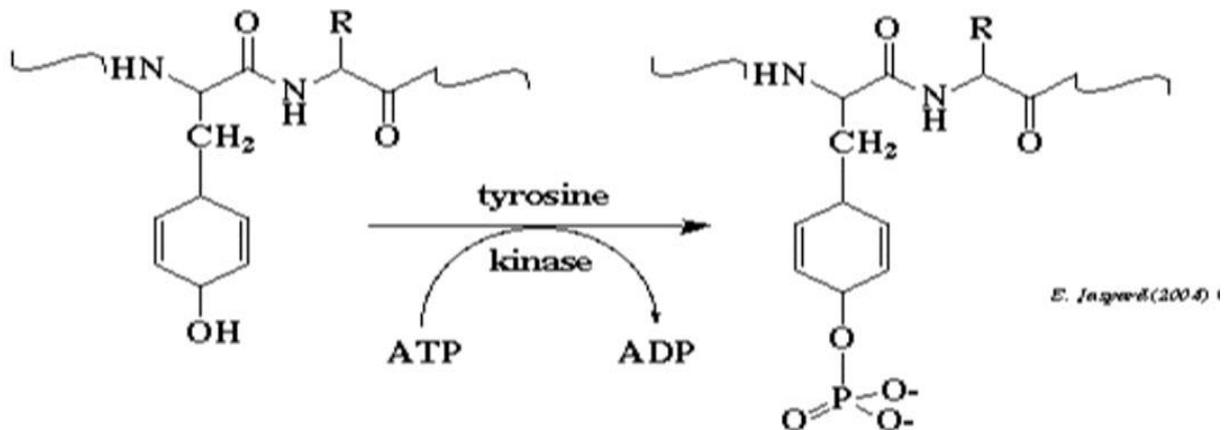


Figure N°4 : Réaction de phosphorylation de tyrosine par addition d'un groupement phosphate catalysé par la tyrosine kinase.

Les tyrosines kinases (TK), sont impliquées dans la transduction du signal initié par des facteurs de croissance et des oncogènes et conduisent à une croissance et à une multiplication cellulaire. Il s'agit en général d'une cascade de réactions intracellulaires comportant des phosphorylations successives [9].

L'effet des phosphorylations sur tyrosine est double :

- Modulation d'une activité enzymatique,
- Création de sites d'ancrage pour des domaines protéiques particuliers.

Cette phosphorylation réalise un contrôle précis des différentes voies de signalisation, mais aussi en favorisant l'interaction entre différents composants du signal cellulaire, afin de contrôler de nombreux processus cellulaires fondamentaux essentiels à l'homéostasie tissulaire tels que la prolifération, le métabolisme [10], l'angiogenèse, la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire, la transcription, la mitogènes, la migration, l'apoptose

1.1. Structure

Toutes les protéines kinases possèdent un domaine tyrosine kinase (ou domaine TK) dont la structure est très conservée. Le domaine TK est formé d'une succession de structures en hélice alpha et en feuillet beta. Il comporte deux lobes (N et C) séparés par une zone charnière qui permet la rotation d'un lobe par rapport à l'autre. Le domaine TK comprend le site de fixation de l'ATP (la boucle P rentre en contact avec le phosphate de l'ATP), le site de fixation du substrat (ou site catalytique) ainsi qu'une boucle d'activation comprenant le site majeur d'autophosphorylation (Figure 5). Les domaines TK peuvent être soit dans une conformation inactive (boucle d'activation repliée vers l'intérieur), soit dans une conformation active (boucle d'activation dépliée vers l'extérieur). L'ATP ne pourra se fixer que sur la conformation active, qui accueillera ensuite la protéine substrat pour y être phosphorylée.

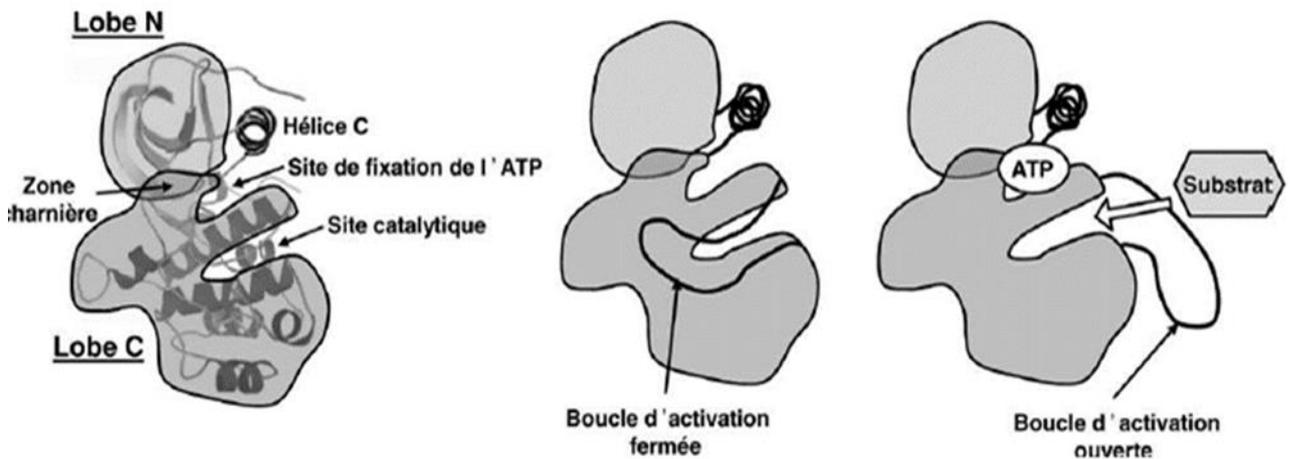


Figure N°5 : Représentation schématique du domaine kinase d'une protéine tyrosine kinase

1.2. Classification des Tyrosines kinase

Les protéines kinases constituent une des plus grandes superfamilles de protéines : 518 gènes de protéines kinases ont été identifiés dans le génome humain [3]. Les tyrosines kinases représentent environ 10 à 15% des gènes qui constituent une grande famille codée par 90 gènes, comportant :

- 58 gènes codent pour les kinases membranaires ou des récepteurs tyrosine kinases (RTK), répartis en 20 sous-familles, que sont des glycoprotéines transmembranaires capables de lier différents agonistes par leur domaine extracellulaire et, ainsi activés, d'initier au niveau intracellulaire des cascades enzymatiques appelées voies de signalisation. Exemple : famille EGFR, PDGFR, INSR, FGFR, VEGFR [10]
- 32 codent pour tyrosine kinase non membranaires ou tyrosine kinase cytoplasmique et/ou nucléaires, qui sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux, réparties en 10 sous-familles [3] Exemple : famille JAK, SRC, ABL, BTK, FAK

La plupart des tyrosine-kinases sont des protéines intracellulaires mais certaines sont des récepteurs membranaires avec des domaines de liaison extracellulaire et intracellulaires. [11]

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des protéines transmembranaires impliquées dans la transduction intra-cytoplasmique du signal provenant du niveau extracellulaire.

À l'intérieur de la cellule, d'autres protéines tyrosine kinases jouent également un rôle essentiel dans la transduction du signal.

L'activité de ces protéines, récepteurs ou protéines intracellulaires, est donc hautement régulée par des nombreux mécanismes dont le contrôle des transitions entre les conformations actives et inactive de l'enzyme. La dérégulation du fonctionnement des tyrosines kinases étant responsable du développement de nombreux cancers, permet d'induire la prolifération et la croissance cellulaire tumorale, de réprimer l'apoptose, et de promouvoir l'angiogenèse et la diffusion métastatique. Elles sont apparues comme des cibles majeures dans le domaine de l'oncologie [1, 3].

1.3. Les Tyrosine kinases cytoplasmiques

Les tyrosines kinase cytoplasmique sont des enzymes qui n'ont pas de fonction réceptrice et sont localisées au niveau du cytoplasme ou à la face interne de la membrane plasmique. Les enzymes cytoplasmiques les mieux connues sont les tyrosines kinases de la famille Src, Abl, Jak...

1.3.1. Protéine de famille Src

la famille Src sont des tyrosine kinases cytoplasmiques les mieux connues, est découvert dans les années 90 à partir d'un virus appelée sarcome de Rous est capable d'induire une tumeur solide. Le gène responsable, appelé v-Src, possède un homologue dans les cellules appelé c-Src.

La Src est une protéine de 52 à 62 kDa localisée au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique et appartenant à une famille de neuf membres, la famille Src kinases (SFKs) est composée de 3 homologues sont ubiquitaires (Src, Fyn, Yes) et d'autres tissu-spécifiques (Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck, Lyn).

1.3.2. Protéine de famille Abl

La protéine Abl est une protéine à fonction tyrosine kinase. Son nom est dérivé de son homologue viral, le gène Abelson (v-ABL), Son poids moléculaire est de 145 kDa. Cette protéine est exprimée dans la plupart des cellules de l'organisme et elle est répartie de façon homogène dans la cellule elle est à la fois nucléaire et cytoplasmique.

1.3.3. Protéine de famille JAK

La protéine JAK est une protéine à fonction tyrosine kinase qui fait partie de la sous famille des protéines Janus Kinase qui sont des molécules de signalisation intracellulaire non réceptrices. Cette sous-famille comprend quatre membres: JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (Tyrosine Kinase 2), dont les poids moléculaires varient entre 120 et 130 kDa.

L'expression de JAK1, JAK2 et Tyk2 est ubiquitaire, alors que celle de JAK3 est restreinte aux cellules hématopoïétiques [10].

2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Les inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) constituent la deuxième classe de thérapies ciblées. Contrairement aux anticorps monoclonaux qui sont des glycopeptides, injectables de

haut poids moléculaire ciblant essentiellement les domaines extracellulaires des récepteurs tyrosine kinase (RTK).

les ITK sont des petites molécules hétérocycliques de faible poids moléculaire (400-600 g/mol), administrées par voie orale [3]. Elles diffusent à travers la membrane cellulaire et ciblent la partie intracellulaire des récepteurs à activité tyrosine kinases et les tyrosines kinases cytoplasmiques [8].

2.1.Mécanisme d'action :

Les inhibiteurs de tyrosine kinase traversent la membrane plasmique des cellules, par diffusion passive [3], et se fixent de manière compétitive (figure 6) sur les sites de liaisons de l'ATP bloquant ainsi l'activation des sites tyrosine kinase. Par voie de conséquence, la signalisation cellulaire en aval est interrompue, rétablissant ainsi le contrôle de la prolifération de la survie cellulaire. Dans les tumeurs solides, cette inhibition de TK a des conséquences sur l'angiogenèse la diffusion métastatique, la prolifération et l'apoptose [1].

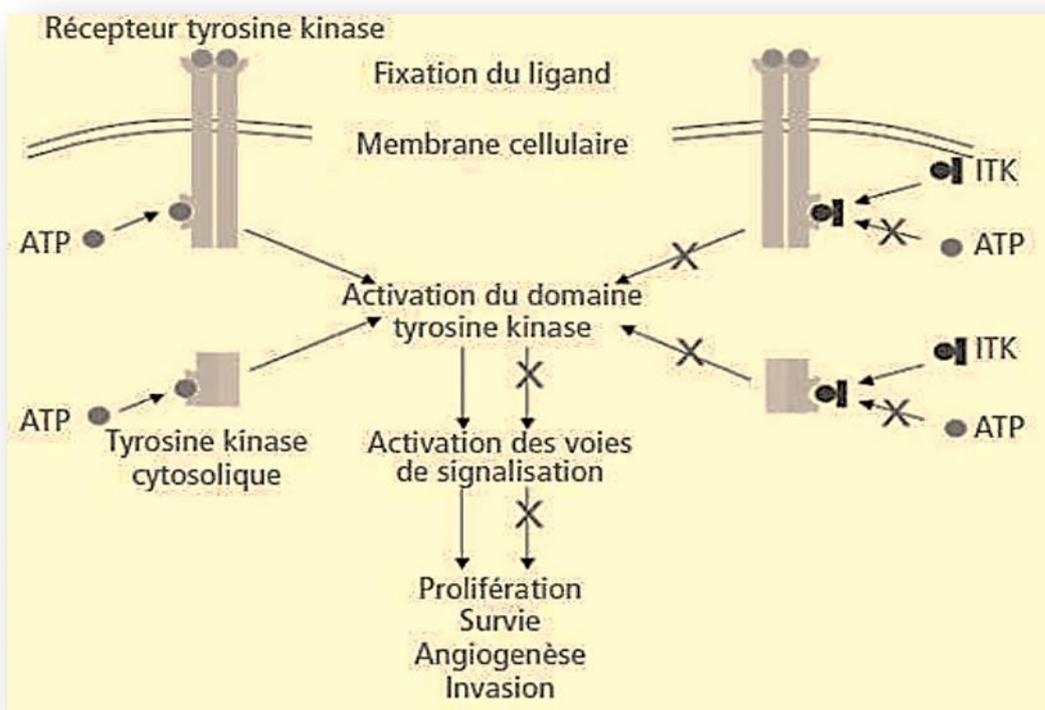


Figure N°6 : Mode d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK).

2.2.Principales cibles thérapeutiques

Les principales cibles ayant abouti au développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase sont Bcr-Abl, les récepteurs de la famille de l'human epidermal growth factor receptor (HER), les récepteurs au platelet derived growth factor (PDGFR) et au vascular endothelial growth factor (VEGFR) [1].

2.3 Les classes des inhibiteurs des TK :

La plupart de ces inhibiteurs sont des molécules appartenant à la famille des anilinoquinazolines ou leurs analogues. utilisé principalement dans le traitement des cancers. Ce sont pour les plus connus, imatinib, gefitinib, erlotinib, sorafenib, sunitinib, dasatinib, lapatinib et nilotinib le bosutinib, le cabozantinib, le crizotinib, le dabrafenib, le dasatinib, l'erlotinib, l'imatinib, le sorafénib, le sunitinib, le tofacitinib, le vemurafenib....

Selon leur mode d'action, Ils peuvent être classés en deux catégories, ceux qui inhibent directement la protéine, ou ceux qui se fixent sur son récepteur pour empêcher l'activation par la tyrosine kinase [12].

A. ITK ciblant Bcr-Abl

1. Imatinib : Glivec®, STI-571

1.1 Formule chimique

C₂₉H₃₁N₇O

PM : 493,6 g/mol

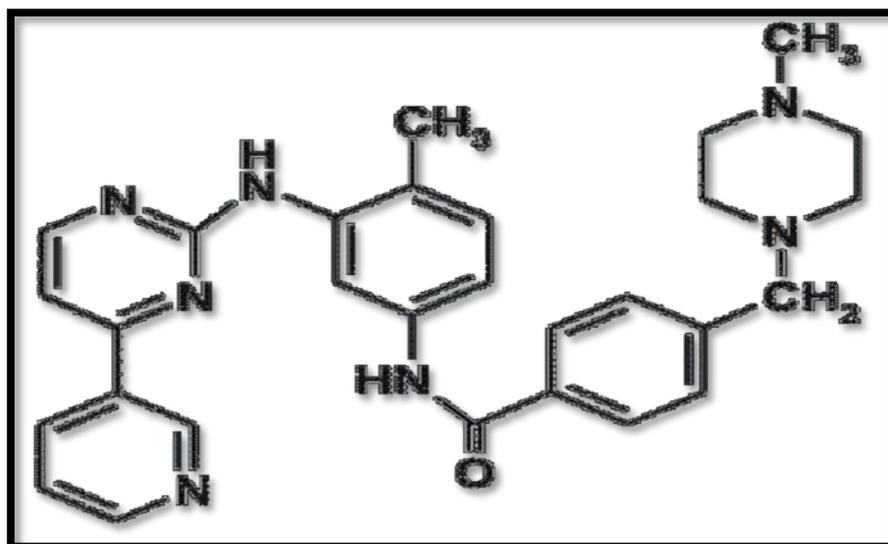


Figure N°7: Structure chimique de l'Imatinib .

L'imatinib est un inhibiteur compétitif très puissant et sélectif des tyrosines kinases Bcr-Abl. C'est le premier médicament anticancéreux de la catégorie des anti-tyrosines kinases [9]. Il est indiqué dans le traitement des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) à chromosome Philadelphie positif (Ph+) nouvellement diagnostiquée ou en phase chronique après échec du traitement par l'interféron alpha, ou en phase accélérée ou en crise blastique[8].

L'imatinib est également indiqué chez l'adulte dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)), qui expriment une mutation activatrice de kit1.L'efficacité de l'imatinib dans les GIST est basée sur les taux de réponses objectives [1].

1.2 Mécanisme d'action

L'Imatinib repose sur la neutralisation de l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL par inhibition compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de la protéine kinase

(Figure N°8). L'analyse de la structure cristallographique du domaine kinase d'Abl complexé avec l'Imatinib, montre qu'il existe une poche constituée d'acides aminés dont certains sont impliqués dans les interactions avec l'ATP et d'autres se lient à l'imatinib empêchant ainsi la phosphorylation du substrat [13]. Il en résulte une inhibition de l'autophosphorylation de l'enzyme, qui interfère avec son activation et bloque le signal de transduction [8], une inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose (Figure N°8) [13].

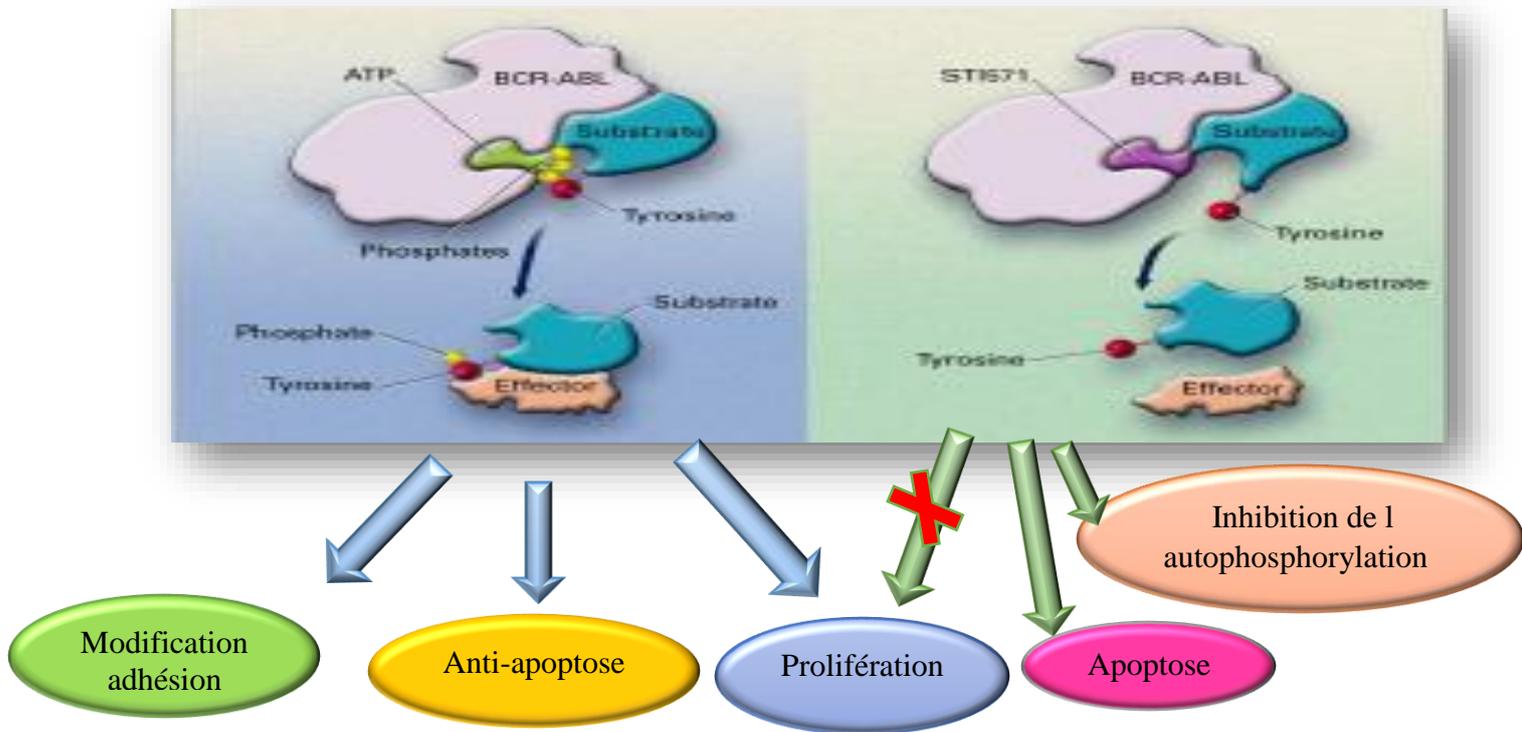


Figure N°8 : Mécanisme d'action de l'Imatinib sur Bcr-Abl

2. Nilotinib: TASIGNA® / l'AMN107

2.1. Formule chimique

$C_{28}H_{22}F_3N_7O$

PM : 529.52 g/mol

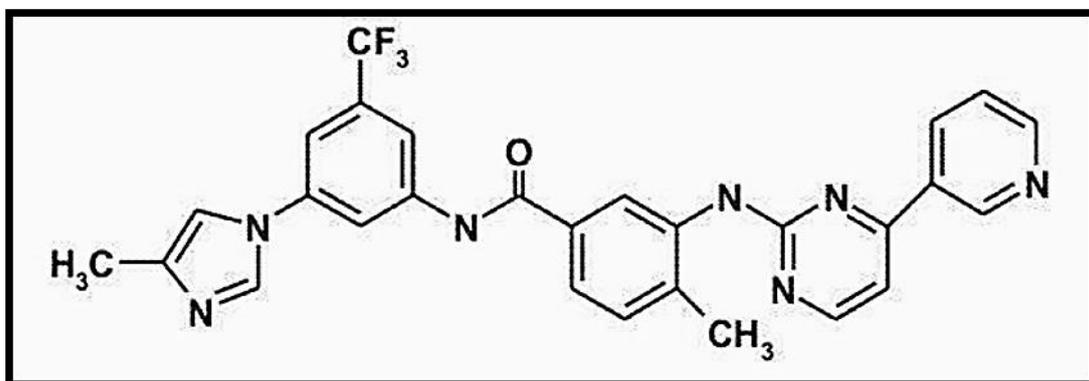


Figure N°9 : Structure chimique de Nilotinib.

Le Nilotinib (Figure 8) est un puissant inhibiteur hautement sélectif des tyrosine-kinases Bcr-Abl, c-Kit et PDGFR. En effet, le Nilotinib inhibe l'activité de la plupart des mutants de Bcr-Abl responsable de la résistance à l'Imatinib. Son développement est le fruit d'efforts des modifications de la structure chimique de l'Imatinib visant à créer un inhibiteur d'un nouveau type, plus sélectif pour sa molécule cible [8].

2.1 Mécanisme d'action

Le Nilotinib est un inhibiteur puissant de l'activité tyrosine kinase de l'oncoprotéine Bcr-Abl, ayant une forte affinité pour le site d'ATP avec lequel il va entrer en compétition. In vitro il est 25 fois plus puissant que l'Imatinib, également actif contre 32 sur 33 formes mutantes du Bcr-Abl résistantes à l'imatinib à l'exception de la mutation T315I. En raison de cette activité biochimique, le nilotinib inhibe de manière sélective la prolifération et induit l'apoptose au niveau des lignées cellulaires et des cellules leucémiques primaires chromosome Ph+, chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Il inhibe aussi la PDGFR et la kinase c-kit aux doses thérapeutiques [8].

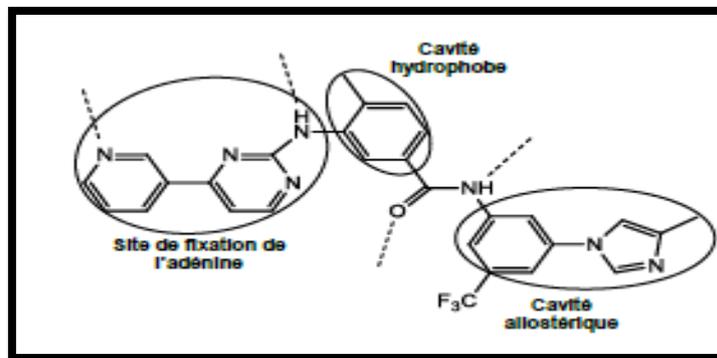


Figure N°10 : Mode de liaison du nilotinib à Bcr-Abl (Les pointillés noirs représentent les liaisons hydrogène)

3. Dasatinib : SPRYCEL®

3.1 Formule chimique

C₂₂H₂₆ClN₇O₂S

PM : 488,01 g/mol

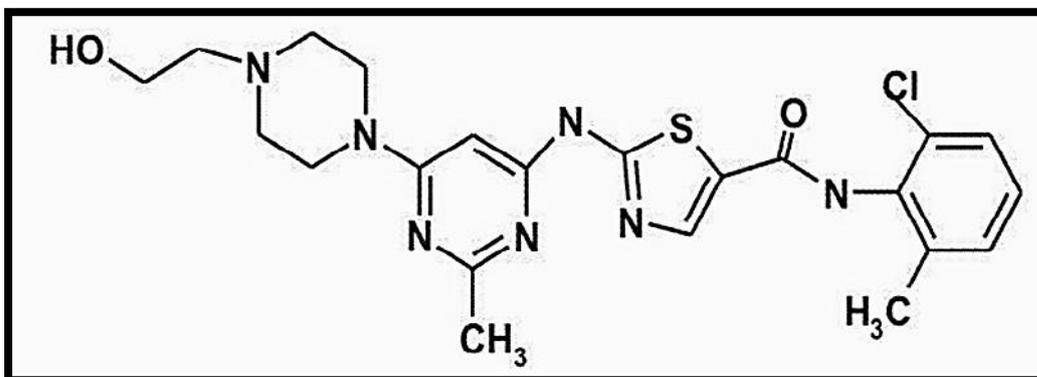


Figure N°11 : Structure chimique du Dasatinib

Dasatinib a été développé sur la base d'une structure complètement différente de celle de l'Imatinib. Il inhibe la kinase Bcr-Abl, kinases de la famille SRC, un certain nombre d'autres kinases oncogènes sélectives dont c-KIT, les récepteurs de l'éphrine (EPH), et le récepteur bêta du PDGF(PDGFR) [8, 1].

Le dasatinib est indiqué dans la LMC en phase chronique, accélérée ou blastique, en cas de résistance ou d'intolérance à un traitement antérieur impliquant l'imatinib [13].

3.2 Mécanisme d'action

Le DASATINIB est un dérivé pyrimidinique, qui a un mécanisme d'action semblable à celui de l'imatinib, il inhibe l'activité de la kinase Bcr-Abl, des kinases de la famille SRC, constituée de kinases de signalisation pro-oncogéniques [10].

Cette molécule est capable de se lier à la conformation active et inactive de l'enzyme Bcr-Abl, contrairement à l'Imatinib qui ne peut se fixer qu'à la conformation inactive du domaine tyrosine kinase Bcr-Abl.

In vitro, Dasatinib est actif sur différentes lignées cellulaires leucémiques sensibles et résistantes à l'Imatinib. [8]

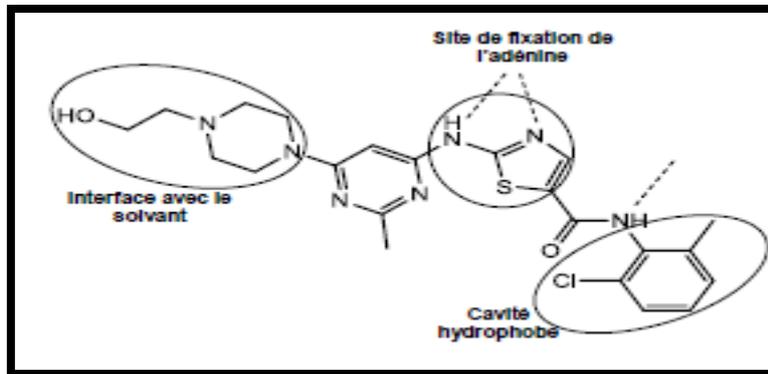


Figure N°12 : Mode de liaison du dasatinib à Bcr-Abl (Les pointillés noirs représentent les liaisons hydrogène).

B. Inhibiteurs des tyrosine kinases liées à l'EGF

1. Gefitinib : Iressa®, ZD 1839

1-1- Formule chimique

C₂₂H₂₄ClFN₄O₃

PM : 446,9 g/mol

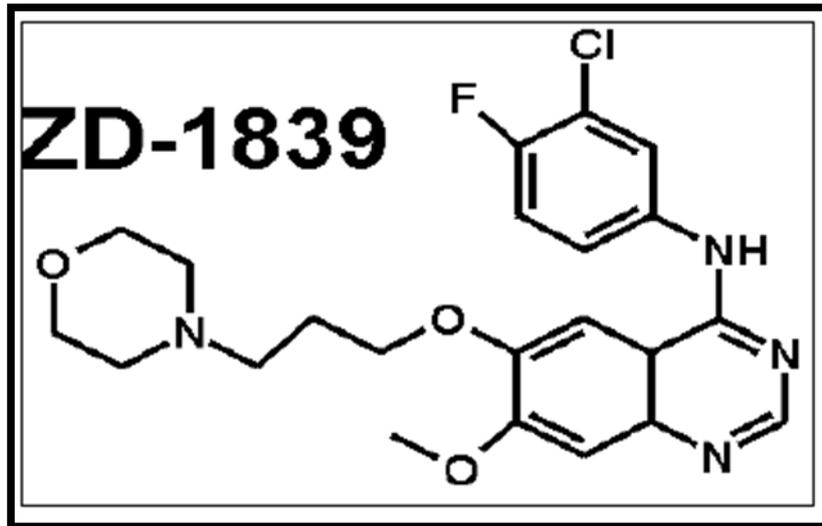


Figure N°13 : Structure chimique du Gefitinib

Le gefitinib est un inhibiteur de type I qui se lie au domaine kinase de l'EGFR en conformation active. Il est indiqué dans le traitement des cancers bronchiques.

1.2 Mécanisme d'action

ZD1839 (**Iressa**®) est une petite molécule dérivée des quinazolines, qui inhibe de façon réversible l'activité tyrosine kinase d'EGFR, par compétition avec le site de fixation de l'ATP au niveau intracellulaire.

Le ZD 1839 inhibe l'autophosphorylation et la Trans phosphorylation d'EGFR. Il a une action antiproliférative et proapoptotique, seul ou en association avec différents cytotoxiques. Le gefitinib est administrée par voie orale. A faible dose c'est un cytostatique, à dose plus élevés il inhibe fortement la prolifération, a un effet proapoptotique il inhibe la formation de clones. Son effet sur la diminution de la phosphorylation de l'EGFR est dose dépendante in vitro et in vivo. Il existe une potentialisation, additive et synergique, en association avec les agents cytotoxiques (taxanes, sels de platine, anthracyclines, étoposide, topotecan), à la radiothérapie et au trastuzumab (157, 158, 159)

In vivo, son effet sur la croissance tumorale est observé à partir de 50mg /kg, il est maximum pour des doses de 150 à 200mg/kg [3]

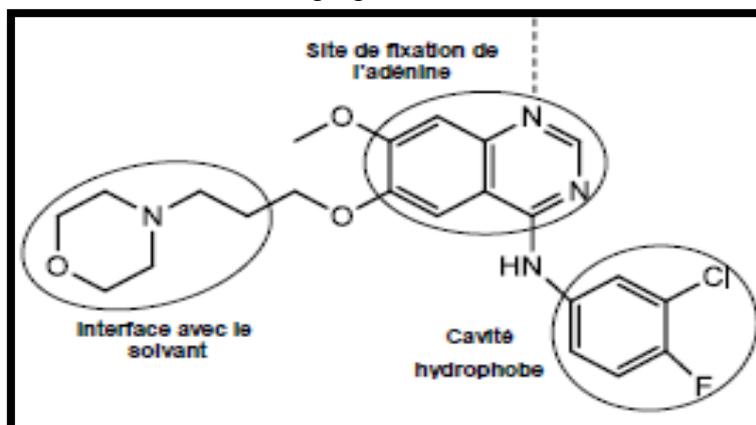


Figure N°14 : Mode de liaison du gefitinib à l'EGFR, d'après Wu et al

Le Bosutinib (Figure16) est un nouvel inhibiteur de la tyrosine kinase **Bcr-Abl** actuellement en cours de mise au point. Comme l'Imatinib, le Nilotinib et le Dasatinib il inhibe à la fois les kinases bcr-abl et Src. Au cours d'expériences en laboratoire, il s'est révélé efficace contre une grande variété de mutations bcr-abl Y253F, E255K et D276G, mais pas le mutant T315I [10].

1.2 Mécanisme d'action

Le Bosutinib a une activité antiproliférative sur les cellules portantes du Bcr- Abl, sensibles ou résistantes à l'Imatinib, y compris les Y253F, E255K et D276G, mais pas le mutant T315I.

Il se lie aux conformations inactives et intermédiaires du domaine kinase de Bcr-Abl. Il induit modestement l'apoptose des progénitures Ph⁺ et il n'élimine pas les cellules souches leucémiques quiescentes [8].

D. ITK - JAK-2

1. Pacritinib (SB1518)

1.1. Formule chimique

C₂₈ H₃₂ N₄ O₃

PM : 472.58 g/mol

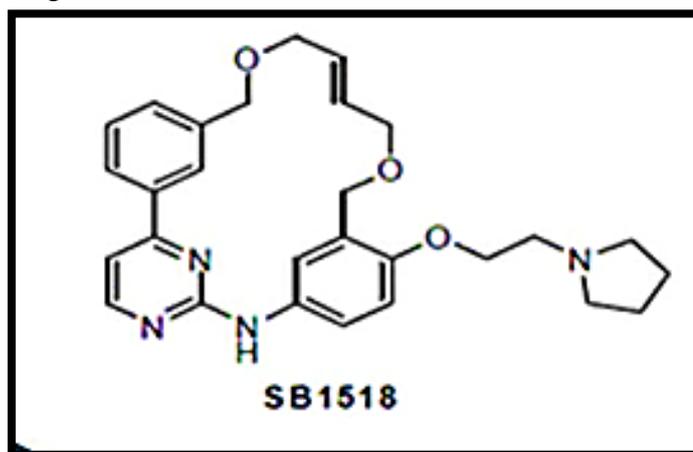


Figure N°17 : Structure chimique du Pacritinib

Pacritinib (INN) est un inhibiteur de la Janus kinase macrocyclique qui est en cours de développement pour le traitement de la myélofibrose . Il inhibe principalement la kinase Janus 2 (JAK2) et la tyrosine kinase 3 de type Fms (FLT3) [14].

1.2 Mécanisme d'action

Le pacritinib (puh-CRIT-i-nib) est un inhibiteur oral de la tyrosine kinase (ITK) actif contre deux mutations activatrices importantes: la kinase associée à Janus 2 (JAK2) et la tyrosine kinase 3 de type FMS (FLT3). La famille d'enzymes JAK est un élément central des voies de transduction du signal, qui sont essentielles à la croissance et au développement normal des cellules sanguines ainsi qu'à l'expression des cytokines inflammatoires et aux réponses immunitaires. Les mutations activatrices de JAK2 sont impliquées dans certains cancers liés au

sang, y compris les néoplasmes myéloprolifératifs (MPN), la leucémie et certaines tumeurs solides. FLT3 est un gène couramment trouvé chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (LAM). Le pacritinib a démontré des résultats encourageants dans les études de phase 1 et 2 chez les patients atteints de myélofibrose et pourrait offrir un avantage sur les autres inhibiteurs JAK par un traitement efficace des symptômes tout en présentant moins de thrombocytopénie et d'anémie que dans le traitement actuellement en cours [15].

2. Lestaurtinib (CEP-701)

2.1. Formule chimique

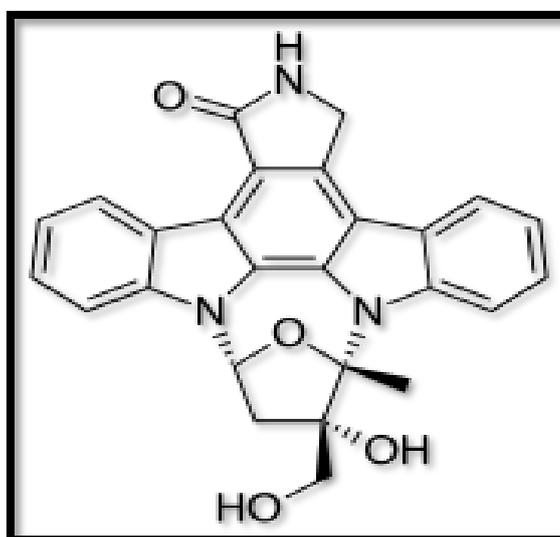
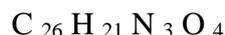


Figure N°18 : Structure chimique de Lestaurtinib

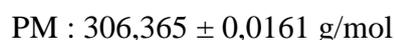
Lestaurtinib (rINN , nom de code CEP-701) est un inhibiteur de la tyrosine kinase structurellement apparenté à la staurosporine . Ce dérivé semi-synthétique de l' indolocarbazole K252a a été étudié par Cephalon en tant que traitement pour divers types de cancer. C'est un inhibiteur des kinases fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3), Janus kinase2(JAK2), tropomyosine récepteur kinase (*trk*) A (TrkA), TrkB et TrkC [16].

2.2. Mécanisme d'action

Est un inhibiteur de JAK2 .Il augmente la prolifération des lymphocytes et l'expansion clonales de cellules tueuses ainsi en la production des cytokines comme TNF [17].

3. Le Ruxolitinib Jakavi (INCBO18424)

3.1. Formule chimique $C_{17}H_{18}N_6$



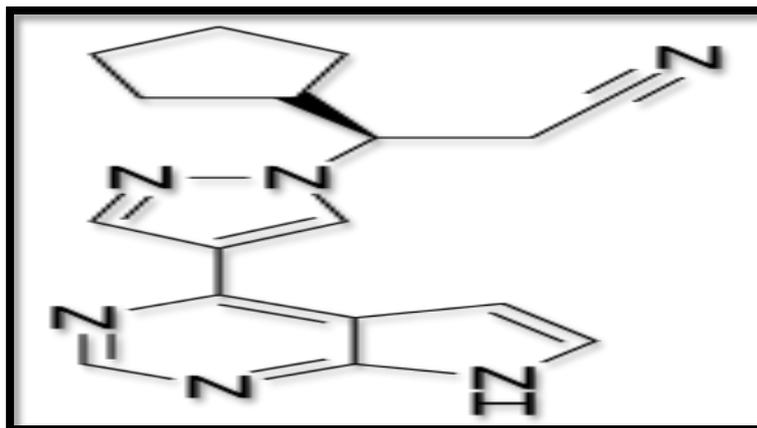


Figure N°19 : Structure chimique de Ruxolitinib

Le ruxolitinib est un anticorps monoclonal inhibiteur des JAK1 et JAK2. Il est éradiquant les cellules tumorales de la rate du foie et de la moelle osseuse et normalise les taux circulants de IL6 et TNF (alpha) [18]. Le ruxolitinib appartient à la classe de médicaments appelés *antinéoplasiques*, ou médicaments anticancéreux. Il s'agit, plus précisément, d'un inhibiteur de la protéine kinase [19].

3.2. Mécanisme d'action

Le ruxolitinib est un inhibiteur sélectif des Janus kinases JAK (JAK1 et JAK2). Le ruxolitinib inhibe la signalisation JAK/STAT et la prolifération cellulaire de modèles de cellules d'hémopathies malignes dépendantes des cytokines, ainsi que des cellules Ba/F3 rendues indépendantes des cytokines en exprimant la protéine mutée JAK2V617F, avec des CI50 de 80 à 320 nM [20].

4. Momelotinib (CYT387)

4.1. Formule chimique

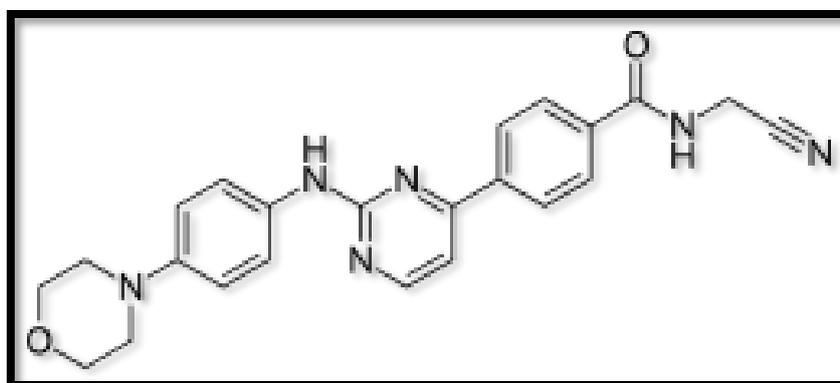
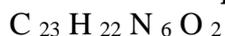


Figure N°20 : Structure chimique de Momelotinib

CYT387 est un inhibiteur compétitif de l'ATP des Janus kinases JAK1 et JAK2 (IC50 = 11 et 18 nM, respectivement). Il affiche significativement moins d'activité contre d'autres kinases,

y compris JAK3 ($IC_{50} = 0,16 \mu M$).¹ De 0,5 à 1,5 μM , CYT387 provoque la suppression de la croissance et l'apoptose dans les lignées cellulaires hématopoïétiques JAK2-dépendante [21].

4.2. Mécanisme d'action

Inhibiteur compétitif ATP de **JAK1 / JAK2** ; CYT387 inhibe la prolifération des cellules Ba / F3 parentales (Ba / F3-wt) stimulées par l'IL-3 avec une IC_{50} de 1400 nM dans les lignées cellulaires constitutivement activées par JAK2 ou MPLc IC_{50} de En outre, CYT387 a été montré pour inhiber la croissance des colonies érythroïdes in vitro à partir de patients PV JAK2V617F positifs avec une activité similaire avec IC_{50} de 2 à 4 μM . Une étude récente montre que CYT387 inhibe la signalisation PI3K / AKT et Ras / MAPK induite par IL-6 et IGF-1. De plus, CYT387 induit l'apoptose en monothérapie et agit en synergie avec les traitements anti- myélome multiple (MM) primaire [22].

5. Fedratinib (TG101348 ; SAR302503)

5.1. Formule chimique

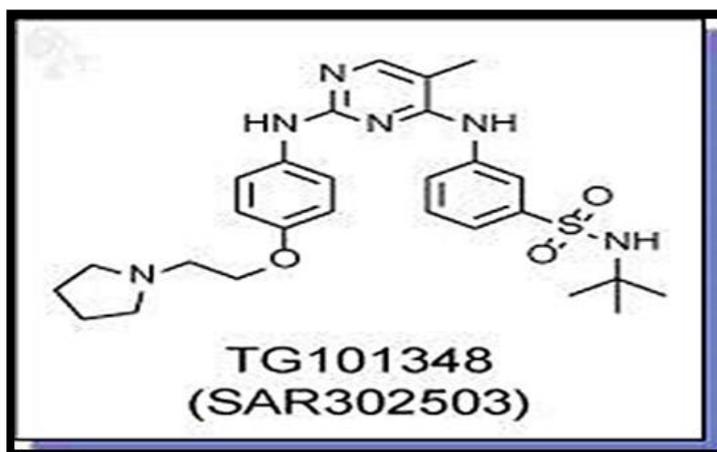
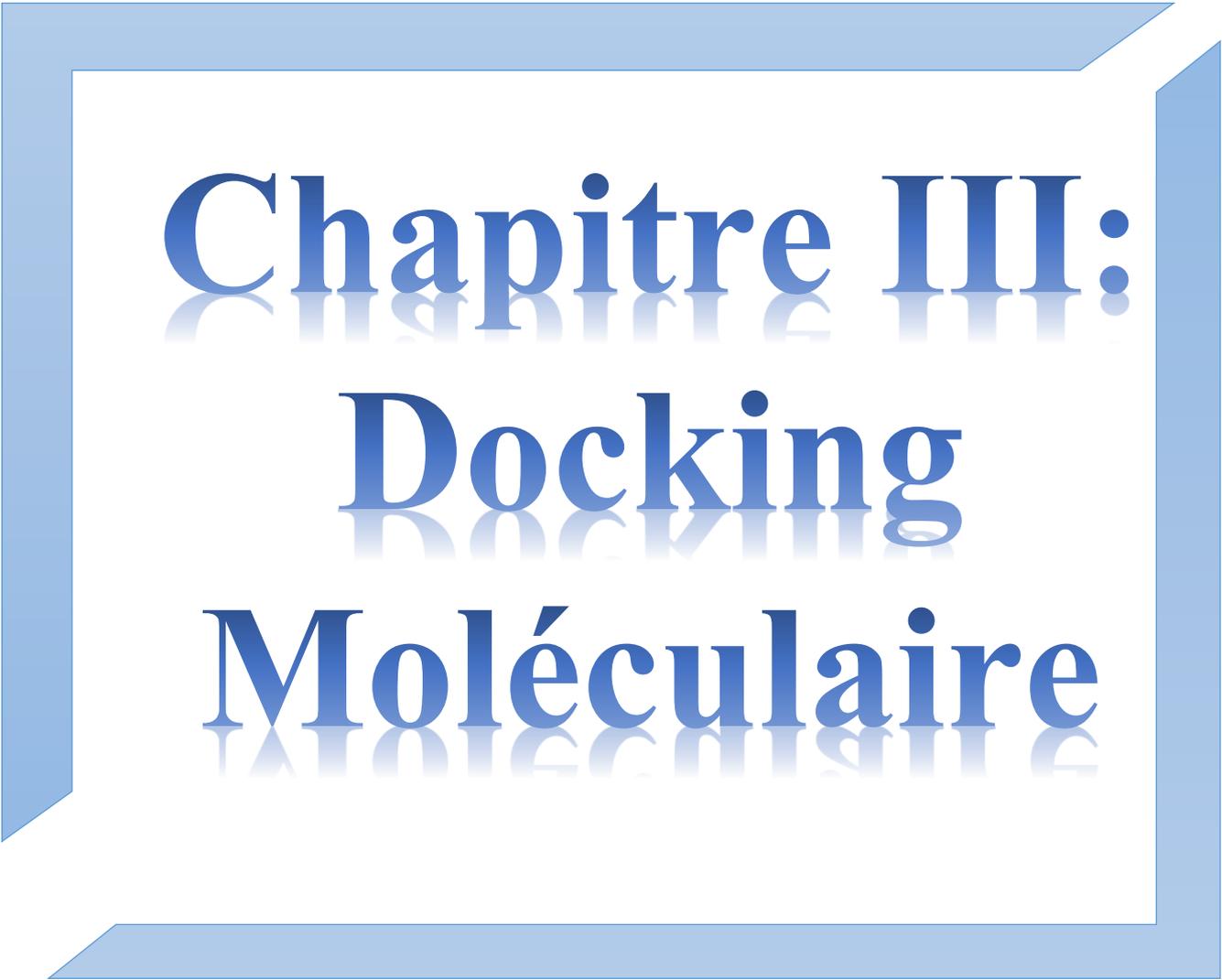


Figure N°21 : Structure chimique de Fedratinib

Fedratinib (TG101348 ; SAR302503) est un inhibiteur de la Janus kinase 2 (JAK-2) par voie orale développé pour le traitement des patients atteints de maladies myéloprolifératives, y compris la myélofibrose [23]

5.2. Mécanisme d'action

Le fedratinib agit comme un inhibiteur compétitif de la protéine kinase JAK-2 avec $IC_{50} = 6 \text{ nM}$; les kinases apparentées FLT3 et RET sont également sensibles, avec $IC_{50} = 25 \text{ nM}$ et $IC_{50} = 17 \text{ nM}$, respectivement. Significativement moins d'activité a été observée contre d'autres tyrosine kinases, y compris JAK3 ($IC_{50} = 169 \text{ nM}$) [23].



**Chapitre III:
Docking
Moléculaire**

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 préclinique [24]. L'identification et la mise au point de nouveaux médicaments se fait par l'amarrage moléculaire ou docking moléculaire sert souvent à déterminer l'orientation de petites molécules liées à leurs protéines ciblées afin de calculer leurs affinité et niveau d'activité. Ainsi, l'amarrage joue un rôle important dans la conception pensée de nouveaux médicaments. En raison de sa valeur biologique et pharmaceutique, on s'est efforcé d'améliorer les méthodes qui calculent l'amarrage moléculaire.

Plusieurs méthodes permettent d'étudier l'interaction ligand-récepteur ou encore l'interaction d'une molécule avec un site actif.

1. Le Docking moléculaire

Le docking peut être défini comme étant l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation de complexes moléculaires. Il a des applications pratiques dans l'ingénierie des protéines et la conception de nouveaux médicaments. Il y a différents types de docking dont ligand-protéine, protéine-protéine, glucide-protéine et ADN-protéine.

Le « docking » moléculaire consiste à prédire la ou les structures des complexes formés entre une molécule active et une protéine.

- ❖ Les algorithmes de calcul génèrent aléatoirement un grand nombre d'orientations possibles pour trouver « la meilleure façon d'insérer » la molécule dans une protéine (au niveau du récepteur ou du site actif).
- ❖ Le programme prend en compte tous les degrés de liberté de la molécule (translation et rotation).
- ❖ Pour chaque possibilité l'énergie est calculée en Mécanique Moléculaire, prenant ainsi en compte toutes les interactions ligand-récepteur (liaisons de Van der Waals, liaisons H, hydrophobie...).
- ❖ On obtient ainsi un « score » pour estimer la meilleure interaction ligand/ récepteur.
- ❖ Le score est l'enthalpie libre de liaison (il doit être minimisé) [25].

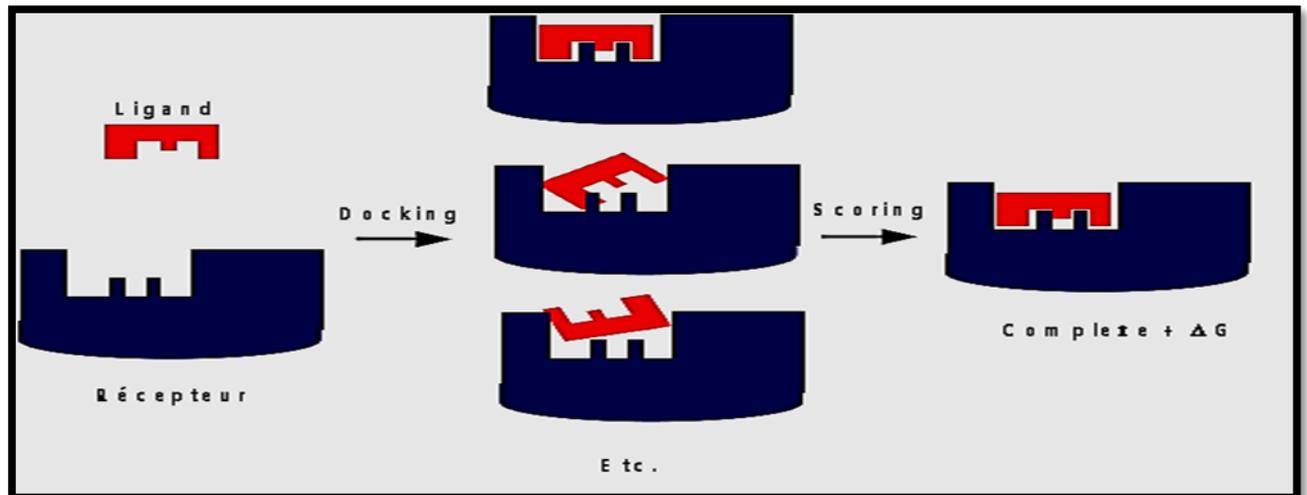


Figure N°22 : Simulation du Docking et scoring

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes complémentaires : le docking et le scoring.

- **Le Docking (la première) :** 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 [26].

2. Les outils du docking moléculaire

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 (protéine).

2.1. Ligand

Un ligand est un atome, un ion ou une molécule portant des fonctions chimiques lui permettant de se lier à un ou plusieurs atomes ou ions centraux. Le terme de ligand est le plus souvent utilisé en chimie de coordination et en chimie organométallique (branches de la chimie inorganique).

En biologie, un ligand (du latin *ligandum*, liant) est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal. Ce terme, très utilisé pour l'étude de protéines, désigne les molécules qui interagissent avec la protéine de manière non-covalente et spécifique et qui jouent un rôle dans ses fonctions.

La liaison d'un ligand à une protéine réceptrice modifie souvent la conformation de cette dernière, c'est-à-dire sa structure en trois dimensions (3D). L'énergie associée aux interactions intermoléculaires formées entre la protéine et son ligand permet de promouvoir ce changement de conformation, appelé ajustement induit. Cette modification structurale peut ainsi moduler éventuellement son état fonctionnel et son activité. [27].

La structure des ligands est obtenue par deux moyens :

-Le premier : consiste à utiliser des ligands du pdb ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2...) grâce à des logiciels de construction moléculaires tels que Titan

-Le deuxième : consiste à utiliser des collections de molécules (chimiothèques) virtuelles aussi bien commerciales, est constituée de bases de données de structures chimiques appelées chimiothèques ou espaces chimique les plus utilisées, nous citons la PubChem [28].

2.2. Récepteur

Est macromoléculaire étant le plus souvent une protéine [29] ; pour l'obtention des récepteurs, on utilise les structures 3D des protéines qui sont accessibles gratuitement dans la banque de donnée PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Il s'agit d'une grande archive de données structurales de macromolécules biologiques : protéines et acides nucléiques (ADN, ARN). Les données structurales sont obtenues par cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMN et sont accessibles gratuitement sur internet via des sites Web définis de ses organisations membres dont : RCSB PDB, PDBj, PDBe,...etc. En mois de mai 2018, la PDB compte plus de 141616 structures de bio-macromolécules.

Les différentes conformations tridimensionnelles sont téléchargeables sous extension *pdb* lisibles par les logiciels de docking et contenant diverses informations sur la protéine en question. Par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolue la structure, la méthode expérimentale, ...etc. On y retrouve aussi des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée.

Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la banque, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée [28].

3. Comparaison et superposition de molécules

L'activité biologique d'une molécule est souvent corrélée à sa capacité à interagir avec le site actif d'une enzyme ou bien encore au niveau d'un récepteur. Modéliser l'ensemble de l'interaction ligand-récepteur peut être relativement coûteux en temps de calcul. Parfois même si la structure 3D du récepteur n'est pas connu et n'est pas encore disponible dans la PDB, rendant cette étude quasiment impossible. Dans une première approximation on peut superposer la structure 3D (préalablement optimisée) d'une molécule nouvelle avec une molécule biologiquement active et connue pour une pathologie donnée.

On peut alors savoir si la nouvelle molécule a une chance d'être active et si elle a un mécanisme d'action similaire à la molécule de référence.

3.1. Définition du RMS

Le RMS est un indice standard pour « mesurer » la « qualité » de la superposition

où r_i^A et r_j^B sont les coordonnées de l'atome i dans les molécules A et B , respectivement.

où d_{ij}^A et d_{ij}^B sont les distances entre les atomes i et j des molécules A et B , respectivement.

Au fur et à mesure que le RMS augmente on commence à voir apparaître des différences significatives entre les conformations les valeurs de RMS dépendent également de la taille des systèmes étudiés.

On peut utiliser le RMS pour superposer des protéines et étudier les différences de structure 3D entre différentes isoformes, ou encore les différences de conformation induites par une mutation [25].

4. les programmes du docking

A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont respectivement : AutoDock, GOLD, FlexX, DOCK et ICM (voir figure 15). Ils permettent notamment un criblage rapide de vastes bibliothèques de composés. Ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques (Algorithme génétique, Recuit Simulé...), leur protocole est composé de 2 étapes essentielles *Docking / Scoring* [30].

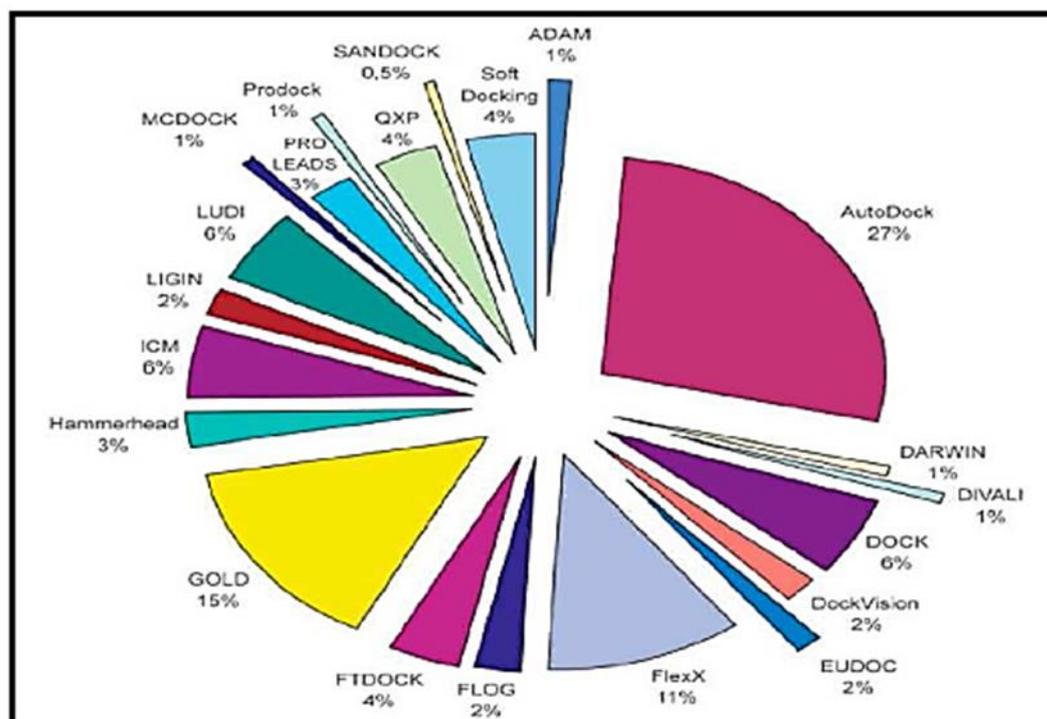


Figure N°23 : Comparaison des programmes de docking les plus cités.

Le Tableau N°1 : Principaux programmes du docking moléculaire.

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



Chapitre IV :
Matériel
Et
Méthode

1. Matériel

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 tyrosine kinase. Pour ce faire, nous avons utilisé le matériel suivant :

1.1. Microordinateur

Nous avons utilisé un microordinateur ayant une mémoire vive de 4 Go.

Tous les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7

1.2. Programmes

Dans cette étude, plusieurs programmes ont été utilisés pour réaliser la partie pratique :

-le premier programme « **VMD** » (*visual molecular dynamics*) version 1.9.1, sert à préparer et visualiser aussi bien l'enzyme que les ligands étudiés [31].

- « **OpenBabel** » version 2.0.2, nous a facilité la conversion d'un fichier contenant des données chimiques d'un format à un autre (pdb, mol2, mol, sdf, smi....etc) [32].

- « **Surflex** » version 1.3, afin de réaliser un Docking moléculaire rapide capable d'arrimer les ligands dans un environnement constitué d'acides aminés avec une bonne précision.

-« **ViewerLite** » version 4.2, pour la visualisation des interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes formées entre les différents inhibiteurs et le site actif de l'enzyme étudiée [33].

- « **Molinspiration** » version 2013, utilisé pour les calculs des paramètres décrits dans la règle de Lipinski [34].

1.3. Banques de Données :

1.2.1. « PDB » (*Protein Data Bank*) :

Est une collection mondiale de données sur la structure 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 [35].

1.2.2. « Pubchem »

C'est une banque de données américaine des molécules chimiques gérée par NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Elle contient actuellement plusieurs millions de composés dont la structure et les propriétés physico-chimiques sont gratuitement accessibles. Cette banque a été utilisée pour faire ressortir des similaires structuraux de notre ligand [36].

2 Méthodes

2.1.Préparation de la protéine

La cible thérapeutique que nous avons étudiée dans notre travail est la TYROSINE KINASE –JAK2 dont la structure 3D a été obtenue dans la banque de donnée PDB. En effet, cette banque nous a proposé 26 structures cristallographiques de complexe « tyrosine kinase humaine – inhibiteur », dont trois (03) avec une résolution inférieure à 2 Å.

Les codes PDB de ces complexes des " TYROSINE KINASE –JAK2 " ainsi que leurs inhibiteurs sont représentés dans le tableau N° 2.

Tableau N° 2 : Les codes PDB des complexes "Tyrosine kinase humaine -inhibiteur" avec Leur résolution.

Code complexe PDB	Code inhibiteur PDB	Résolution (Å)
4JIA	1K3	1.85
5EAP	QUP	1.95
3E64	5B3	1.99

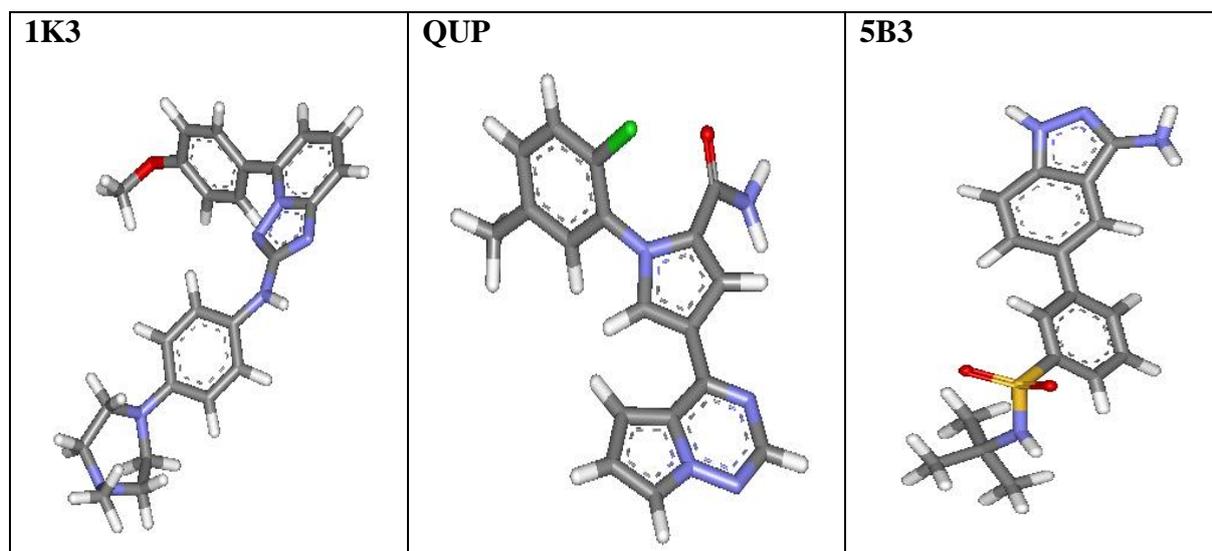


Figure N°24 : Représentation des différents ligands de référence.

Parmi ces complexes ainsi préparées, nous avons choisi le code 4JIA ce choix est dicté par leur faible valeur de résolution 1.85 Å. Le complexe a été téléchargé au format Pdb.

L'enzyme étant formée d'une seule chaîne, nous avons éliminé les molécules d'eau et le ligand pour permettre une utilisation plus aisée de l'enzyme avec un site actif libre lors du docking moléculaire. La protéine ainsi préparée est enregistrée dans un fichier de format .mol2 que reconnaît le programme Surflex.

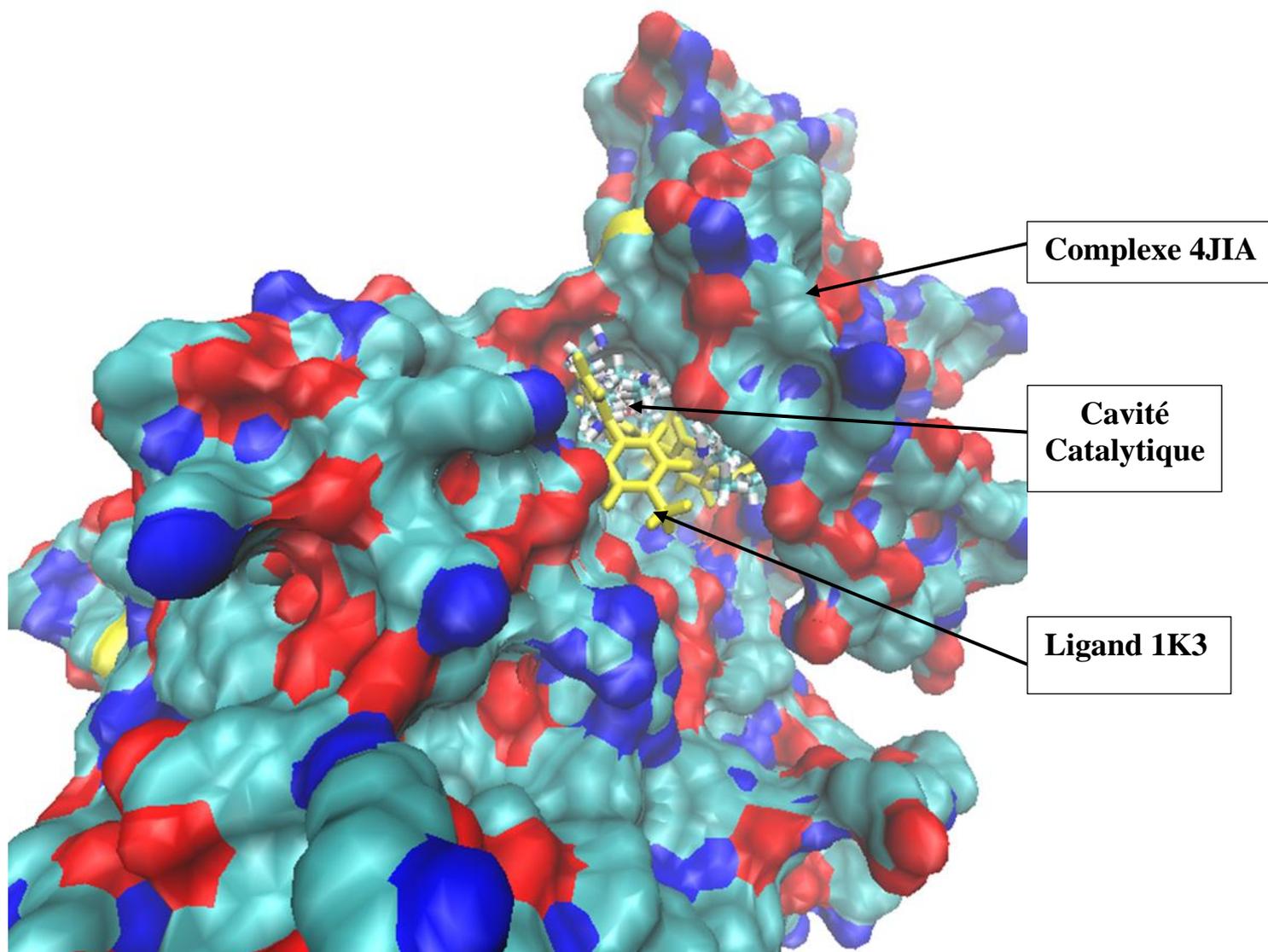


Figure N° 25 : Représentation par VMD de la protéine 4JIA avec le ligand pdb 1K3 positionné dans la cavité catalytique.

2.2. Préparation de Ligand

Le ligand 1K3 de la Tyrosine Kinase JAK-2 précédemment a été séparé du complexe 4JIA et enregistré dans un autre fichier sous le format.mol2.

Ce ligand de référence (1K3) servira pour la génération du protomol par Surfex.

2.3. Génération du protomol

Le programme Surfex a été utilisé pour réaliser le docking semi-flexible des ligands dans le site actif d'une cible donnée [37]. Dans un premier temps, il génère une pseudo-molécule

appelée « protomol » au format **.mol2** pour identifier le site actif de l'enzyme étudiée, grâce à la commande suivante :

```
surfex-dock proto ligand.mol2 protein.mol2 pl
```

Dans notre travail, pour générer le protomol en utilisant l'inhibiteur de référence 1K3.mol2 et le complexe 4JIA.mol2 préparés précédemment par VMD.



Figure N° 26 : Protomol généré pour le complexe 4JIA (coloré en blanc).

2.4. Docking Moléculaire

Cette étape nécessite la disponibilité de la protéine format **.mol2**, le protomol généré dans l'étape précédente et les ligands sous format **.mol2**. Le docking moléculaire par « Surfex » permet d'avoir les dix (10) meilleures positions (conformations) de chaque ligand au sein du site actif étudié, classées par leur score [38]. Cette étape a été réalisée en utilisant la commande suivante :

```
surfex-dock dock ligand.mol2 pl-protomol.mol2 protein.mol2
```

2.5. 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 500g/mol.
- Un coefficient de partition (logP) ou une lipophile ≤ 5 .
- Le nombre de donneurs de liaisons Hydrogène un maximum de 5 (≤ 5).
- Le nombre d'accepteurs de liaisons Hydrogène Un maximum de 10 (≤ 10).
- nombre de fonctions rotatives (flexibles et linéaires) ≤ 15 .

• **LogP** 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 [39].

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur Molinspiration version 2013. [34].



Chapitre V :
Résultats
et
Discussion

1. La fiabilité du programme Surfex

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la TYROSINE KINASE par diverses molécules, nous avons tenté d'évaluer la fiabilité du programme Surfex utilisé. Pour cela, nous avons fait appel au test de RMSD et l'analyse visuelle.

1.1. Test RMSD

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (*root-mean-square déviation*) de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB. La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms [40].

Le test de fiabilité du programme Surfex par le RMSD, a été réalisé en utilisant 100 complexes protéines-ligands pris de manière arbitraire de la PDB. Les complexes sont téléchargés au format.pdb (voir annexe N°1).

Dans la figure suivante (Figure N°27), les résultats sont donnés en pourcentage (%), à deux intervalles de RMSD.

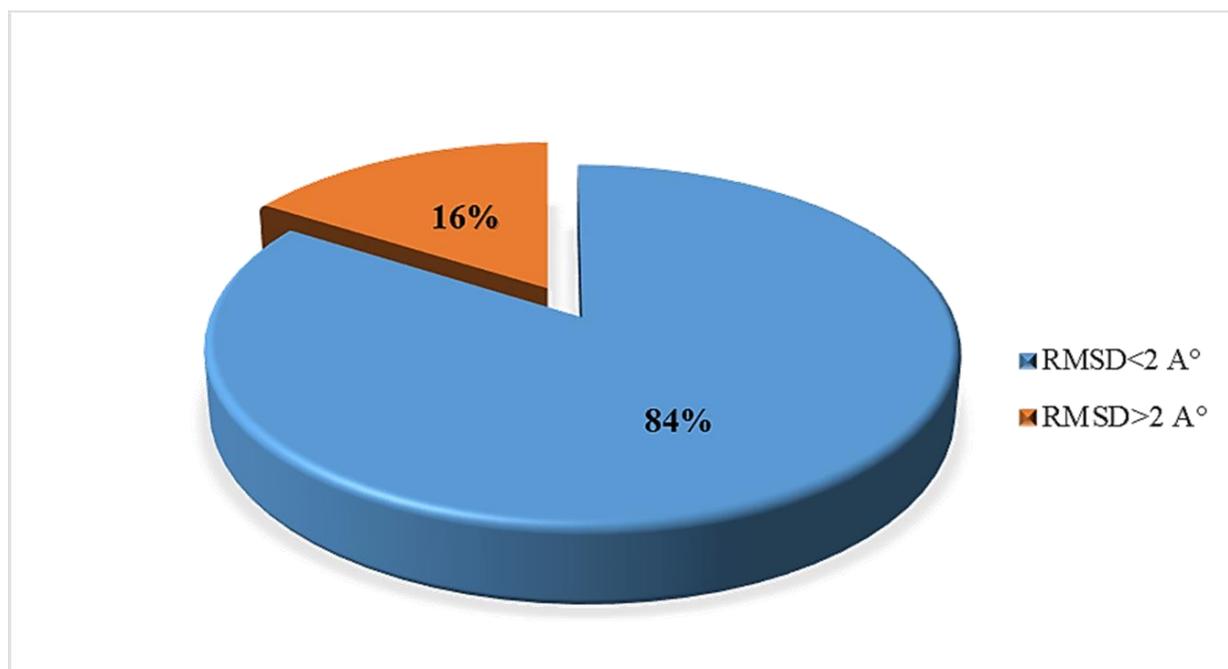


Figure N° 27 : Résultats en % obtenus par Surfex à deux intervalles de RMSD (Å).

La figure montre que 84 % des valeurs RMSD sont inférieures à 2 Å et que seulement 16 % des résultats sont supérieurs à 2 Å. Conformément aux travaux de Teniou S. (2012) de 85,8%, et Chikhi A., Bensegueni A. (2008) et Merzoug et al (2015) de 83 % qui révèlent un taux de RMSD inférieur à 2Å, ces résultats montrent que le programme Surfex simule correctement les interactions protéine-ligand.

Afin de nous assurer de la fiabilité de ce programme nous avons étudié spécifiquement les complexes Tyrosine kinase –inhibiteurs. Pour cela nous avons appliqué le test RMSD directement sur 26 complexes TK-JAK2-inhibiteur disponibles dans la PDB.

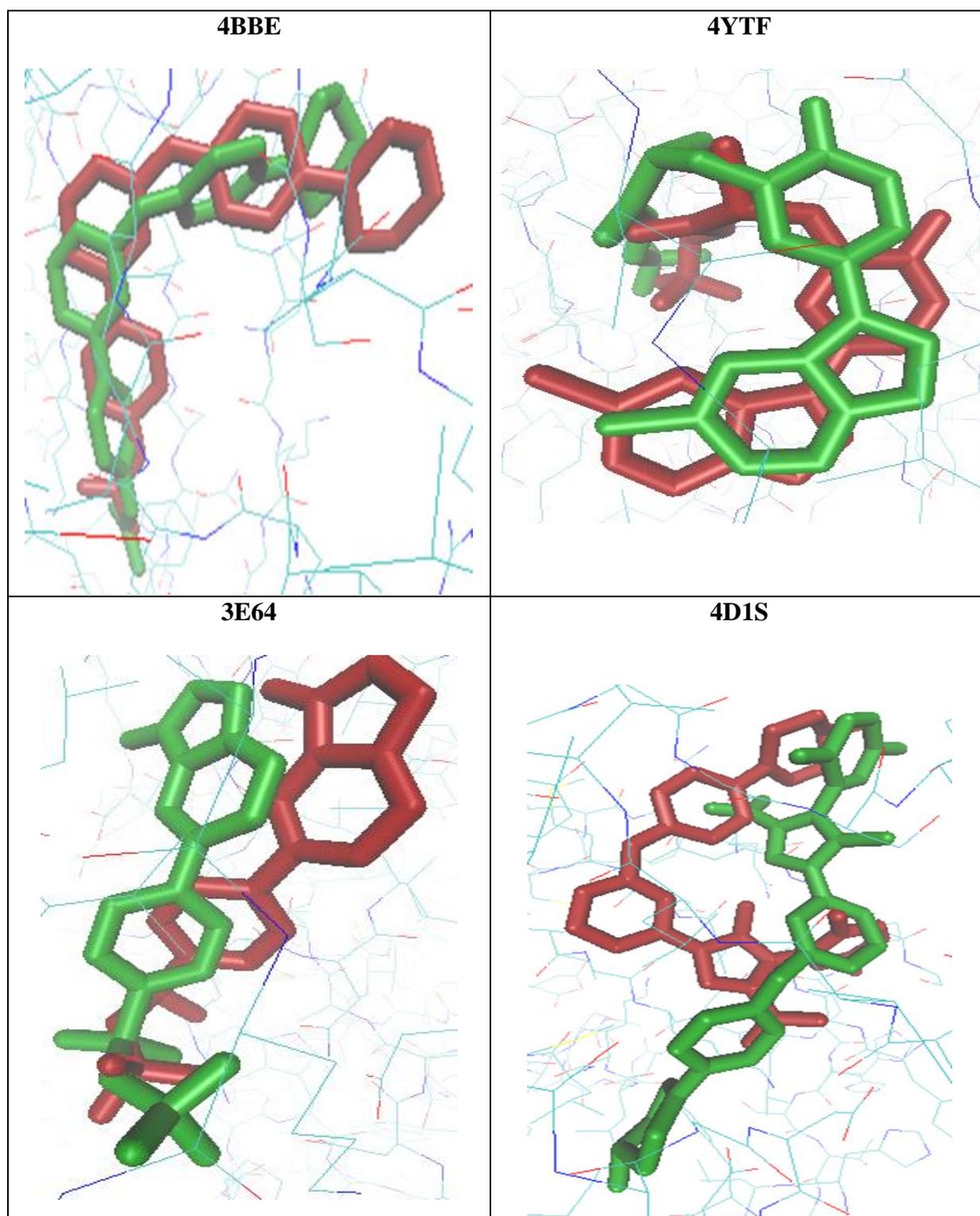
Les codes PDB de ces complexes et de leurs inhibiteurs ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenues avec Surfex sont mentionnés dans le tableau N° 3.

Tableau N° 3 : Valeurs de RMSD 26 complexes TK-JAK2-inhibiteur étudiés.

Code PDB des complexes	Code PDB des ligands	RMSD (Å)
3E 62	5B1	0.027
4JIA	1K3	0.641
4D0W	VVQ	0.691
5CF8	50V	0.705
4YTF	4HZ	0.709
5UT3	IK1	1.118
6BBV	D7D	1.288
5WEV	9ZS	1.403
4FVQ	ATP	1.404
5UT1	7DZ	1.406
3E 63	5B2	1.517
4E6Q	0NV	1.635
5UT2	3YT	1.73
4BBE	3O4	1.752
5I4N	ATP	1.892
4IVA	1J5	1.94
3E 64	5B3	2.089
5UT6	8MY	2.091
4D0X	953	2.111
4AQC	88A	2.247
5UT5	2HB	2.513
4D1S	BJG	2.61
3KRR	DQX	2.668
5AEP	QUP	2.676
5TQ8	7GS	3.652
5L3A	6DP	4.097

1.2.L'analyse visuelle

L'analyse visuelle est une étape essentielle pour confirmer les résultats du test RMSD. Elle permet de déterminer si un ligand simulé se superpose avec le ligand Co-cristallisé. En effet, l'analyse visuelle réalisée sur les 26 complexes Tyrosine kinase-JAK2 - inhibiteurs cités dans le tableau N°3 montre les modèles des ligands simulés par Surfex qui sont correctement placés dans le site actif de la TK-JAK2 et ceux au contraire qui occupent une mauvaise position spatiale dans celui-ci. La Figure N°28 nous montre des exemples des uns et des autres.



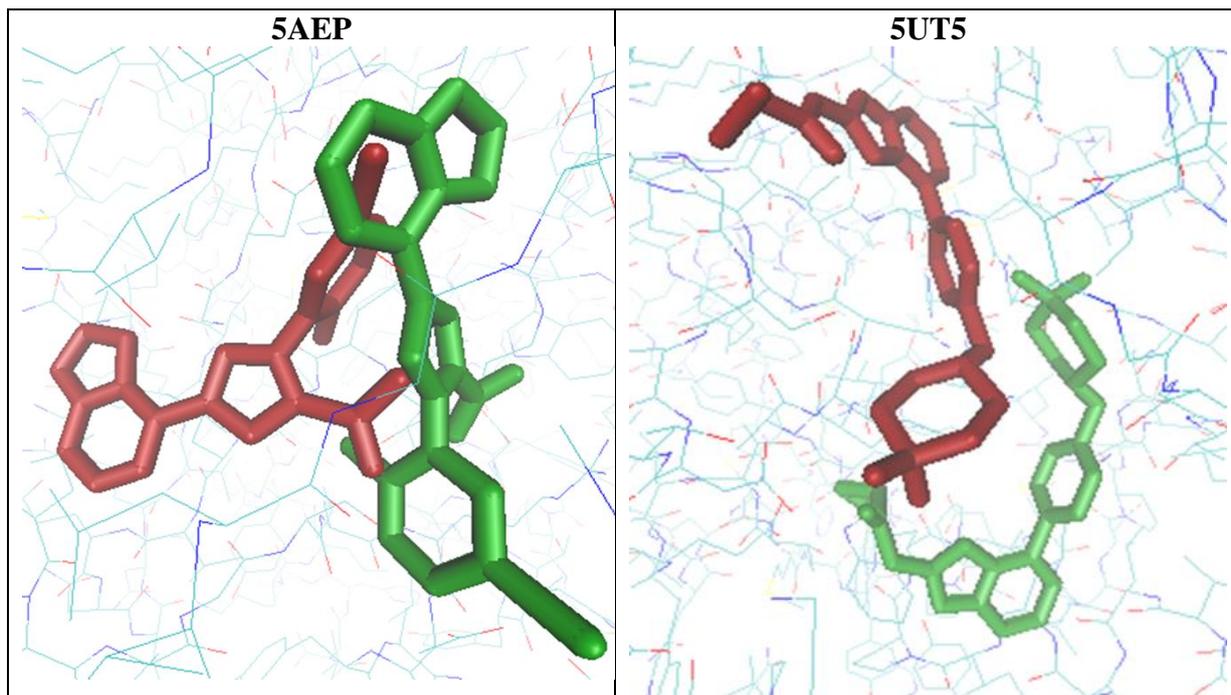


Figure N° 28 ; Superposition de la géométrie des Inhibiteurs obtenu par rayon-X (coloré en rouge) et celle calculée par docking moléculaire avec Surfex (coloré en vert).

1.3. Conclusion

Le test RMSD et l'analyse visuelle apportent la preuve de la haute performance du programme Surfex. Il s'agit d'un outil suffisamment fiable qui peut être utilisé sans trop risque d'erreurs pour étudier les mécanismes d'inhibition de la TK par les Inhibiteurs.

2. Etude des interactions "Inhibiteurs-Enzyme"

Tableau N°4 : Les codes PDB de complexe "Tyrosine kinase humaine -inhibiteur" avec Leur score et IC50.

Code complexe PDB	Code inhibiteur PDB	Final 0	IC50 (nM)
4JIA	1K3	3.29	22
5EAP	QUP	2.86	68
3 E64	5B3	2.00	78

-Le tableau N°4 montre que le meilleur inhibiteur jusqu'à présent 1K3 se caractérise par une faible IC₅₀= 22 nM et meilleur score de 3.29.

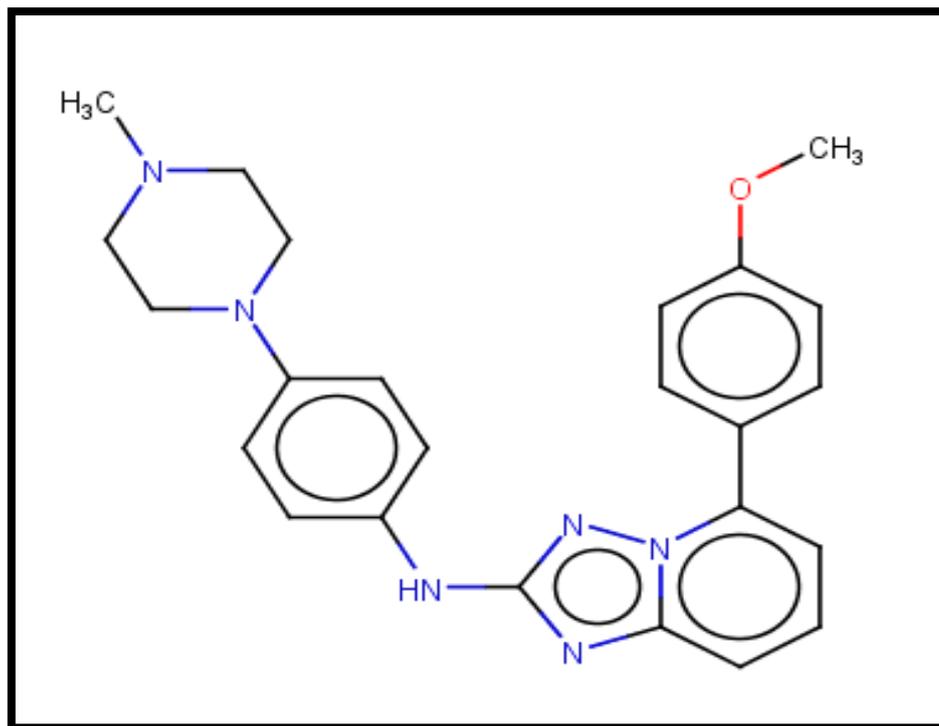


Figure N° 29 : Structure de 5-(4-methoxyphenyl)-N-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine (1K3).

La reconstruction du ligand 1K3 par docking moléculaire avec « Surflex » montre un score s'évaluant à 3.29. Ce score résulte de la mise en place d'une liaison hydrogène lors de la formation de ce composé dans la cavité catalytique de l'enzyme (Voir Figure N°30).

-En Effet, la liaison hydrogène est formée avec l'acide aminé LEU932 par une distance de 2Å.

Il est également important de noter que des nombreuses interactions hydrophobiques participent à la stabilité du complexe Tyrosine kinase JAK2-1K3 faisant intervenir les résidus GLY935, ALA880, LEU855, VAL863, MET865, GLU898 et TYR934 de l'enzyme.

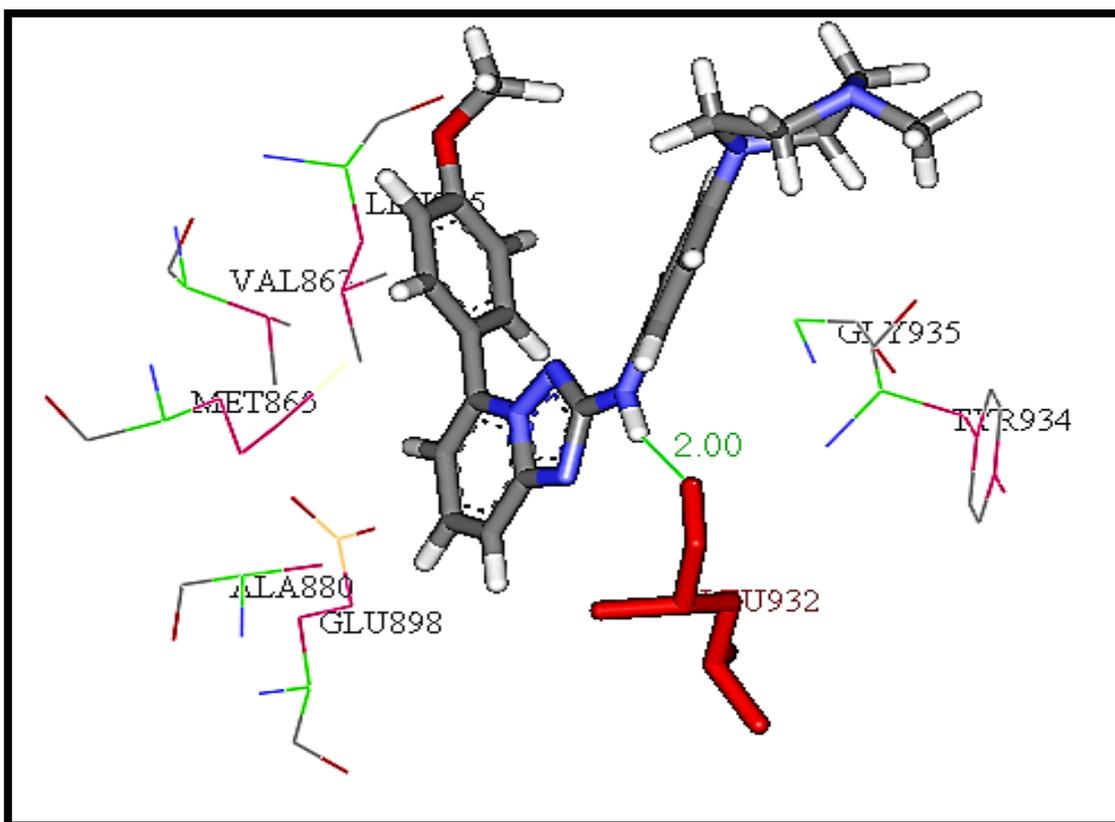


Figure N° 30 : Mode d'interaction du 1K3 avec le site actif de la TK-JAK-2.

3. Proposition de nouveaux inhibiteurs

Dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de la TK-JAK2, nous avons utilisé comme structure de départ l'inhibiteur ayant présenté la meilleure affinité avec l'enzyme Tyrosine Kinase. Dans notre cas il s'agit de 1K3 complexe 4JIA.

La banque *PubChem*, nous propose 427 similaires de l'inhibiteur 1K3, avec un taux de similarité allant jusqu'à 90 %. Dans notre travail, nous avons réalisé le docking moléculaire de ces similaires en mesurant leurs affinités par le programme surflex. A l'issue de ce test, il ressort que 88 composés présentent un score (affinité) supérieure au composé de départ 1K3 dont l'affinité est égale à 3.29 (voir annexe N°2).

Les résultats des scores de ces 10 meilleurs similaires sont représentés dans le tableau N°5.

Tableau N° 5 : Les scores des 10 meilleurs similaires obtenus suite au docking moléculaire avec la TK-JAK2

N° de Composé	Numéro d'accésion	Score
425	CID -133277579	5.78
120	CID - 70832593	5.46
14	CID - 3229924	5.30
67	CID -59589716	5.20
426	CID - 133315963	5.07
76	CID -59589863	4.90
414	CID -108777599	4.85
149	CID - 1441114	4.80
427	CID -133425991	4.80
384	CID -91082476	4.70

Afin d'élucider les mécanismes d'interaction mis en jeu entre la Tyrosine kinase et son ligand (inhibiteur) nous nous sommes limitées dans ce travail, à l'étude des dix meilleures similaires de ce tableau N°5. Il s'agit en l'occurrence des composés 425, 120, 14, 67, 426, 76, 414, 149, 427 et 384 dont les scores sont nettement supérieurs à celui de l'inhibiteur de départ 1K3.

Le mode d'interaction de ces similaires avec la TK-JAK2 a été étudié avec le programme de visualisation « Viewr lite ».

3.1.Le complexe TK JAK2-Composé 425

La simulation réalisée par Surfex, du composé 425 se caractérise par la valeur la plus élevée de score 5.78.Ce score se traduit par la formation des quatre liaisons hydrogènes entre le composé 425 et le site actif de la TK JAK2.

La première est formée entre l'hydrogène 13 de l'inhibiteur et l'oxygène de la fonction carboxylique du résidu GLN854 avec une distance de 1.99 Å. La deuxième distante de 2.29 Å est formée entre l'hydrogène 27 de l'inhibiteur et l'oxygène de la fonction carboxylique du résidu LEU932. Ce dernier forme une troisième liaison avec l'hydrogène 40 la fonction amine (NH2) de l'inhibiteur avec une distance de 2.17 Å. La quatrième liaison est formée entre l'hydrogène 39 de la fonction amine de l'inhibiteur et l'oxygène de la fonction carboxylique du résidu GLU930 séparés par une distance de 1.75 Å.

Le composé 425 est également stabilisé par de nombreuses interactions hydrophobiques avec les résidus LEU983, TYR931, MET865, GLY935, LEU855 et GLN853de l'enzyme (Voir Figure N° 31).

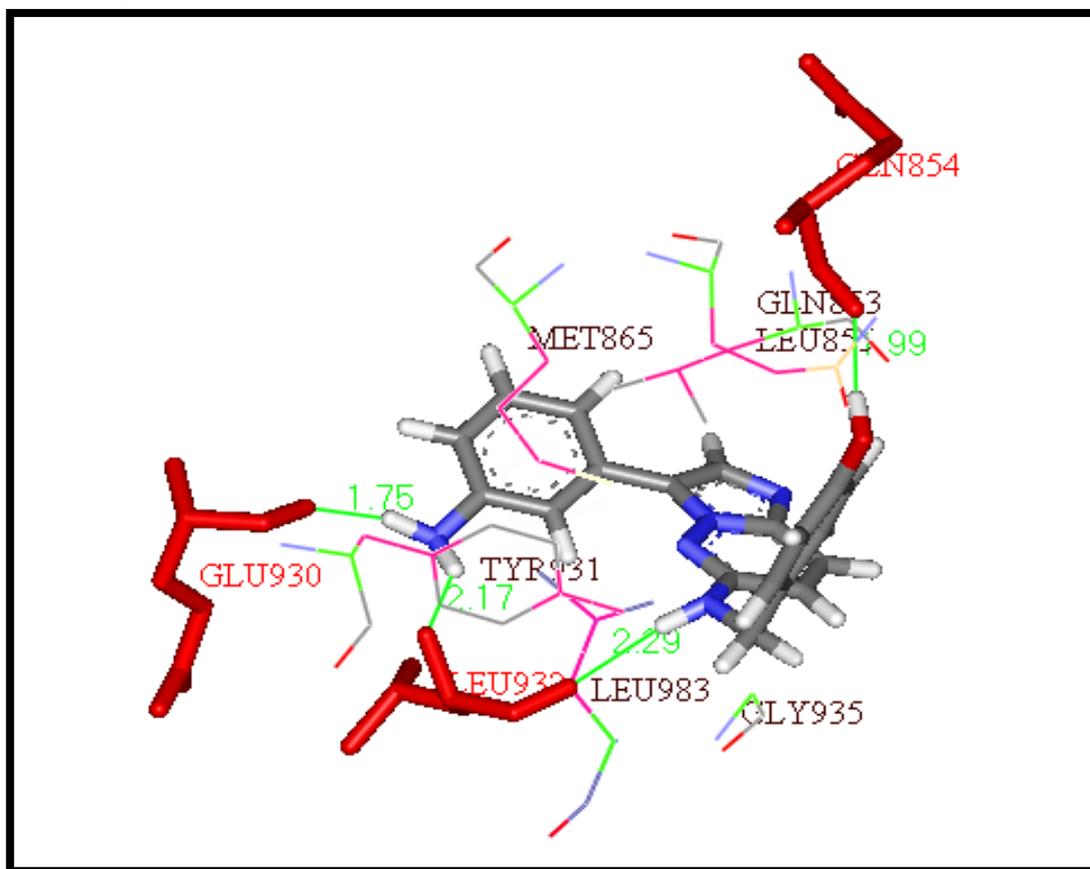


Figure N° 31 : Mode d'interaction du composé 425 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.2. Le complexe TK JAK2-Composé 120

Le docking moléculaire avec Surflex du composé 120 dans le site actif de la TK JAK2 donne un score 5.46. Ce score se traduit par la présence de deux liaisons hydrogène dont la première est formée entre l'hydrogène 45 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu PRO933 avec une distance de 2.01Å, et la deuxième est formée entre l'hydrogène 40 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu LEU932 séparés par une distance de 2.11Å.

De plus, on observe des interactions hydrophobiques assurant la stabilité du complexe TK JAK2-Composé 120 avec les résidus TYR931, PHE1031, GLY996, MET929, LEU855, VAL1010, LYS1009, LYS1030, GLY935, ARG975, HIS974, LEU983 et SER1029.

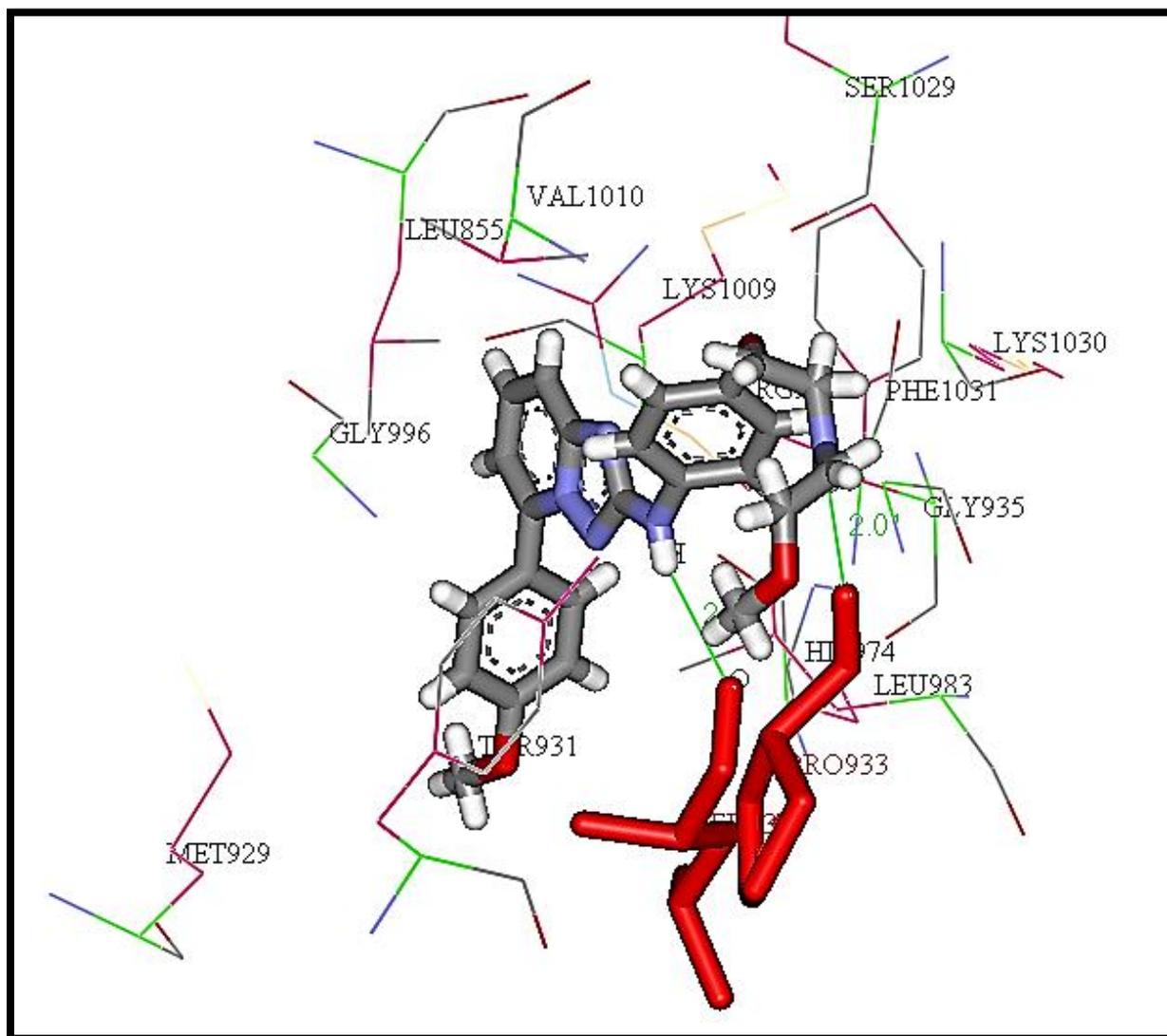


Figure N° 32 : Mode d'interaction du composé 120 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.3. Le complexe TK JAK2-Composé 14

Le docking moléculaire avec Surflex du composé 14 au sein du site actif de l'enzyme TK-JAK2 donne l'un des meilleurs scores soit 5.30. Néanmoins, ce composé ne forme aucune liaison hydrogène lors de son interaction avec le site actif de la TK-JAK2 (Figure N°33) au profit des nombreuses interactions hydrophobiques avec les résidus suivants qui stabilisent le

complexe : PHE860, ASN859, GLU1012, LYS1011, LEU997, GLN854, VAL863, GLY856, LEU855, MET865, GLU898, TYR931, VAL911, LEU932 et PHE995.

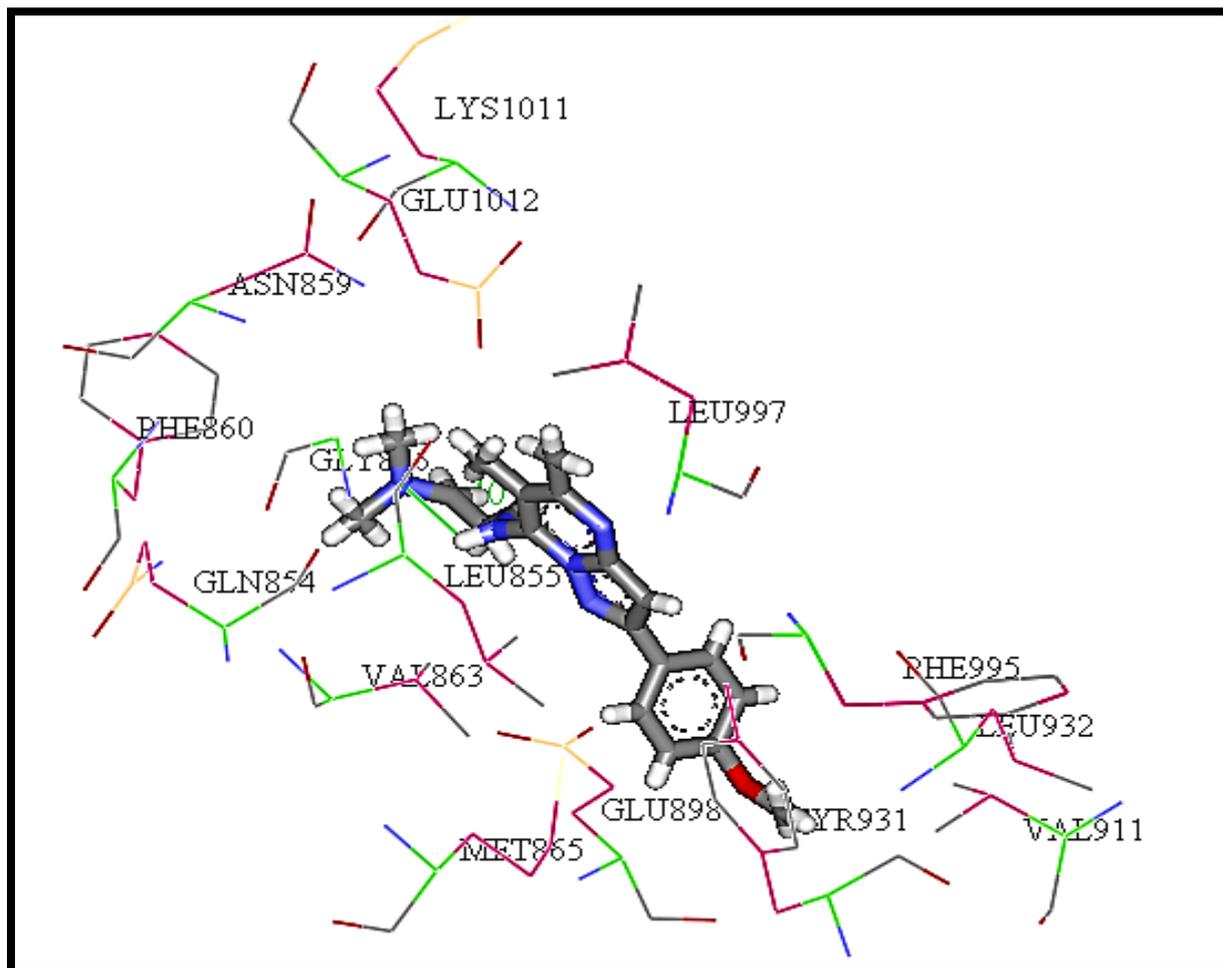


Figure N° 33 : Mode d'interaction du composé 14 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.4. Le complexe TK JAK2-Composé 67

Le composé 67 se caractérise par un score 5.20. L'analyse visuelle du complexe TKJAK2-composé 67 (Figure N°34) nous révèle une seule liaison hydrogène entre l'hydrogène 40 du cycle C de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu GLU930 séparés par une distance de 1.95Å. Le complexe est également stabilisé par de interactions hydrophobiques avec les résidus LEU932, TYR972, PHE995, MET865, VAL878, ARG971, VAL1033, PHE1116, VAL1037, TYR931, LEU983 et LYS912.

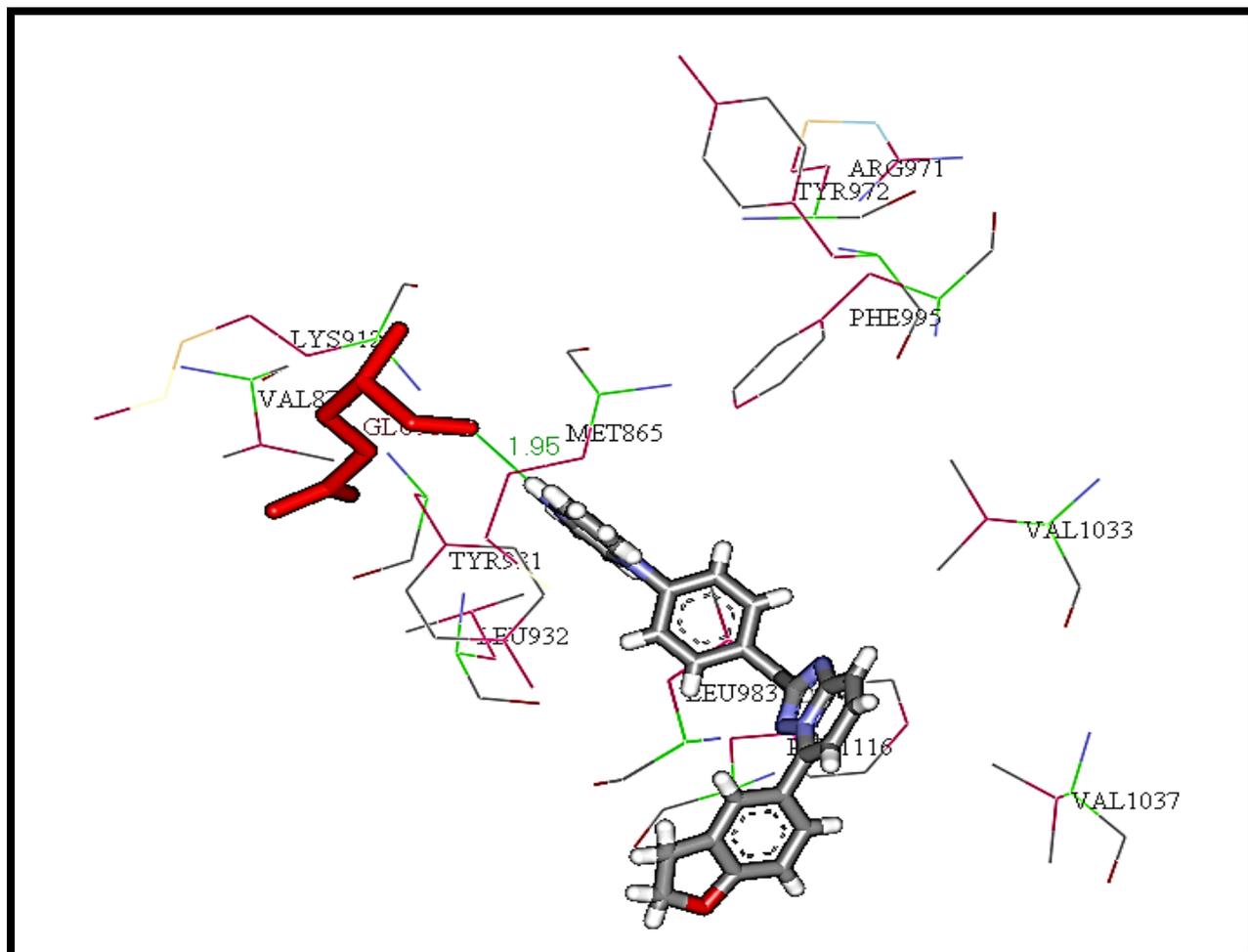


Figure N° 34 : Mode d'interaction du composé 67 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.5. Le complexe TK JAK2-Composé 426

Le docking moléculaire avec Surflex du composé 426 dans le site actif de la TK JAK2 donne un score 5.07. Cette score se traduit par la présence de deux liaisons hydrogène (Figure N°35) dont la première est formée entre l'hydrogène 13 de l'inhibiteur et l'azote du résidu LEU932 avec une distance de 2.04Å, et le deuxième est formée entre l'hydrogène 38 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu PRO933 séparés par une distance de 1.84Å.

Par ailleurs le composé 426 est stabilisé dans le site actif par des interactions hydrophobiques avec les résidus MET964, LYS857, VAL863, GLY856, PHE995, GLY996, GLU864, GLN853, LEU983, TYR931, PHE1516, ILE960, THR979, SER1115 et ASP981.

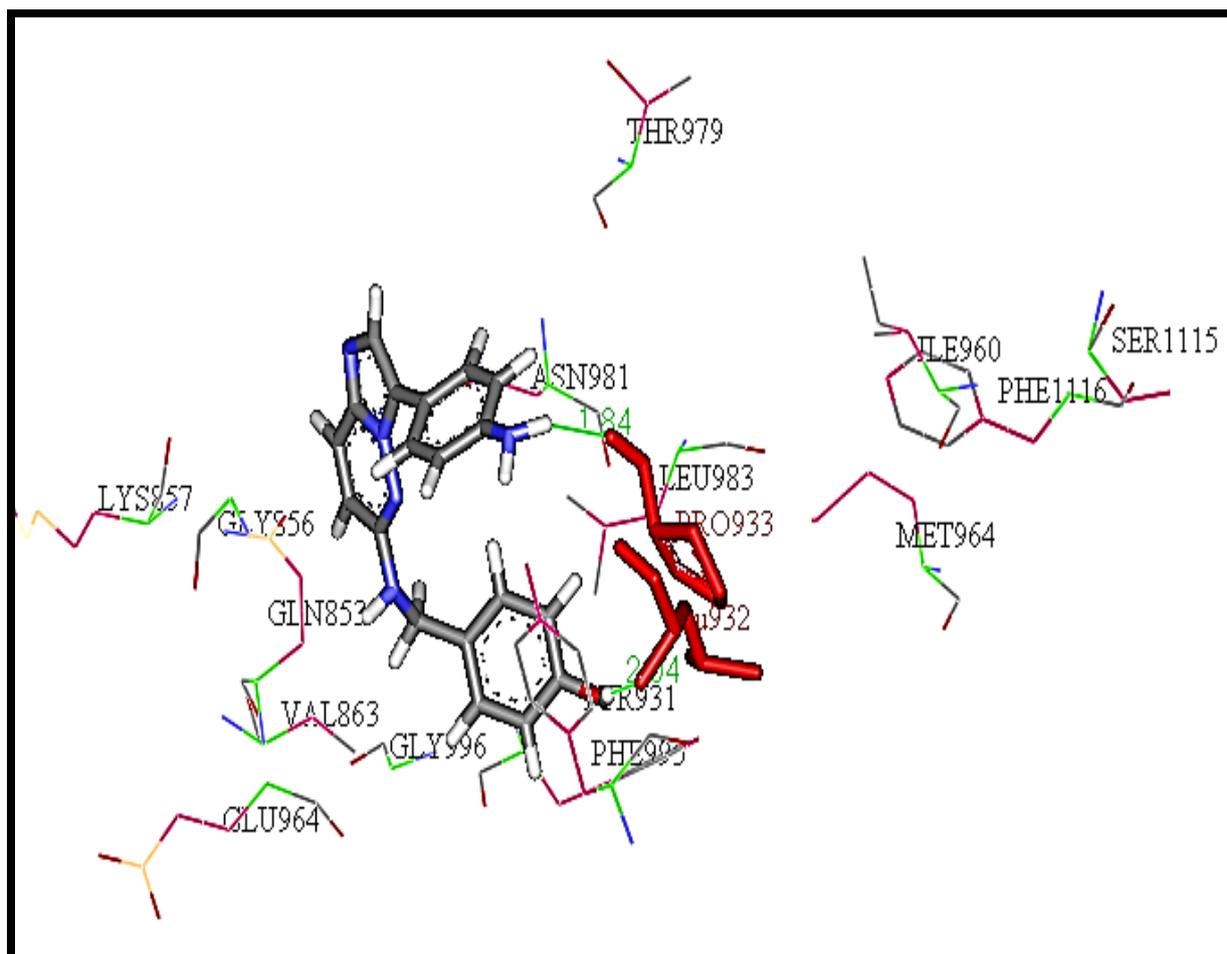


Figure N° 35 : Mode d'interaction du composé 426 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.6. Le complexe TK JAK2-Composé 76

Le composé 76 se caractérise par un score 4.90. L'analyse visuelle du complexe TKJAK2-composé 76 (Figure N°36) montre deux liaisons hydrogène dont l'une entre l'hydrogène 50 de l'inhibiteur et l'azote du résidu LEU932 séparés par une distance de 2.06Å, et l'autre est formée entre l'hydrogène 49 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu GLU930 séparés par une distance de 2.02Å.

Le complexe est également stabilisé par des interactions hydrophobiques avec les résidus TYR931, MET929, ARG897, PHE995, ASP894, LYS882, LEU855, LEU997, SER936, GLU1012, ASP939 et PHE 860.

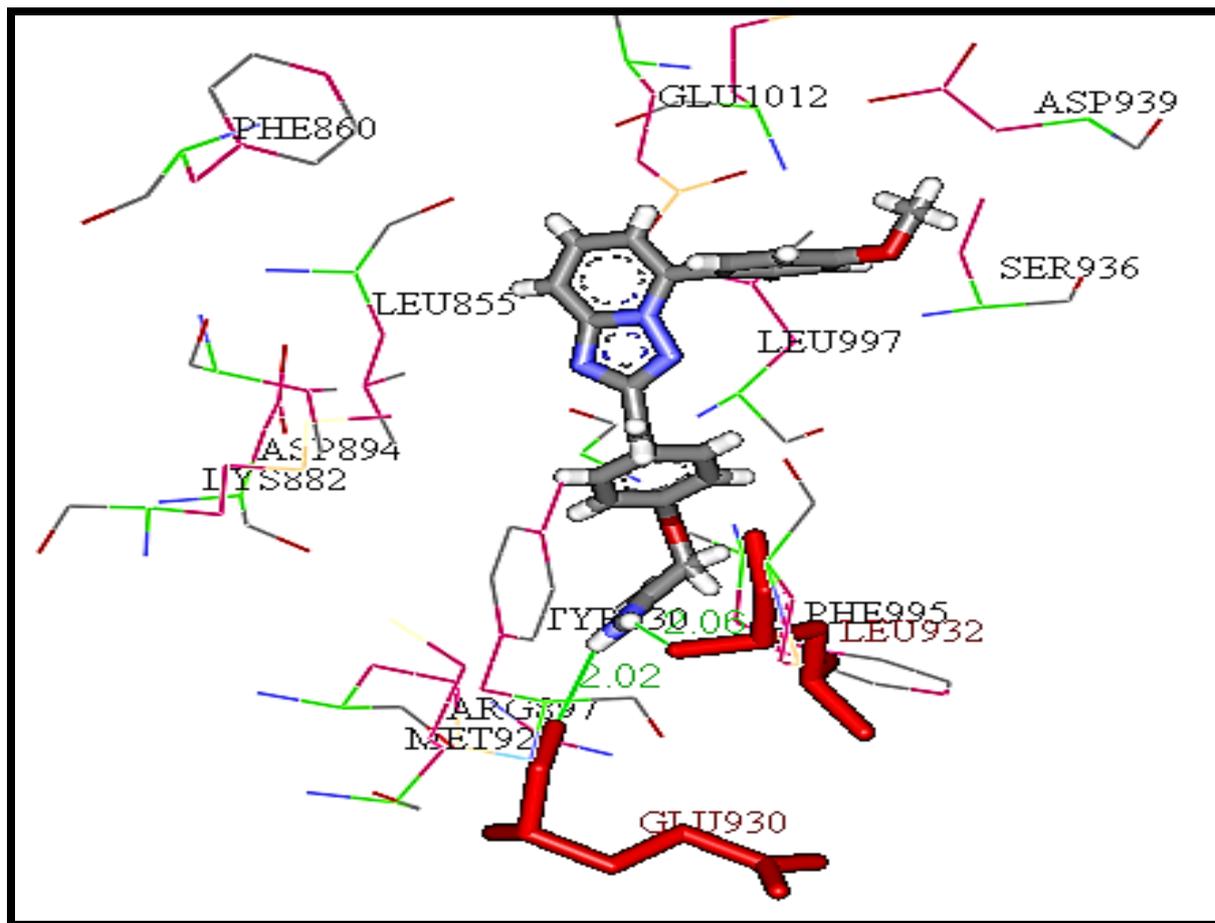


Figure N° 36 : Mode d'interaction du composé 76 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.7. Le complexe TK JAK2-Composé 414

Le composé 414 se caractérise par un score 4.85. L'analyse visuelle du complexe TKJAK2-composé 414 (Figure N°37) montre que trois liaisons hydrogènes sont formées entre l'hydrogène 37 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu ASP939 séparés par une distance de 1.82Å, l'hydrogène 32 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu GLU987 séparés par une distance de 7.01Å et l'hydrogène 13 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu GLU930 séparés par une distance de 1.92Å.

Des interactions hydrophobiques interviennent pour stabiliser davantage le complexe avec les résidus : TYR940, TYR956, HIS944, ARG947, ASN986, LEU983, VAL990, LYS991, VAL881, ALA880, TYR931, PRO933 et GLN 854.

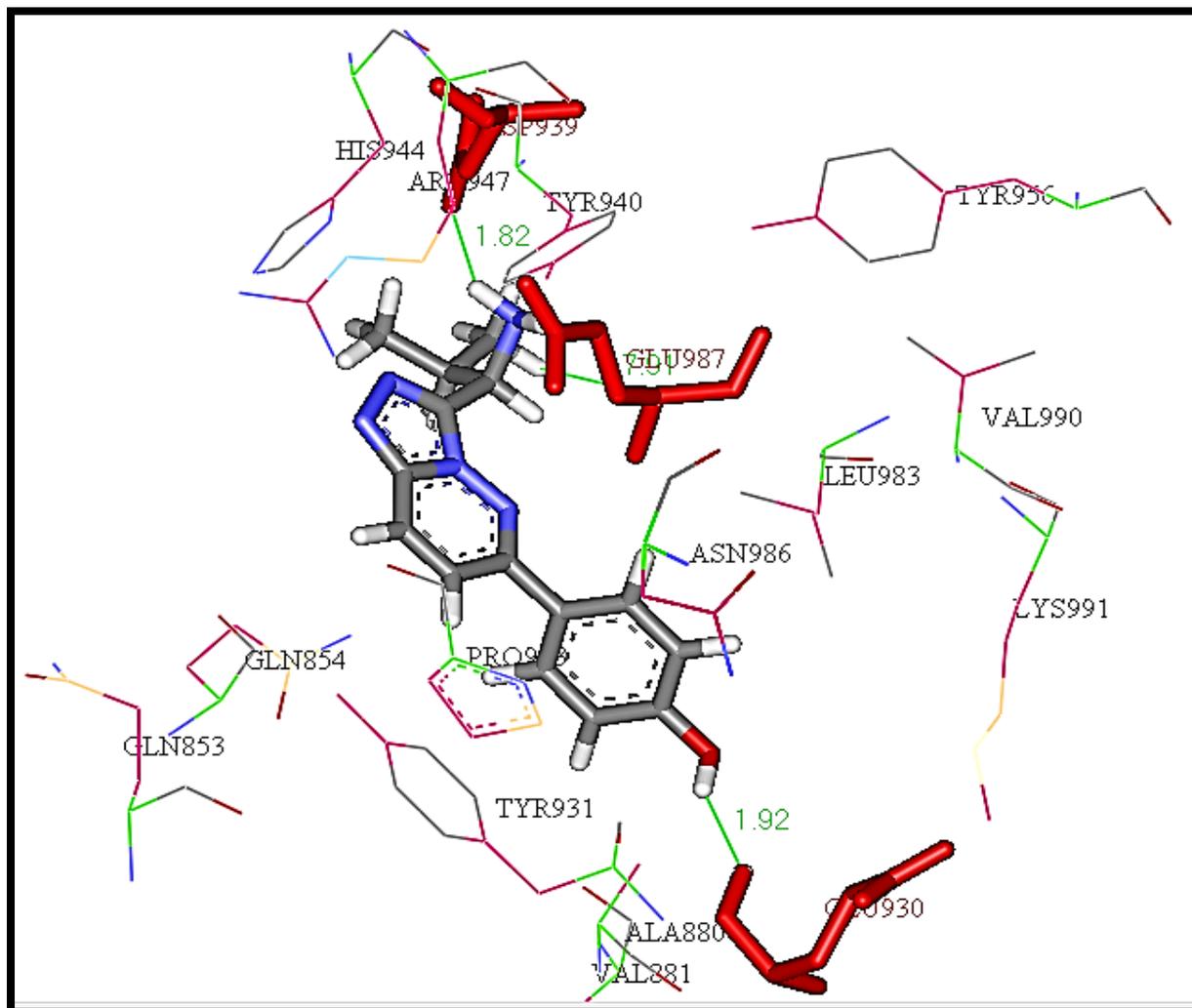


Figure N° 37 : Mode d'interaction du composé 414 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.8. Le complexe TK JAK2-Composé 149

Le docking moléculaire avec Surflex composé 149 avec le site actif de l'enzyme donne l'un des meilleurs scores soit 4.80. Cependant, ce composé ne forme aucune liaison hydrogène lors de son interaction avec le site actif de la TK-JAK2 (Figure N°38) mais de nombreuses interactions hydrophobiques ont lieu avec les résidus : LEU932, ASN981, TYR931, ASP976, THR875, VAL879, ARG867, LEU855, PHE1076, VAL1075, ILE1074, HIS1077, HIS1019, SER936 et ARG980.

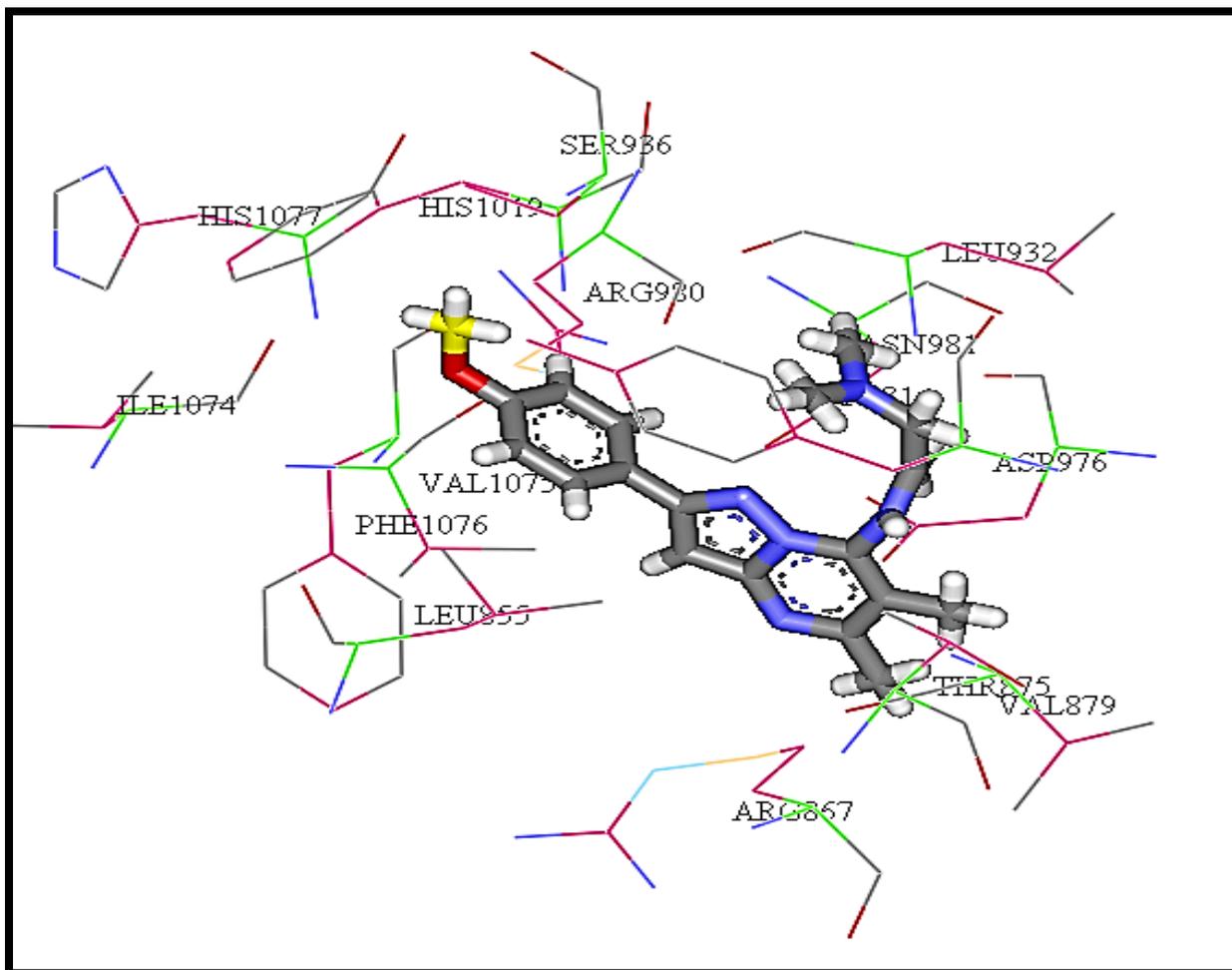


Figure N° 38 : Mode d'interaction du composé 149 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.9. Le complexe TK JAK2-Composé 427

Le composé 427 se caractérise par un score 4.80. L'analyse visuelle du complexe TKJAK2-composé 427 (Figure N°39) indique la présence de deux liaisons hydrogène dont l'une entre l'hydrogène 53 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu GLU930 séparés par une distance de 1.91Å, et l'autre entre l'hydrogène 13 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu ASN859 séparés par une distance de 2.96Å.

Le complexe est également stabilisé par des interactions hydrophobiques avec les résidus : PRO1017, LEU997, PHE995, MET929, TYR931, LYS991, VAL878, LEU941, PRO933, TYR934, LEU937, ASP939, ARG938 et ARG980.

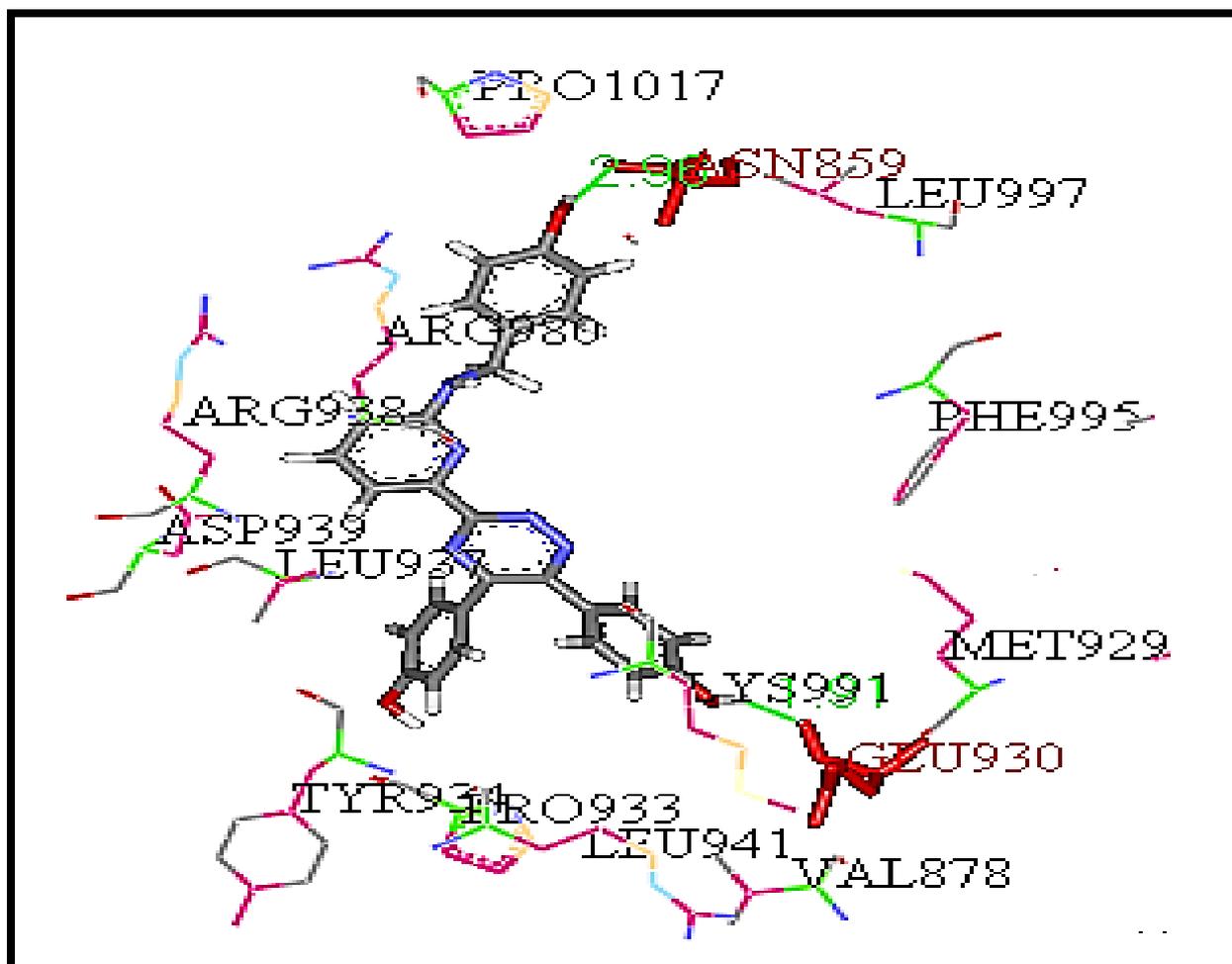


Figure N° 39 : Mode d'interaction du composé 427 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.10. Le complexe TK JAK2-Composé 384

Le composé 384 se caractérise par un score 4.70. L'analyse visuelle du complexe TKJAK2-composé 427 (Figure N°40) montre que deux liaisons d'hydrogènes la première entre l'hydrogène 57 de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu LEU932 séparés par une distance de 2.04Å. Et la deuxième formée entre l'hydrogène 47 de l'inhibiteur et le nitrogène du résidu SER936 séparés par une distance de 2.06Å. Le complexe est stabilisé également par des interactions hydrophobiques avec les résidus : LEU977, ASN981, ASP976, HIS974, LYS857, GLY861, PHE995, VAL863, LYS883, THR969, TYR966, TYR931, ASN909, PRO933, GLU957, ARG1117, GLN959, LEU1119, THR957 et PRO1114.

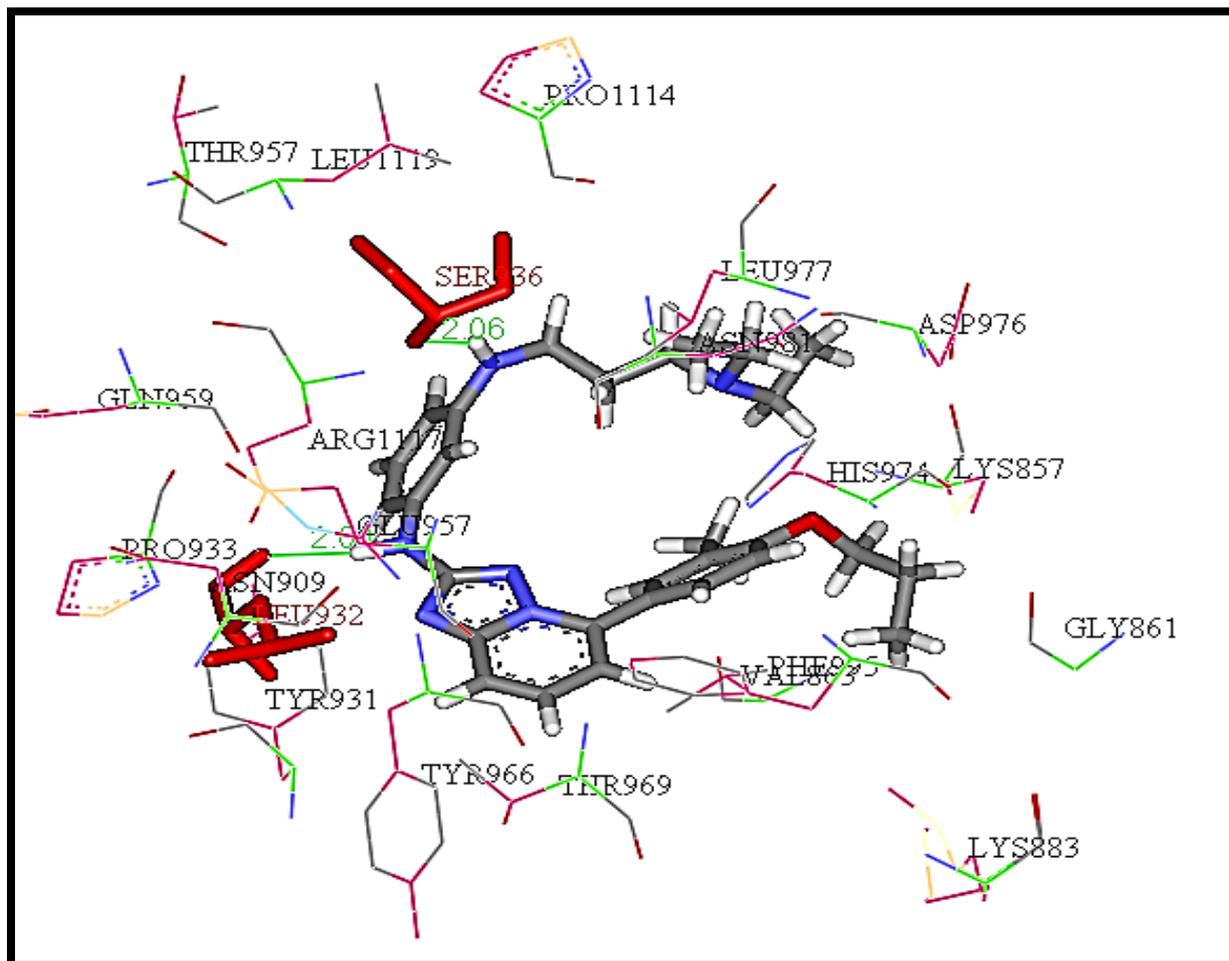


Figure N° 40 : Mode d'interaction du composé 384 avec le site actif de la TK -JAK2.

3.11. Conclusion de visualisation

L'étude de visualisation des interactions des 10 meilleurs similaires de 1K3 montre que les 2 acides aminés LEU932 et l'acide GLU930 jouent un rôle essentiel dans le site actif TK-JAK2 car ils établissent une liaison hydrogène avec 5 composés. On retrouve également d'autres acides aminés tels que TYR931, PHE995 et LEU983 qui sont également importants car ils stabilisent les complexes Enzyme-Inhibiteur dans plusieurs interactions.

4. Application de la règle de Lipinski sur les 10 composés

L'activité inhibitrice de TK-JAK2 étant hypothétique, il était indispensable de compléter son étude par l'application de **la règle de 5 de Lipinski** sur les 10 similaires présentant une affinité supérieure à celle de 1K3. Ce composé (1K3) représenté ici une référence pour les dix similaires étudiés. Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau N°6.

Tableau N°6: résultats de la règle de Lipinski sur les 10 composés.

Composés	PM	logP	DH	AH	LF
1K3	414.51	4.80	1	7	5
425	331.38	2.42	4	6	4
120	433.51	4.28	2	8	11
14	353.47	3.40	1	6	7
67	411.51	3.93	1	6	4
426	331.38	2.44	4	6	4
76	374.44	3.42	2	6	7
414	283.33	0.17	3	6	3
149	339.44	3.13	1	6	6
427	463.50	4.17	4	8	6
384	511.67	6.20	4	8	10

PM = Poids Moléculaire (≤ 500 g/mol).

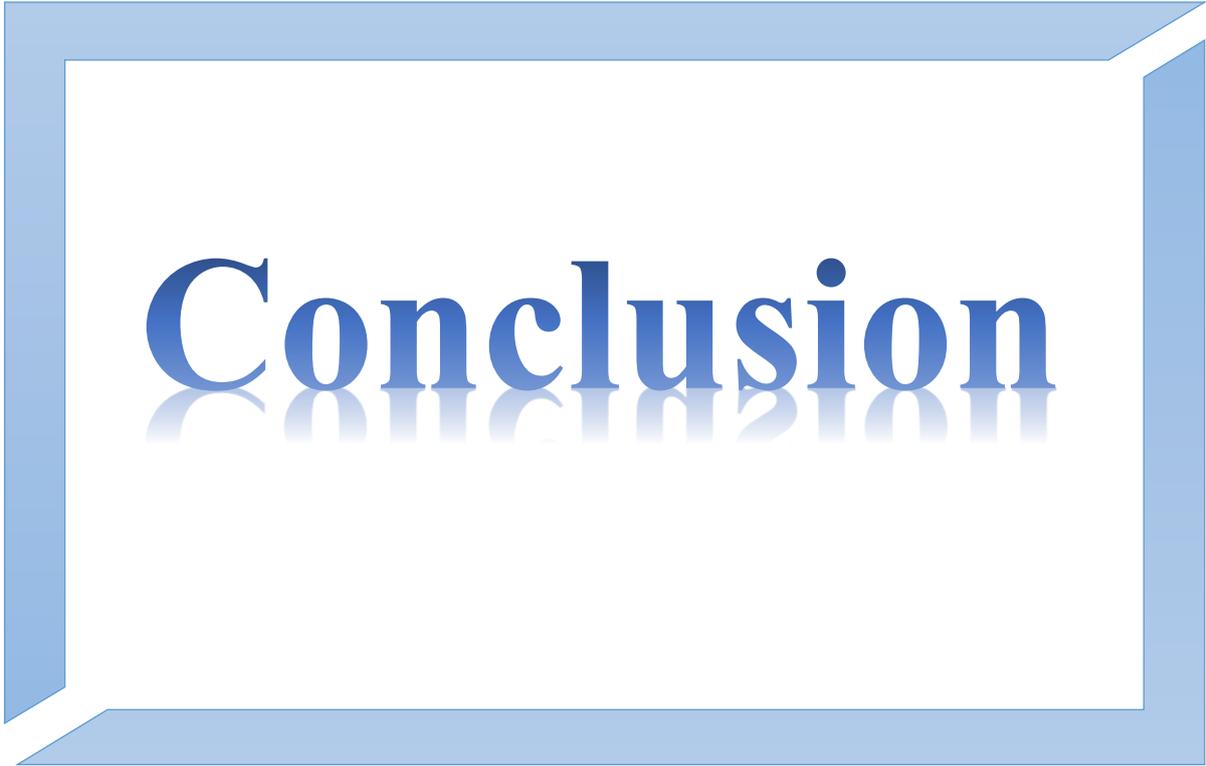
LogP = coefficient de partage Eau/octanol ($-2 \leq \log P \leq 5$).

AH = Accepteur d'Hydrogène (nO,N)(≤ 10).

DH = Donneur d'Hydrogène (nOH,NH)(≤ 5).

LF = Liaison Flexible (nrotb)(≤ 15).

Le tableau N° 6 montre que les 10 meilleurs similaires étudiés répondent parfaitement à la règle de Lipinski. Donc ces composés sont capables d'être utilisés comme médicaments inhibiteurs de la Tyrosine Kinase sans poser des problèmes d'absorption par voie orale.



Conclusion

Conclusion

Notre travail de master avait pour but essentiel d'acquérir des compétences en simulation informatique, notamment le docking moléculaire par « Surfex » afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Tyrosine-Kinase : cible thérapeutique récente pour le traitement des pathologies du Sang.

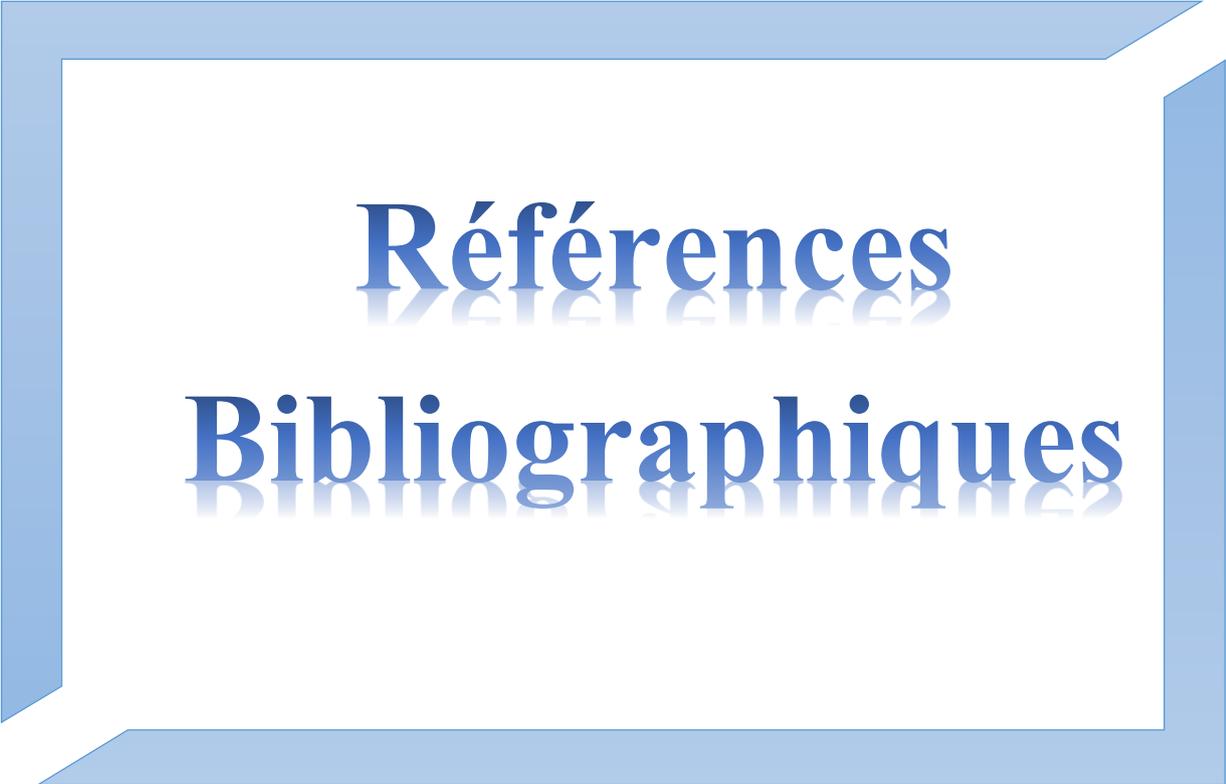
Au préalable, nous avons testé la fiabilité du programme « Surfex », en faisant appel au test RMSD (root-mean-square derivation), pour mieux juger la déviation entre la structure simulée par Surfex et celle obtenue par cristallographie. Sur les 100 complexes pris arbitrairement de la PDB, 84 % ont présenté un RMSD inférieur à 2 Å. Afin de nous assurer que le programme Surfex est suffisamment fiable pour simuler les interactions TK-inhibiteurs, nous avons appliqué ce test à 26 complexes de TK-Jak2 disponibles dans la PDB dont RMSD inférieur à 2 Å. L'analyse visuelle de ces résultats montre une superposition de la conformation optimale du ligand calculée par Surfex et la géométrie du même ligand pris initialement de la PDB. Ce test nous apporte la preuve que Surfex est un programme de docking moléculaire hautement fiable qu'on peut utiliser en toute confiance pour simuler les interactions TKJak2-1K3 l'objet de notre travail.

Dans un deuxième temps, la modélisation par docking moléculaire avec Surfex nous a permis d'évaluer l'affinité des inhibiteurs de la tyrosine kinase disponible dans la PDB et de retenir le ligand 1K3 du complexe 4JIA, comme étant le meilleur inhibiteur de la Tyrosine Kinase car présentant le meilleur score 3.29.

Dans une troisième partie, nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs de la TKJak2 présentant une activité inhibitrice plus élevée que le meilleur inhibiteur (inhibiteur de départ 1K3). Pour cela, nous avons réalisé un criblage virtuel par Surfex sur une collection de 427 molécules chimiques obtenues à partir de l'inhibiteur 1K3 via la *PubChem*. Ce criblage fait ressortir 88 composés similaires avec une meilleure affinité que l'inhibiteur 1K3 et en particulier le similaire 425 (N° d'accèsion CID -133277579) qui se présente comme étant l'inhibiteur potentiellement le plus puissant de la TK-JAK2 avec un score 5.78. La visualisation des dix meilleurs similaires du composé 1K3 nous montre un bon positionnement de ces derniers au sein de la cavité catalytique de l'enzyme étudiée.

Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME de l'inhibiteur 1K3 et de ses 10 meilleurs similaires. Ces résultats montrent que ces 10 composés peuvent se présenter comme de nouveaux inhibiteurs théoriquement plus affins de la Tyrosine kinase.

Il convient dans les perspectives d'avenir de vérifier ces résultats théoriques en réalisant des études expérimentales complémentaires *in vitro et/ou in vivo*.



Références

Bibliographiques

- [1] Merlin J.L, Tyrosine kinase inhibitors in oncology: La Lettre du Pharmacologue. 2008. **22**(8). 51-62.
- [2] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecanrefractory metastatic colorectal cancer. N Eng 2004; **351**: 337-45.
- [3] PALUDETTO M .N. Inhibiteurs de Tyrosine Kinases : relations structure-activité, voies métaboliques et implications pharmacologiques des métabolites. Thèse du Doctorat en sciences pharmaceutiques université : Toulouse III Paul sabatier.2015.86p.
- [4] Maladie de Vaquez : Université Médicale Virtuelle Francophone .Support de Cours (Version PDF). 2009-2010 .Item 165.
- [5] "Dénominations communes internationales pour les substances pharmaceutiques (DCI) ; Propositions de dénominations communes internationales: Liste 107" (PDF)-Organisation mondiale de la santé. p. 189 . juillet 2016 ; ET Justine CHARGOIS. Obligation légale de prescription en Dénomination Commune Internationale -Thèse du Doctorat en médecine UNIVERSITE DE LORRAINE 2016.90p.
- [6] Dr Valérie Ugo- Maladie de Vaquez : Laboratoire d'hématologie, centre hospitalier universitaire de Brest, L A R E V U E D U P R A T I C I E N , V O L . 5 6 , 1 5 N O V E M B R E 2 0 0 6.
- [7] Dr Laurent Plawny Hémato-oncologue . La leucemie miloyde chronique ; Cancérologie du Centre Hospitalier de Luxembourg- les LEUCÉMIES VOLET 2/4, 2016. http://www.cancer.lu/les_leucemies.pdf.
- [8] BENNINI S.Les inhibiteurs de la Tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique . Thèse du Doctorat en medecine et de pharmacie:Universite mohammed V – Rabat. Maroc 2016.86p.
- [9] Pharmacorama Connaissance des médicaments [En ligne]: [www. pharmacoma.com](http://www.pharmacoma.com) Consulté le: [19/04/2018].
- [10] BAABBOU H. Les Inhibiteurs de tyrosine kinase données de la littérature : Thèse du Doctorat d'université : mohammed v.faculte de medecine et de pharmacie –Rabat. Maroc .2010.126p
- [11] Vincent R. Cibles enzymatiques : Réalisation Micro Evolution. CNPM .2017

[12] Michéle E. Les kinases, Tyrosine kinase et inhibiteurs . GFME. Marseille. France . 2018. 800p.

[13] HERLET S. Les inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique chez l'adulte : Du GLIVEC® aux traitements de deuxième génération Conséquence de la sortie de la réserve hospitalière pour le pharmacien d'officine. Thèse du Doctorat en pharmacie : Université Henri Poincaré-Nancy1.2010. 122p.

[14] Jump U. JAK-Inhibiteurs: Neue Wirkstoffe für viele Indikationen. Pharmazeutische Zeitung (21). 2013.

[15] CTI BioPharma annonce l'enlèvement de la retenue clinique complète sur Pacritinib PR Newswire. 2017.

[16] Shabbir M, Stuart R. Lestaurtinib, a multitargeted tyrosinase kinase inhibitor: from bench to bedside". Expert Opinion on Investigational Drugs. 2010 .19 (3): 427–36.

[17]. Hexner E. Roboz G. R Hoffman et al. "Etude ouverte du CEP-701 oral (letaurtinib) chez des patients atteints de polycythémie vera ou de thrombocythémie essentielle avec mutation JAK2-V617F". British Journal of Hematology. 2014. 164 (1): 83-93.

[18] Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK et al. *JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis*. N Engl J Med. 2012. 366. 787-798.

[19] Guide des médicaments : Ruxolitinib : Ses indications [En ligne] <http://www.doctissimo.fr> Consulté le: [30/5/2018].

[20] Scott LM. Tong W. Levine RL et al. *JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis*. N Engl J Med. 2007.356. 459-468.

[21] Dénominations communes internationales pour les substances pharmaceutiques (DCI) Propositions de dénominations communes internationales: Liste 107 (PDF). Organisation mondiale de la santé. 2016. 189p.

[22] Join R. Buy Momelotinib (CYT387) (CAS 1056634-68-4), a potent ATP-competitive JAK 1/2 selective inhibitor. High quality Momelotinib (CYT387) from. Universities d' Harvar. 2014.

[23] Pardanani A. Hood J. Lasho T. Levine RL. Martin MB. Noronha G et al (2007). TG101209, un inhibiteur de la kinase JAK2-sélectif à petite molécule inhibe puissamment les mutations JAK2V617F et MPLW515L / K associées au trouble myéloprolifératif. *Leucémie*. **21** (8): 1658-1668.

[24] Grosdidier A. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier. France. 2007. 90 p.

[25] Trouillas P. Chapitre 4 - Modélisation Moléculaire et Biologie. Thèse de doctorat en biophysique. Université de Lille. France. 2009. 17p.

[26] BOUCHERIT H. Etude théorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la méthionine aminopeptidase de mycobacterium tuberculosis par diverses molécules. Thèse de magister en biochimie. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 71 p.

[27] Leach A.R. Molecular modelling: Principles and application. Pearson Education Canada. 2001. **582**. 10-6p.

[28] Mokrani E. H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.

[29] El Hadji Said K. Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. These de Master d'université de TLEMCEM Faculté des Sciences Département de Chimie. Tlemcen. Algérie. 2016. 50P

[30] Grosdidier A. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble: Université Joseph Fourier. France. 2007. 90 p.

[31] Theoretical and computational biophysics group. VMD v 1.9.1. [En ligne] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.9.1/>. Consulté le : [20-03-2018].

[32] Open Babel 2.0.2. [En ligne] <http://openbabel.org/>. Consulté le : [03-05-2018].

[33] ViewerLite 4.2. [En ligne] <http://viewerlite.software.informer.com/4.2/>. Consulté le : [10-05-2018].

[34] Calculation of molecular properties. Molinspiration. [Enligne] <http://www.molinspiration.com/>. Consulté le : [21/05/2018].

[35] Protein Data Bank (PDB). Biological Macromolecular Resource. [En ligne] <http://www.pdb.org/pdb/home>. Consulté le [25-04-2018].

[36] Centre national de la recherche scientifique. PubChem. [En ligne]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consulté le [02-05-2018].

[37] Teniou S. Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.

[38] Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions Peptide Deformylase–substances antibactériennes à l'aide de techniques de « docking » (arrimage) moléculaire. Thèse de Doctorat d'État en Microbiologie. 2007.126p.

[39] Lipinski C. A., Lombardo F., Domini B. W., Feney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Elsevier, Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997; **23**: 25p.

[40] Chikhi A., Bensegueni A. Comparative Study of the Efficiency of Three Protein-Ligand Docking Program. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*.2008; **1**: 161-165.

ET Vieth M., Hirst J. D., Kolinski A., Brooks C. L. Assessing energy functions for flexible Docking. *Journal of Computational Chemistry*. 1998; **19**: 1612-22.



Annexes

Annexe N°1 : Tableau RMSD de 100 complexes.

N°	Code Complexe PDB	Code inhibiteur PDB	Rmsd
1	3E 62	5B1	0.027
2	2AST	BEN	0.05
3	4Y85	499	0.075
4	5ORY	AY4	0.08
5	5ORP	A5K	0.089
6	5OS5	A8K	0.105
7	2IVT	PTR	0.126
8	2I0Y	5CN	0.13
9	5ORN	A5E	0.133
10	4Y83	49B	0.149
11	5vd0	8X7	0.197
12	4UJ2	NVV	0.199
13	5OSD	A9B	0.306
14	1IRK	EMC	0.314
15	4UJ9	S3N	0.363
16	5OS3	A7N	0.404
17	5V5Y	8X7	0.432
18	4EQC	XR1	0.437
19	5VC6	P48	0.441
20	5ORL	A4W	0.459
21	1ML7	PYZ	0.464
22	3E 64	5B3	0.465
23	5OS6	A7Q	0.545
24	5OS2	A7K	0.565
25	5VC4	XZN	0.602
26	5ORW	A6E	0.606
27	1YKR	628	0.627
28	4JIA	1K3	0.641
29	5ORV	A65	0.671
30	1JPA	ANP	0.69

31	4D0W	VVQ	0.691
32	5CF8	50V	0.705
33	5UAD	84P	0.709
34	4YTF	4HZ	0.709
35	5UT3	IK1	1.118
36	5ORT	A5Z	1.119
37	4UJ1	NVX	1.133
38	5OS4	A8H	1.165
39	2P2I	608	1.182
40	3K54	1N1	1.23
41	3EYG	MI1	1.234
42	5ORO	A5H	1.235
43	5ORS	A5W	1.238
44	6BBV	D7D	1.288
45	5UAB	84M	1.323
46	3ERK	SB4	1.333
47	2IVU	ZD6	1.339
48	4FOC	0UU	1.378
49	2EB3	ANP	1.403
50	5WEV	9ZS	1.403
51	4FVQ	ATP	1.404
52	2V7A	627	1.405
53	5UT1	7DZ	1.406
54	5F0C	5TE	1.491
55	5JSM	6NB	1.493
56	2FGI	PD1	1.504
57	3E 63	5B2	1.517
58	5TTV	7KX	1.533
59	5VCX	H8H	1.559
60	2J6M	AEE	1.606
61	4E6Q	0NV	1.635
62	5J5T	6G2	1.691

63	2PZ5	ACP	1.717
64	2ITY	IRE	1.721
65	5UT2	3YT	1.73
66	5MY6	NAG	1.731
67	5FTQ	U4W	1.735
68	2J5F	DJK	1.738
69	4BBE	3O4	1.752
70	1X8B	824	1.764
71	4R3C	GG5	1.794
72	4MP7	PFT	1.824
73	2PVF	ACP	1.834
74	5TOW	NAI	1.881
75	1AGW	SU2	1.885
76	2IVS	ACK	1.892
77	5I4N	ATP	1.892
78	1FGI	SU1	1.901
79	4UJB	8BQ	1.916
80	5TTS	7KU	1.938
81	4IVA	1J5	1.94
82	5VD3	H8H	1.961
83	5HQ0	LZ9	1.967
84	4UJA	4L7	1.984
85	5UT6	8MY	2.091
86	4D0X	953	2.111
87	2OJ9	BMI	2.153
88	2GS7	ANP	2.189
89	4AQC	88A	2.247
90	5N23	35R	2.349
91	5UT5	2HB	2.513
92	4D1S	BJG	2.61
93	3EYH	IZA	2.666
94	3KRR	DQX	2.668

95	5AEP	QUP	2.676
96	4MKC	4MK	2.882
97	5VDK	PO4	3.237
98	5TQ8	7GS	3.652
99	5L3A	6DP	4.097
100	2EC8	NAG	4.957

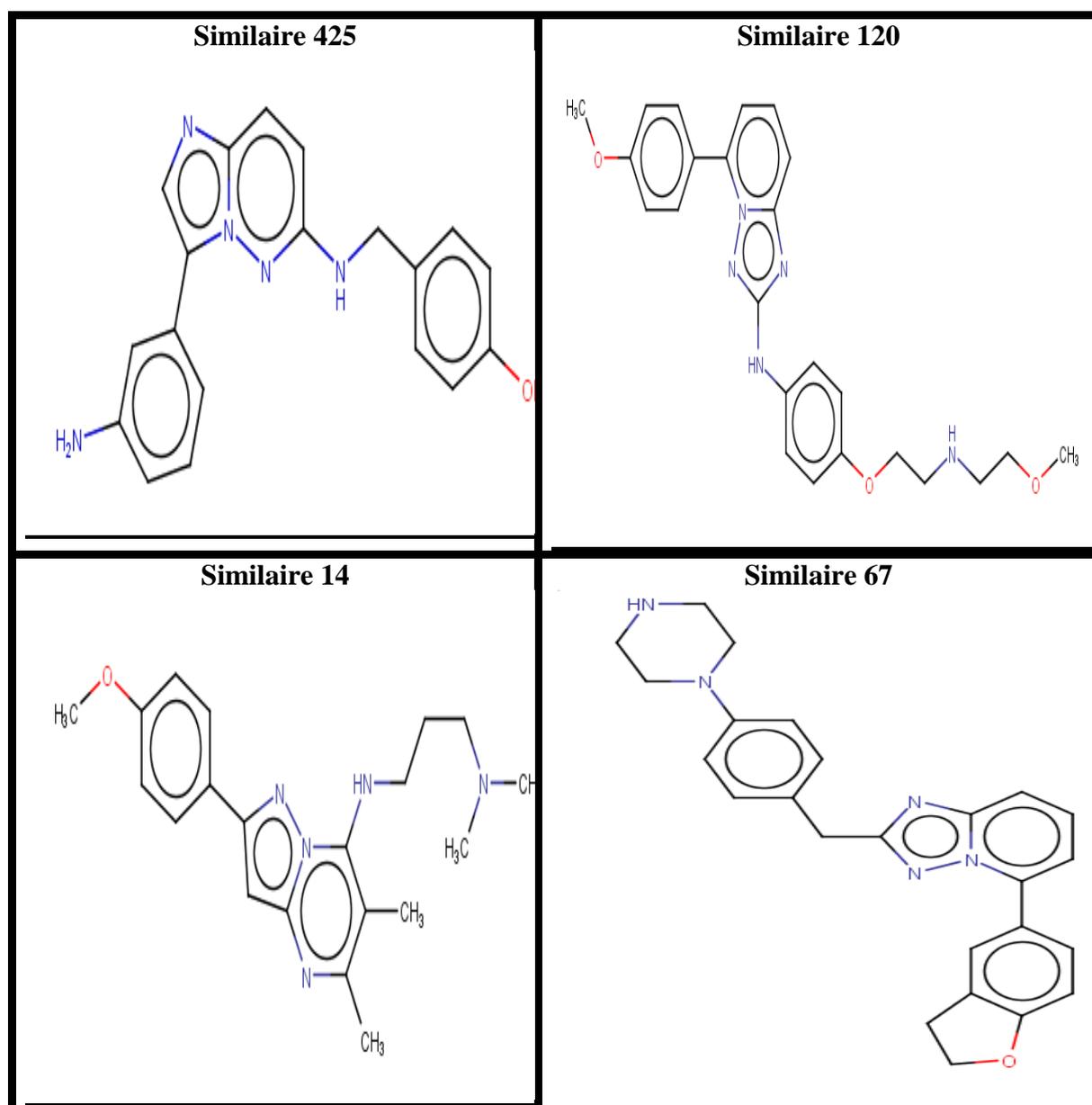
Annexe N° 2 : Les scores des 88 similaires obtenus suite au docking moléculaire avec la TK-JAK2.

N° de Composé	Numéro d'accésion	Score
425	CID -133277579	5.78
120	CID - 70832593	5.46
14	CID - 3229924	5.30
67	CID -59589716	5.20
426	CID - 133315963	5.07
76	CID -59589863	4.90
414	CID -108777599	4.85
149	CID - 1441114	4.80
427	CID -133425991	4.80
384	CID -91082476	4.70
84	CID -59590103	4.70
111	CID - 70832459	4.57
133	CID - 117705950	4.53
131	CID - 89528848	4.52
176	CID -7440559	4.51
62	CID - 59589621	4.39
371	CID -82270713	4.24
125	CID - 86640818	4.16
420	CID -110220469	4.16
159	CID -1441681	4.12
56	CID -59186347	4.11
74	CID -59589778	4.08
370	CID -82270623	4.02
410	CID -101593644	4.02
6	CID -59589778	4.01
7	CID - 59612442	4.01
19	CID - 1441681	4.01
91	CID -68552908	3.99
171	CID -6985965	3.99
385	CID -90392638	3.99
109	CID -59186418	3.95
233	CID -42667569	3.95
209	CID -42667501	3.93

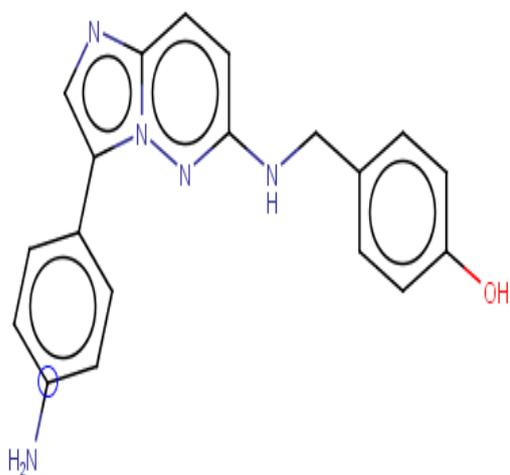
73	CID -59589777	3.92
81	CID -16668277	3.90
33	CID -44555515	3.89
150	CID -1441210	3.88
49	CID -59186159	3.87
332	CID -45965306	3.87
373	CID -82555844	3.87
37	CID -44556155	3.82
210	CID -42667512	3.82
106	CID -70832346	3.80
99	CID -70832224	3.77
48	CID -58857927	3.75
117	CID -70832506	3.75
140	CID -1441049	3.73
21	CID -20861595	3.72
301	CID -42808093	3.72
374	CID -82556510	3.70
408	CID -99982555	3.69
212	CID -42667514	3.68
327	CID -44624856	3.66
47	CID -58857870	3.64
110	CID -70832458	3.62
335	CID -46133479	3.62
17	CID -4183440	3.61
68	CID -59589742	3.61
267	CID -42668286	3.61
51	CID -59186166	3.59
59	CID -59186505	3.59
336	CID -46133563	3.58
104	CID -70832280	3.57
153	CID -1441475	3.51
173	CID -6985971	3.50
177	CID -7440560	3.49
187	CID -17588402	3.48
412	CID -102567932	3.47
97	CID -70832216	3.46
331	CID -45965289	3.46
174	CID -7435743	3.43
229	CID -42667565	3.43
270	CID -42668307	3.43
77	CID -59589885	3.41
238	CID -42667579	3.41
80	CID -59589973	3.39
362	CID -71019009	3.38
136	CID -117785329	3.36
200	CID -23608587	3.36
250	CID -42667604	3.33
383	CID -89122666	3.33

113	CID -70832470	3.32
231	CID -42667567	3.32
375	CID -82556513	3.32
53	CID -59186246	3.31
121	CID -70832597	3.30
203	CID -40103742	3.3
254	CID -42667615	3.3

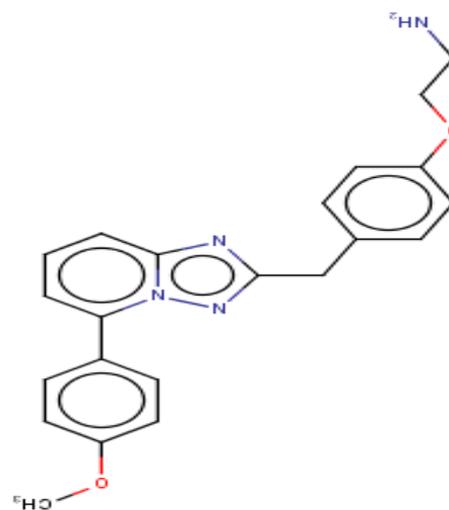
Annexe N° 3 : Structures des meilleurs similaires du 1K3.



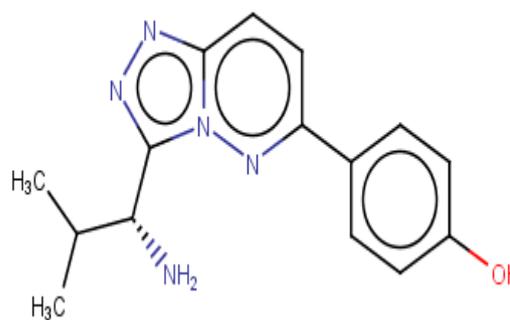
Similaire 426



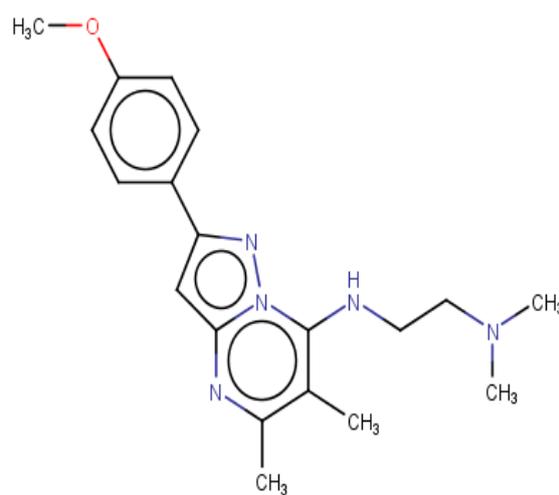
Similaire 76



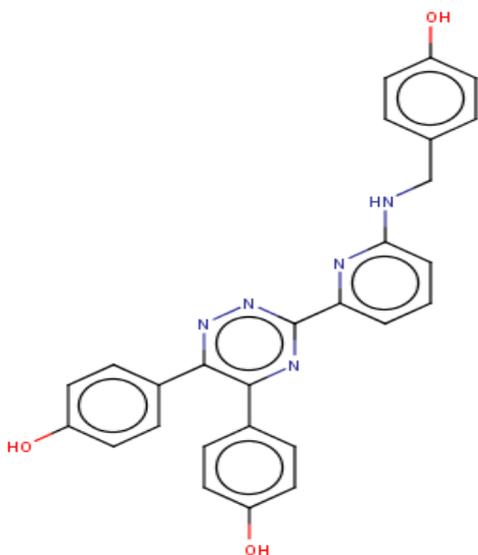
Similaire 414



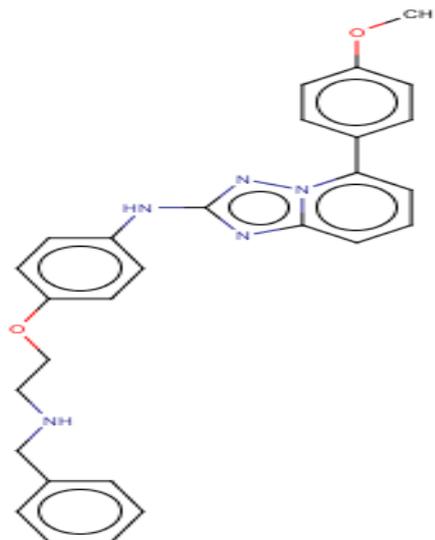
Similaire 149



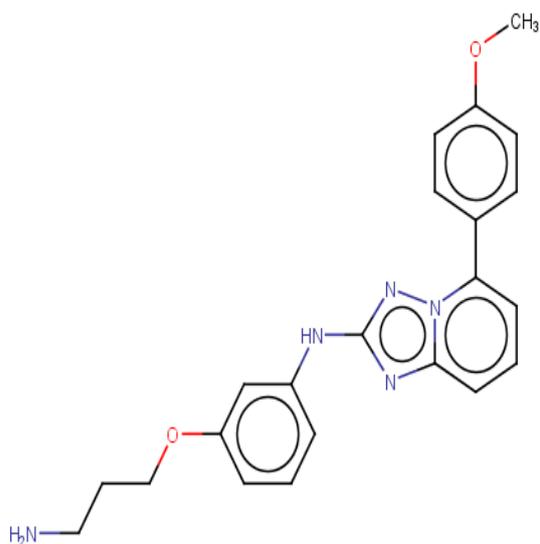
Similaire 427



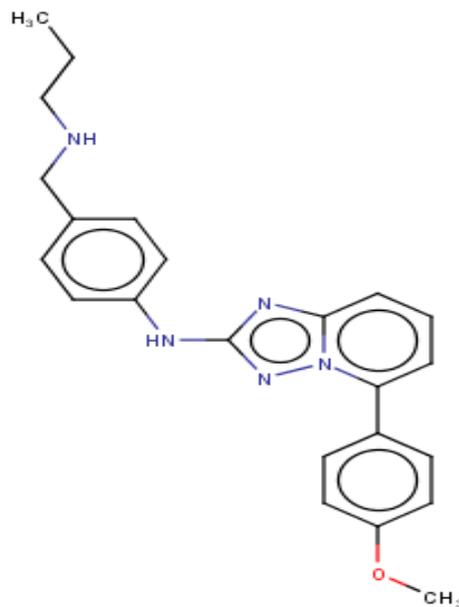
Similaire 84

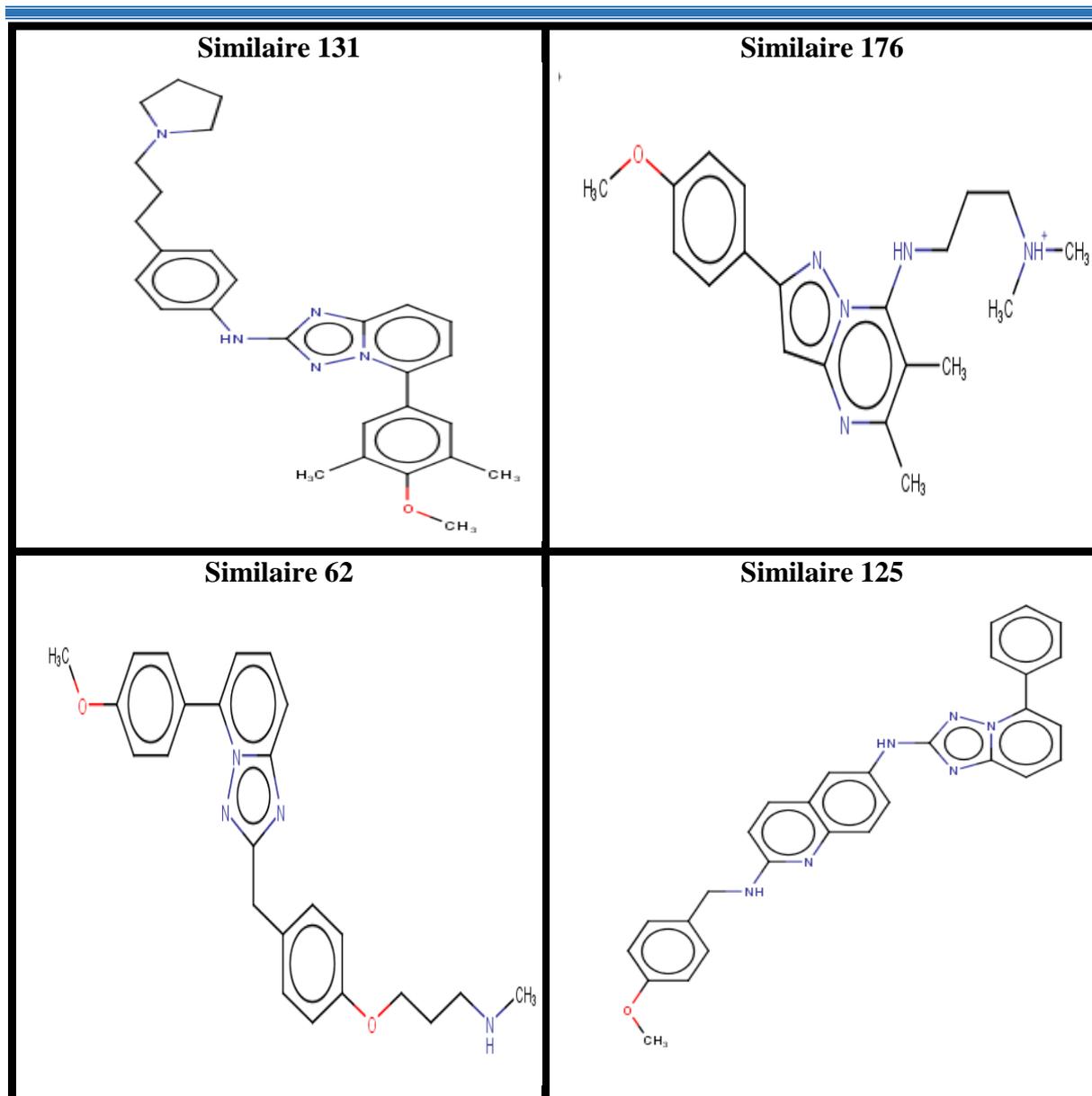


Similaire 111



Similaire 133





Annexe N° 4 : Les noms chimiques des meilleurs similaires de 1K3.

molécule	Nom chimique
425	3-(2-fluorophenyl)-N-[[1-[(4-methoxyphenyl) methyl] piperidin-4-yl]methyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pyridazin-6-amine
120	N-[4-[2-(2-methoxyethylamino) ethoxy] phenyl]-5-(4-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine
14	ASN 08734741; AC1MLX5A; N-[2-(4-methoxyphenyl)-5,6-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl]-N',N'-dimethylpropane-1,3-diamine
67	5-(2,3-dihydro-1-benzofuran-5-yl)-2-[(4-piperazin-1-ylphenyl)methyl]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridine

426	3-cyclopropyl-N-[[2-(4-methoxyphenyl)-1-methylpiperidin-3-yl]methyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pyridazin-6-amine
76	2-[4-[[5-(4-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl]methyl]phenoxy]ethanamine
414	4-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-1-N-[6-(4-methoxyphenyl)pyridazin-3-yl]benzene-1,4-diamine
149	AC1LSLON; ASN 08734740; SR-01000348062; SR-01000348062-1; N-[2-(4-methoxyphenyl)-5,6-dimethylpyrazolo [1,5-a]pyrimidin-7-yl]-N',N'-dimethylethane-1,2-diamine
427	3-(difluoromethyl)-N-[(4-methoxyphenyl)-phenylmethyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-b]pyridazin-6-amine
384	3-[5-(4-methoxyphenyl)-3-methylidenepentyl]-4-methyl-N-[4-(4-methylpiperazin-1-yl) phenyl]-2H-pyrazolo [3,4-d] pyrimidin-6-amine
84	N-[4-[2-(benzylamino) ethoxy]phenyl]-5-(4-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine
111	N-[3-(3-aminopropoxy) phenyl]-5-(4-methoxyphenyl)-[1,2, 4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine
133	5-(4-methoxyphenyl)-N-[4-(propylaminomethyl) phenyl]-[1,2, 4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine
131	5-(4-methoxy-3,5-dimethylphenyl)-N-[4-(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)phenyl]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine
176	AC1OM52M; 3-[[2-(4-methoxyphenyl)-5,6-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl]amino]propyl-dimethylazanium
62	3-[4-[[5-(4-methoxyphenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl]methyl]phenoxy]-N-methylpropan-1-amine
371	5-(4-phenylmethoxyphenyl)-[1,2, 4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-amine
125	VOWFTLACYZCYQO-UHFFFAOYSA-N; N2-(4-methoxy-benzyl)-N6-(5-phenyl-[1,2, 4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-quinoline-2,6-diamine



Résumés

Résumé

Le Docking Moléculaire fait partie des méthodes de modélisation des interactions moléculaires. Dans notre travail, nous avons utilisé le programme de docking moléculaire Surfex afin de développer in silico de nouveaux inhibiteurs de la Tyrosine Kinase- JAK2, cible thérapeutique impliquée dans les pathologies du sang .Cette méthode a permis de réaliser le criblage virtuel de 427 similaires issus de la banque PubChem envers le site actif de la tyrosine kinase -JAK2. Seuls 88 composés ont présentés une affinité supérieure au composé de référence 1K3 dont le score est égal à 3.29. A titre d'exemple citons le composé 425 du code PubChem CID -133277579 qui se présente comme le meilleur inhibiteur théorique de la Tyrosine kinase -JAK2 avec un score de 5.78.

Enfin, la règle de Lipinski a été appliquée aux 10 meilleurs similaires du composé 1K3 qui montrent des résultats positifs concernant des propriétés ADME ce qui permet de considérer ces derniers comme étant de nouveaux inhibiteurs potentiels de la Tyrosine kinase-JAK2.

Mots clés :Docking Moléculaire , Tyrosine Kinase, Surfex, PubChem, Score, Lipinski.

Abstrat

Molecular Docking is part of modeling methods. He tries to combine two or more molecules. It allows to study interactions between different molecules, this modeling is one of the most important. In our work, the Surfex program was used to develop new inhibitors of tyrosine kinase-JAK2 in vitro as a therapeutic target in blood pathologies. Virtual screening of 427 compounds from PubChem to the active site of the enzyme studied. 88 replies were found; but limited on the 10 best ones that we present a higher score compared to the compound 1K3. And also the compound 425 of the PubChem code CID -133277579 presents as a new theoretically more adaptive inhibitor of the tyrosine kinase -JAK2 with a score of 5.78. Finally, the application of the Lipinski rule gives us a positive indication of the ADME properties of the inhibitor 1K3 and its 10 best ones. These results show that these compounds can be presented as new theoretically more affine inhibitors of tyrosine kinase. It is appropriate in future perspectives to verify these theoretical results by carrying out additional experimental studies in vitro and / or in vivo.

Key words: Molecular docking, Tyrosine Kinase, Surfex, Pub-Chem, score, Lipinski rule.

ملخص

الإرساء الجزيئي هو جزء من طرق النمذجة. يحاول الجمع بين جزيئين أو أكثر. إنه يسمح بدراسة التفاعلات بين الجزيئات المختلفة، وهذا النموذج هو واحد من أهمها. في عملنا، وكان يستخدم برنامج Surflex لتطوير في سيليكون ومثبطات جديدة من JAK2 التيروسين Kinase- كهدف العلاجية في أمراض الدم. والفحص الظاهري من 427 مركبات من بوب كيم لموقع نشط من درس الانزيم. تم العثور على 88 رد. ولكنها محدودة في أفضل 10 منها، حيث تقدم درجة أعلى مقارنةً بالمركب K3. 1 وكذلك 425 مركب بوب كيم CID كود ديه -133277579 أنها جديدة محول نظريا JAK2- كيناز التيروسين مع 5.78 العشرات.

وأخيرًا، فإن تطبيق قاعدة Lipinski يعطينا إشارة إيجابية على خصائص ADME الخاصة بالمثبط K3 1 و 10 منها الأفضل. تظهر هذه النتائج أن هذه المركبات يمكن تقديمها كمنظور جديد أكثر نظريا من كيناز التيروسين. من المناسب في المنظورات المستقبلية التحقق من هذه النتائج النظرية من خلال إجراء دراسات تجريبية إضافية في المختبر و / أو في الجسم الحي.

الكلمات المفتاحية: Docking، التيروسين كيناز، برنامج، Surflex بوب كيم، أكثر إنتقائية، قاعدة Lipinski،

**Présenté et soutenu par : DEKKICHE Zakia
BENAICHE Soulef**

Date de soutenance : 03/07/2018

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
spécialité : Biochimie Appliquée.**

Thème :

**Modélisation par Docking moléculaire de l'interaction Enzyme-Inhibiteur : Cas de la Tyrosine
kinase-JAK2 en tant-que cible thérapeutique impliquée
dans les pathologies du sang**

Résumé

Le Docking Moléculaire fait partie des méthodes de modélisation des interactions moléculaires. Dans notre travail, nous avons utilisé le programme de docking moléculaire Surflex afin de développer in silico de nouveaux inhibiteurs de la Tyrosine Kinase- JAK2, cible thérapeutique impliquée dans les pathologies du sang .Cette méthode a permis de réaliser le criblage virtuel de 427 similaires issus de la banque PubChem envers le site actif de la tyrosine kinase -JAK2. Seuls 88 composés ont présentés une affinité supérieure au composé de référence 1K3 dont le score est égal à 3.29. A titre d'exemple citons le composé 425 du code PubChem CID -133277579 qui se présente comme le meilleur inhibiteur théorique de la Tyrosine kinase -JAK2 avec un score de 5.78.

Enfin, la règle de Lipinski a été appliquée aux 10 meilleurs similaires du composé 1K3 qui montrent des résultats positifs concernant des propriétés ADME ce qui permet de considérer ces derniers comme étant de nouveaux inhibiteurs potentiels de la Tyrosine kinase-JAK2.

Mots clés : Docking Moléculaire, Tyrosine Kinase, Surflex, PubChem, Score, Lipinski.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biochimie Appliquée.

Jury d'évaluation :

Président : Mr. CHIKHI A.

Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1.

Rapporteur : Mr. BENSEGUENI A.

Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1.

Examineur : Mr. MOKRANI E.H.

M.A.«A ».Université Frères Mentouri Constantine 1.

Année Universitaire : 2017-2018