



Faculté des Sciences
Département de Chimie

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT EN SCIENCES

THEME

*Etude structurale sur le mode d'inhibition de l'enzyme
Topoisomérase 1 responsable de la prolifération de
cellules cancéreuses*

Option : Chimie Organique Appliquée

par

Mme BOUDJEDIR Atidel

Devant le jury :

Présidente :	Mme BIDJOU-HAIOUR	Chahra	Pr	Université d'Annaba
Directeur de thèse :	M. FERKOUS	Fouad	Pr	Université d'Annaba
Examineurs :	Mme DJEMIL	Rayenne	Pr	Université de Guelma
	Mme GUEZANE LAKOUD	Samia	Pr	Université d'Annaba
	Mme SOBHI	Chafia	MC A	Université de Skikda
	Mme BOUASLA	Souad	MC A	ENSET Skikda

Remerciement

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements au Professeur Fouad FERKOUS pour avoir accepté d'être mon encadreur avec un suivi constant et un intérêt démontré tout au long de mon travail. Je vous remercie pour la grande disponibilité, la patience, les précieux conseils et les pertinentes remarques. Je tiens à vous exprimer à travers ces quelques mots ma profonde gratitude et mon très grand respect.

Je remercie également madame, Chahra BIDJOU, Professeur à l'université de Badji Mokhtar - Annaba, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse. Mes remerciements vont également à madame Rayenne DJEMIL, Professeur à l'université de 08 Mai 1945 - Guelma, et à madame Samia GUEZANE LAKOUD, Professeur à l'université de Badji Mokhtar - Annaba, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à mon travail pour l'examiner et de le juger.

Je tiens également à remercier Docteur Chafia SOBHI et Docteur Souad BOUASLA avec qui j'ai apprécié d'enseigner, pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles, pour avoir su me rassurer et m'avoir offert leurs aides lorsque c'était nécessaire et enfin pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens aussi à exprimer mes chaleureux remerciements à tous les membres du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée. Leurs conseils, aides et encouragement m'ont beaucoup encouragé durant ces années.

Mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance à tous mes collègues de l'Ecole Normale Supérieure d'Enseignement Technologique- Skikda-

Je remercie aussi ma famille et mes amies pour leur soutien inconditionnel et leur présence continue.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Atidel Boudjedir

RÉSUMÉ

Les ADN topoisomérases de type 1 (topo1) sont des protéines universelles et essentielles à la vie cellulaire. Elles ont pour fonction de réguler de manière fine l'équilibre topologique de l'ADN. Chez l'Homme les ADN topoisomérases1 humaine sont des cibles de plusieurs médicaments utilisés en chimiothérapie cancéreuse. Ces médicaments forment des complexes ternaires « topo1-ADN-médicament » entraînant la mort des cellules cancéreuses. La camptothécine est le premier médicament inhibiteur de la topo1 isolé du *camptotheca acuminé*, il est également l'un des principaux composés importants pour le développement du médicament anticancéreux. Dans ce travail, nous avons étudié par docking moléculaire l'activité inhibitrice de deux séries de molécules : des similaires de la camptothécine et des molécules extraites de plantes médicinales d'Afrique du Nord afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de cette classe. L'analyse des résultats du docking moléculaire nous a conduits à la sélection de composés intéressants possédant théoriquement une bonne affinité pour la Topo1-ADN.

MOTS CLÉS

Topoisomérase I, cancer, camptothécine, docking moléculaire.

ABSTRACT

Type 1 DNA topoisomerases (topo1) are universal proteins essential for cell life. Their function is to finely regulate the topological balance of DNA. In humans, DNA topoisomerases1 are targets of several drugs used in cancer chemotherapy. These drugs form ternary "topo1-DNA-drug" complexes leading to the death of cancer cells. Camptothecin is the first topo1 inhibitor drug isolated from *camptotheca acuminata*, it is also one of the main compounds important for the development of the anti-cancer drug. In this work, we studied by molecular docking the inhibitory activity of two datasets of molecules: Camptothecin similars and Northern African Natural Products databases in order to contribute to the development of new inhibitors of this class. The analysis of the results of the molecular docking led us to the selection of interesting compounds theoretically possessing a good affinity for Topo1-DNA.

KEYWORDS

Topoisomerase1, cancer, camptothecin, molecular docking.

ملخص

يعتبر إنزيم التوبوإيزوميراز 1 بروتين ضروري لحياة الخلية، وظيفته التنظيم الدقيق للتوازن الطوبولوجي للحمض النووي. كما يُعدُّ التوبوإيزوميراز 1 البشري هدفاً أساسياً للعديد من الأدوية المستخدمة في العلاج الكيميائي للسرطان من خلال تشكيل معقد ثلاثي يجمعه بالأدوية في صورة معقد ثلاثي "توبو 1 - DNA- الليغند" مما يؤدي إلى موت الخلايا السرطانية. جزيئة الكامبتوتيسين تصنف كأول مثبط للتوبوإيزوميراز 1 و هي مستخلصة من نبتة *camptotheca acuminata* ، و أحد المركبات الأساسية التي أدت إلى تطوير جزيئات مشتقة تسوق حالياً كدواء مضاد للسرطان. في هذه الأطروحة، قمنا بعمل دراسة النشاط التثبيطي باستعمال الالتحام الجزيئي لسلسلتين من الجزيئات: الأولى لمشابها الكامبتوتيسين والثانية خاصة بقاعدة الجزيئات المستخلصة من النباتات الطبية من شمال إفريقيا، وذلك من أجل المساهمة في الكشف و تطوير مثبطات جديدة تستهدف إنزيم التوبوإيزوميراز. قادنا تحليل نتائج الالتحام الجزيئي إلى اختيار مركبات مثيرة للاهتمام تمتلك نظرياً تقارباً جيداً مع توبو 1 - DNA.

كلمات مرشدة

توبوإيزوميراز 1، السرطان، كامبتوتيسين ، الالتحام الجزيئي.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AE : Algorithme évolutionnaire

AED : Algorithme évolutionnaire différentiel

AES : Algorithme évolutionnaire simplex

Ala : Alanine

Å : Angstrom

Arg : Arginine

ARN : Acide ribonucléique

Asn : Asparagine

Asp : Acide aspartique

CPT : Camptothécine

CPT-11 : Irinotécan

Glu : Glutamine

Gly : Glycine

Irino : Irinotécan

ITK : Inhibiteurs de tyrosine kinase

Leu : Leucine

Lys : Lysine

MVD : Molegro Virtuel Docker

PDB : Banque de données protéiques (Protein Data Bank)

Pro : Proline

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RMSD : Ecart quadratique moyen (Root mean square deviation)

RX : Rayons X

SDF : Structure Data File

Thr : Thréonine

TOPO : Topoisomérase

TPT : Topotécan

TTC : Topotécan

Tyr : Tyrosine

3D : Trois dimensions

Table des Matières

Remerciement	ii
RÉSUMÉ	iii
Abstract	iv
ملخص	v
Liste des abréviations	vi
Table des Matières	viii
Liste des Figures	xi
Liste des Tableaux	xv
Introduction Générale	1
1.1 Références Bibliographiques	3
Chapitre 1	6
Généralités sur le cancer et les ADN topoisomérases	6
1.1 Introduction	7
1.2 Généralités sur le cancer	7
1.2.1 Définition du cancer	7
1.2.2 Evolution d'un cancer au sein de l'organisme	8
1.2.3 Caractéristiques d'une cellule cancéreuse	8
1.2.4 Traitement médicamenteux anticancéreux	9
1.2.5 Récepteurs des anticancéreux	11
1.3 ADN topoisomérases	16
1.3.1 Définition des ADN topoisomérases	16
1.3.2 Classification des ADN topoisomérases	17
1.3.3 Caractéristiques de l'ADN topoisomérase 1 humaine	18
1.3.4 Cycle catalytique de l'ADN topoisomérase 1 humaine	20
1.3.5 Inhibiteurs de l'ADN Topoisomérase 1 humaine	21
1.3.5.1 Les inhibiteurs catalytiques	22
1.3.5.2 Les poisons	23
1.3.6 Camptothécine et ses dérivés	23

1.3.6.1	Structure chimique de la CPT _____	25
1.3.6.2	Quelques dérivés de la camptothécine _____	26
1.3.6.3	Mécanisme d'action de la camptothécine _____	30
1.3.6.4	Structure du complexe ternaire _____	31
1.4	Conclusion _____	33
1.5	Références Bibliographiques _____	34
	<i>Chapitre 2 _____</i>	42
	Modélisation des interactions protéine-ligand par Docking moléculaire _____	42
2.1	Introduction _____	43
2.2	Définition du docking moléculaire _____	43
2.3	Types de docking _____	43
2.3.1	Le docking rigide _____	44
2.3.2	Le docking semi-flexible _____	44
2.3.3	Le docking flexible _____	44
2.4	Principe du docking moléculaire _____	44
2.4.1	Représentation du système _____	45
2.4.2	Les algorithmes de recherche _____	46
2.4.2.1	Les méthodes de recherche conformationnelle _____	47
2.4.2.2	Les méthodes par fragmentation _____	47
2.4.2.3	Les méthodes des bases de données _____	47
2.4.2.4	Les méthodes aléatoires _____	48
2.4.2.5	Les méthodes de simulation _____	50
2.4.3	Processus de score _____	50
2.4.3.1	Principe _____	50
2.4.3.2	Famille de fonctions de score _____	50
2.5	Molegro Virtual Docker (logiciel de docking moléculaire utilisé dans l'étude) __	52
2.5.1	L'algorithme de recherche implémentée dans MVD _____	52
2.5.1.1	MolDock Optimizer _____	52
2.5.1.2	L'algorithme MolDock SE (Simplex Evolution) _____	54
2.5.1.3	L'algorithme Simplex Itéré _____	55
2.5.2	Fonction Score _____	55
2.5.2.1	Moldock Score _____	55
2.5.2.2	Plant Score _____	58
2.6	Les principales classes d'interaction _____	59
2.6.1	Les interactions électrostatiques _____	59

2.6.2	Liaison hydrogène _____	59
2.6.3	Les interactions de Van Der Waals _____	61
2.6.4	Interactions hydrophobes _____	62
2.7	Conclusion _____	63
2.8	Références bibliographiques _____	64
	<i>Chapitre 3 _____</i>	<i>71</i>
	Matériels et méthodes _____	71
3.1	Introduction _____	72
3.2	Matériels utilisés _____	72
3.2.1	Microordinateurs _____	72
3.2.2	Programmes (logiciels) _____	73
3.2.3	Banques de données (chimiothèques) _____	73
3.3	Méthodes _____	74
3.3.1	Docking moléculaire _____	74
3.3.2	Reproduction de la structure cristalline _____	74
3.3.3	Le choix du complexe 1K4Tpdb _____	74
3.3.4	Choix du logiciel de docking moléculaire _____	75
3.3.5	Préparation des molécules au docking moléculaire _____	75
3.3.5.1	Préparation du récepteur (protéine) _____	75
3.3.5.2	Préparation de ligands _____	76
3.3.6	Criblage de la chimiothèque _____	77
3.3.7	Protocole du docking moléculaire _____	77
	<i>Chapitre 4 _____</i>	<i>78</i>
	Résultats et discussion _____	78
4.1	Redocking du programme MVD _____	79
4.2	Docking moléculaire de la première série de chimiothèques _____	81
4.2.1	Analyse des résultats _____	86
4.3	Docking moléculaire de la deuxième chimiothèque _____	93
4.3.1	Analyse des résultats _____	100
4.4	Références Bibliographiques _____	119
	Conclusion et Perspectives _____	122
	Annexe _____	125

Liste des Figures

Figure 1.1 : Structures chimiques de l’anastrozole, le tamoxifène et le fulvestrant	10
Figure 1.2 : Structures chimiques de l’iratinib, le sorafenib et la sunitinib	11
Figure 1.3: Structures chimiques de la camptothécine et le topotécan	12
Figure 1.4: Structures chimiques de l’idarubicine et l’étoposide	12
Figure 1.5: Structures chimiques de l’erlotinib, le nilotinib et le géfitinib.....	13
Figure 1.6: Structures chimiques de l’exémestane et la létrozole	14
Figure 1.7: Structure chimique de la toremifene	15
Figure 1.8: Structures chimiques de la cyprotérone, le flutamide, le nilutamide et le bicalutamide	16
Figure 1.9: Mode de coupure de l’ADN par les différents types d’ADN Topoisomérases	18
Figure 1.10: Schéma des domaines et structure 3D de la Topo1 humaine (A)Structure cristallographique du complexe Topo1-ADN (D’après Capranico, 2017). (B) Organisation des quatre domaines de la Topo1	19
Figure 1.11: (A) cycle catalytique des topoisomérases de type1B (B) Réaction de trans-estérification entre la tyrosine 723 de la Topo1 humaine et l’extrémité 3’phosphorylé de l’ADN	21
Figure 1.12: Mode d’action des deux types d’inhibiteurs de Topo1. (A) Les inhibiteurs catalytiques agissent en se fixant à l’enzyme et/ou à l’ADN et empêchent la fixation et/ou la coupure de l’ADN par la topo1. (B) Les poisons inhibent spécifiquement la religation de l’ADN.	22
Figure 1.13: Structure chimique du β -lapachone.....	22
Figure 1.14: Structures chimiques de la corilagine, la doxorubicine, la shiconine et la quercétine	23
Figure 1.15: <i>Camptotheca acuminata</i>	24
Figure 1.16: Structure chimique de la camptothécine.....	25
Figure 1.17: Ouverture du cycle lactonique en milieu basique	26
Figure 1.18: Structure chimique du topotécan.....	26
Figure 1.19: Conversion de l’irinotécan en SN-38 par estérification	27

Figure 1.20: Structure chimique du belotécan	27
Figure 1.21: Structure chimique du lurtotécan	28
Figure 1.22: Structure chimique d'exatécan	28
Figure 1.23: Structure chimique du rubitécan	29
Figure 1.24: Structures chimiques de quelques dérivés de l'homocamptothécine	30
Figure 1.25: Mécanisme d'action de la camptothécine	31
Figure 1.26: Interactions de TPT avec le complexe ADN-enzyme (TPT dans sa forme lactonique est représentée en bleu(A) alors que la forme ouverte est représentée en jaune(B))..	32
Figure 1.27: interactions de CPT avec le complexe ADN-enzyme ((A) montre les interactions de CPT avec le complexe ADN-enzyme, (B) montre les interactions de CPT avec le complexe ADN-enzyme, d'une part et entre l'ADN et TPT dans le complexe ternaire, d'autre part.	32
Figure 2.1: Illustration d'une surface de Connolly. La surface de Connolly est représentée en noir et la surface accessible au solvant, en rouge. En bleu, la balle d'eau virtuelle. Couleur orange, les différents atomes de la molécule. (Dréo, 2003)	45
Figure 2.2: Projection d'une molécule dans une grille tridimensionnelle	46
Figure 2.3: Construction par fragmentation d'un ligand au sein d'un récepteur	47
Figure 2.4: Principe de l'algorithme évolutionnaire différentiel de MVD	53
Figure 2.5: Interactions électrostatiques ioniques.....	59
Figure 2.6: Liaison hydrogène.....	60
Figure 2.7: Les forces de Keesom : dipôle permanent/permanent.....	61
Figure 2.8 : Les forces de Debye : dipôle permanent/induit	61
Figure 2.9: Les forces de London : dipôle induit/induit.....	62
Figure 2.10: Interaction hydrophobe.....	62
Figure 3.1: Structure cristalline du complexe ADN-topo1 (A) Structure cristalline du complexe ADN-topo1- Topotecan (B)	76
Figure 4.1 : Superposition de la géométrie du ligand EHD obtenu par rayon-X (coloré en jaune) et celle calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).....	79
Figure 4.2: Superposition de la géométrie du ligand TTC obtenu par rayon-X (coloré en jaune) et celle calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).....	80

Figure 4.3: Superposition de la géométrie du ligand TTG obtenu par rayon-X (coloré en jaune) et celle calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).....	80
Figure 4.4: Comparaison de la conformation expérimentale du ligand M38 (coloré en jaune) avec sa conformation optimale calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).	80
Figure 4.5: Comparaison de la conformation expérimentale du ligand AI3 (coloré en jaune) avec sa conformation optimale calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).	81
Figure 4.6: Superposition de la géométrie du ligand SA3 obtenu par rayon-X (coloré en jaune) et celle calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).....	81
Figure 4.7: structures des 34 meilleurs ligands sélectionnés sur la base du criblage virtuel.....	86
Figure 4.8: Interactions entre l'Irinotécan et le complexe ADN-topo1	88
Figure 4.9: Interactions entre le composé 21882279 et le complexe ADN-topo1	89
Figure 4.10: interactions entre le composé 96316309 et le complexe ADN-topo1, (B) interactions entre le composé 40407694 et le complexe ADN-topo1, (C) interactions entre composé 95911711 et le complexe ADN-topo1.....	90
Figure 4.11: (D) interactions entre le composé 9407486 et le complexe ADN-topo1, (E) interactions entre le composé 18968484 et le complexe ADN-topo1.....	91
Figure 4.12: (F) interactions entre le composé 21868250 et le complexe ADN-topo1, (G) interactions entre le composé 12327513 et le complexe ADN-topo1.....	91
Figure 4.13: (H) interactions entre le composé 36369738 et le complexe ADN-topo1, (I) interactions entre le composé 34922052 et le complexe ADN-topo1.....	92
Figure 4.14 : Structures des vingt molécules obtenues	99
Figure 4.15: Interactions de la 3'-O-methyl-4-O-(n"-O-galloyl-beta-D-xylopyranosyl) ellagic acid avec la Topo 1	101
Figure 4.16: Interactions de l'acide 3'-O-methyl-4-O-(n"-O-galloyl-beta-D-xylopyranosyl) ellagique avec l'ADN.....	101
Figure 4.17 : Interactions de l'isorhamnetin-3-gentiobioside-7-glucoside avec la Topo 1	102
Figure 4.18 : Interactions de l'isorhamnetin-3-gentiobioside-7-glucoside avec l'ADN	102
Figure 4.19: Interactions de la quercetine-3-rutinoside-7-glucoside avec la Topo 1	103
Figure 4.20: Interactions de la quercetine-3-rutinoside-7-glucoside avec l'ADN.....	103

Figure 4.21: Interactions de la 2'',2'''-di-O-beta-glucopyranosyl-vicenin II avec la Topo 1.....	104
Figure 4.22: Interactions de la 2'',2'''-di-O-beta-glucopyranosyl-vicenin II avec l'ADN.....	104
Figure 4.23: Interactions de l'acide 4-O-(3'',4'''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique avec la Topo 1.....	105
Figure 4.24: Interactions de l'acide 4-O-(3'',4'''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique avec l'ADN.....	106
Figure 4.25: Interactions de la kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside avec la Topo 1.....	107
Figure 4.26: Interactions de la kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside avec l'ADN.....	107
Figure 4.27: Interactions de l'acide 3'-O-methyl-4-O-(3'',4'''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique avec la Topo 1.....	108
Figure 4.28: Interactions de l'acide 3'-O-methyl-4-O-(3'',4'''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique avec l'ADN.....	108
Figure 4.29: Interactions de la tellimagrandine II avec la Topo 1.....	109
Figure 4.30: Interactions de la tellimagrandine II avec l'ADN.....	109
Figure 4.31: Interactions de la gallotannin 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose avec la Topo 1.....	110
Figure 4.32: Interactions de la gallotannin 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose avec l'ADN.....	111
Figure 4.33: Interactions de la tellimagrandine I avec la Topo 1.....	111
Figure 4.34: Interactions de la tellimagrandine I avec l'ADN.....	112

Liste des Tableaux

Tableau 1-1: Classification des topoisomérases selon l'origine et le mécanisme d'action	17
Tableau 2-1: Exemples de charges d'atomes. Modèle de charges prises en compte par MolDock Score pour différents ligands et protéines.	56
Tableau 2-2: Type d'atomes contribuant à la formation d'une liaison hydrogène.	57
Tableau 2-3: Les paramètres correspondants à l'énergie de torsion.....	58
Tableau 2-4: Les trois catégories de liaison hydrogène.	60
Tableau 3-1: Les codes PDB des complexes "Topo1 humaine -ADN-inhibiteur" avec Leur résolution.PDB	75
Tableau 4-1: Redocking des ligands de référence dans plusieurs PDB	79
Tableau 4-2: Classification des dix premières poses suivant l'énergie du Moldock score.....	82
Tableau 4-3: Classification des dix premières poses suivant l'énergie de la liaison hydrogène (H) dans l'interaction Ligand – Top1	82
Tableau 4-4: Classification des dix premières poses suivant l'énergie d'interaction ligand-ADN	83
Tableau 4-5: Classification des dix premières poses suivant l'énergie d'interaction ligand-protéine.....	84
Tableau 4-6: Les énergies d'interaction Moldock Score des vingt meilleures poses obtenues ...	94
Tableau 4.7: Nom, espèce, origine et les activités biologiques des vingt meilleures molécules obtenues	113

Introduction Générale

Le cancer est une pathologie métabolique qui pose un grand problème de santé publique. Durant l'année 2020, 19.3 millions de cas de cancer ont été diagnostiqués et près de 10 millions de décès ont été enregistrés dans le monde. A l'échelle nationale, cette maladie du siècle se transforme en épidémie. En Algérie, plus particulièrement, 65.000 nouveaux cas de cancer et pas moins de 20.000 décès ont été enregistrés (Ferlay, 2021). Malgré les nombreux progrès (tels que la chimiothérapie et la radiothérapie par exemple) qui ont été réalisés dans le domaine de la recherche contre le cancer, cette maladie reste encore une des premières causes de mortalité dans les pays développés. De plus, même si la chimiothérapie et la radiothérapie constituent des traitements de choix, les nombreux effets secondaires qu'elles induisent rendent la recherche de nouvelles approches thérapeutiques toujours indispensable. Parmi ces nouvelles approches en développement, on trouve celles qui s'intéressent au contrôle du cycle cellulaire et qui semblent prometteuses (Justine, 2018).

Les ADN-Topoisomérases sont des enzymes impliquées dans la réplication cellulaire, leur rôle dans la croissance des tumeurs en fait des cibles intéressantes pour les médicaments. Ces enzymes assurent la séparation des brins d'ADN au cours de la transcription, la réplication, la ségrégation chromosomique en supprimant les contraintes de torsion présentes au cours de ces processus biologiques fondamentaux (Champoux, 2013; Pommier 2010-2016 ; Wang, 2002). L'activité des topoisomérases est liée à leur capacité de produire au sein de l'ADN des coupures transitoires. Ces enzymes sont séparées en deux groupes en fonction du type de coupures induites : les topoisomérases de type I et les topoisomérases de type II.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'ADN topoisomérase I humaine (Topo I) qui est une protéine nucléaire monomérique qui catalyse le passage d'un topoisomère de l'ADN à un autre par coupure d'un des brins de l'ADN. Ce phénomène permet de relaxer l'ADN en torsion excessive en modifiant d'une unité le nombre d'enlacement de ses brins. Un grand nombre d'inhibiteurs de topoisomérases stabilisent le complexe ADN-topoisomérase I et empêchent la religation du brin de l'ADN. Ce complexe topoisomérase I-ADN-inhibiteur, appelé complexe ternaire, est stabilisé par un ensemble de liaisons hydrogène entre l'inhibiteur et l'ADN d'une part et l'inhibiteur et la topoisomérase I de l'autre part ce qui entraîne un retard de la religation. Parmi ces inhibiteurs connus on peut notamment citer la camptothécine (CPT) qui est d'origine naturelle (Staker, 2002-2005).

Dans les années 1970, la camptothécine a été identifiée comme un agent cytotoxique particulièrement puissant dans l'activité clinique. Son développement a été arrêté en raison de problème de la faible solubilité dans l'eau qui a été résolu par l'administration du sel sodique hydrosoluble de la CPT (Wall, 1995; Hsiang, 1985-1988). Un autre problème majeur réside dans la toxicité sévère de la CPT qui a fait que les essais cliniques ont été suspendus jusqu'au 1985. A partir de cette année, la découverte de la topoisomérase1 comme cible intracellulaire de la CPT a eu lieu (Hsiang, 1985-1988; Mattern, 1987; Croce, 2004 ; Martino , 2017). Cette découverte a permis d'identifier et de développer avec succès des agents antitumoraux dérivés de la CPT plus hydrosolubles comme le Topotécan (TTC) et l'Irinotécan (Irino) utilisés respectivement pour le traitement du cancer ovarien et du cancer colorectale (Sawada, 1996 ; Garcia, 2002 ; Diaz, 2009).

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette enzyme et de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs pour lutter contre la maladie du cancer, nous avons opté pour une approche *in silico* afin de modéliser les interactions enzyme-inhibiteur, appelée la méthode de docking moléculaire, qui a récemment gagné beaucoup d'intérêt dans des nombreuses stratégies de développement de médicaments (Khemnar, 2021 ; Keval, 2022).

Notre thèse est présentée sous forme de deux parties. Une revue bibliographique sera rapportée dans deux chapitres. Nous abordons dans le premier chapitre des rappels généraux sur le cancer, la structure et le fonctionnement de l'ADN-Topoisomérase1, et sur ses inhibiteurs. Dans le deuxième chapitre, nous présenterons le principe de fonctionnement et le processus de score du programme de docking moléculaire.

Dans la partie expérimentale, nous décrivons le matériel utilisé pour l'obtention des structures des cibles étudiées et celles des ligands nécessaires au processus du docking moléculaire effectué par le logiciel Molegro Virtuel Docker (MVD) tout en détaillant le protocole de docking ainsi que les résultats obtenus et la discussion.

Enfin une conclusion générale résume l'ensemble du travail réalisé et présente les perspectives d'études que nous envisageons pour l'avenir.

1.1 Références Bibliographiques

Champoux, J. J. (2001) “DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism.” *Annual Review of Biochemistry* 70(1) pp.369–413.

Champoux, J. J. (2013) “DNA Topoisomerases: TypeI”, *Encyclopedia of Biological chemistry*, pp.157-162

Croce, A.C., Bottiroli, G., Supino, R., Favini, E., Zuco, V., Zunino, F. (2004) “Subcellular localization of the camptothecin analogues, topotecan and gimatecan”, *Biochem. Pharmacol*, 67, pp. 1035–1045.

Diaz de la Loza, M.C., Wellinger RE (2009) A novel approach for organelle-specific DNA damage targeting reveals different susceptibility of mitochondrial DNA to the anticancer drugs camptothecin and topotecan. *Nucleic Acids Res*, 37(4), pp. 1-12

Ferlay, J., Ervik, M., Lam. F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M. (2020) “Observatoire mondial du cancer : « Cancer Today ». Lyon”, *Centre international de recherche sur le cancer* (<https://gco.iarc.fr/today>, consulté en février 2021).

Garcia-Carbonero, R., Supko, J.G. (2002) “Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins”, *Clin. Cancer. Res*, 8, pp. 641–661.

Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F. (1985) “Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I”, *J. Biol. Chem* 260 (27), pp. 14873–14878.

Hsiang, Y.H., Liu, L.F. (1988) “Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin”, *Cancer Res*, 48(7), pp. 1722–1726

Justine, L. D., Chao-Ming, H., Nei-Li, C. and Hiroshi, H. (2018) “Topoisomerases as anticancer targets”, *Biochem J*, 475(2),pp. 373-398

Keval, R., Tejas, G. (2022) “Basics, types and applications of molecular docking: A review”, *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*,7(1), pp.12–16.

Khemnar, M., Dnyandev, G.V.B., Kulkarni, V.C., Menkudale, A.C. and Otari, K.V.(2021) “A review on molecular docking”, *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry* ,22(3), pp. 60-68.

Martino, E., Della, V.S., Terribile, E., Benetti, E., Sakaj, M., Centamore, A. (2017) “The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs”, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 27, pp.701–707.

Pommier, Y., Elisabetta, L., HongLiang, Z. and Christophe, M. (2010) “DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs.” *Chemistry & Biology* 17 (5), pp. 421–433.

Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S.N., and Nitiss, J.L. (2016) “Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replicationand genomic stability”, *Nature reviews Molecular cell biology*, 17, pp.703-721.

Sawada, S., Yokokura, T., Miyasaka, T. (1996) "Synthesis of CPT-11 (irinotecan hydrochloride trihydrate)", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 803, pp. 13–28.

Staker, B.L., Feese, M.D., Cushman, M., Pommier, Y., Zembower, D., Stewart, L., and Burgin, A.B. (2005) "Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex", *Journal of medicinal chemistry*, 48, pp. 2336-2345.

Staker, B.L., Hjerrild, K., Feese, M.D., Behnke, C.A., Burgin, A.B., Jr., and Stewart, L. (2002) "The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, pp. 15387-15392.

Wall, M.E., Wani, M.C. (1995) "Camptothecin and taxol: discovery to clinic-thirteenth Bruce F. Cain memorial award lecture", *Cancer Res*, 55, pp.753–760.

Wang, James, C. (2002) "Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (6), pp. 430–40.

Revue
bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur le cancer et les ADN topoisomérases

1.1	Introduction	7
1.2	Généralités sur le cancer	7
1.2.1	Définition du cancer	7
1.2.2	Evolution d'un cancer au sein de l'organisme	8
1.2.3	Caractéristiques d'une cellule cancéreuse	8
1.2.4	Traitement médicamenteux anticancéreux	9
1.2.5	Récepteurs des anticancéreux	11
1.3	ADN topoisomérases	16
1.3.1	Définition des ADN topoisomérases	16
1.3.2	Classification des ADN topoisomérases	17
1.3.3	Caractéristiques de l'ADN topoisomérase 1 humaine	18
1.3.4	Cycle catalytique de l'ADN topoisomérase 1 humaine	20
1.3.5	Inhibiteurs de l'ADN Topoisomérase 1 humaine	21
1.3.5.1	Les inhibiteurs catalytiques	22
1.3.5.2	Les poisons	23
1.3.6	Camptothécine et ses dérivés	23
1.3.6.1	Structure chimique de la CPT	25
1.3.6.2	Quelques dérivés de la camptothécine	26
1.3.6.3	Mécanisme d'action de la camptothécine	30
1.3.6.4	Structure du complexe ternaire	31
1.4	Conclusion	33
1.5	Références Bibliographiques	34

1.1 Introduction

La maladie du cancer se caractérise principalement par la prolifération incontrôlée ainsi que par l'échappement à la mort programmée (apoptose) des cellules malignes. Actuellement, son traitement vise à l'éradication complète de ces cellules, à travers leur ablation, en inhibant leur prolifération et en induisant leur mort. Cette stratégie fait appel à plusieurs moyens, utilisés seuls ou en combinaison : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicamenteux. Parmi ces derniers nous trouvons la chimiothérapie cytotoxique, l'immunothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées.

La chimiothérapie anticancéreuse fait appel à des médicaments qui interfèrent avec le fonctionnement cellulaire aboutissant à la mort cellulaire ou à l'arrêt de la prolifération cellulaire. De nombreux médicaments ciblent l'ADN notamment en bloquant la réplication et empêchant la transcription. Ces dernières années, les inhibiteurs de la topoisomérase sont devenus des cibles populaires pour les traitements de chimiothérapie contre le cancer.

Dans ce chapitre, nous présenterons des généralités sur le cancer, en décrivant les différents traitements. Dans une deuxième partie de ce chapitre, nous présenterons les ADN topoisomérases, en détaillant la description de la topoisomérase humaine (topo1), sa structure, son rôle et mode de fonctionnement. Un état de l'art sur les types d'inhibiteurs de cette enzyme et leurs limites dans le traitement du cancer sera présenté à la fin de ce chapitre.

1.2 Généralités sur le cancer

1.2.1 Définition du cancer

Le cancer décrit un ensemble de maladies caractérisées par la prolifération anarchique et incontrôlée de certaines cellules de l'organisme ayant échappé aux mécanismes normaux de contrôle de leur régulation et de leur différenciation. Ces cellules anormales dérivent toutes d'une cellule initiatrice, provenant d'un tissu normal de l'organisme, ayant subi une mutation et ayant acquis les caractéristiques nécessaires pour se multiplier indéfiniment, envahir les tissus avoisinants et diffuser vers d'autres organes formant ainsi des métastases (Alison, 2007 ; Tubiana, 2008 ; Avendano 2008 ; Lowenser, 2009 ; George, 2010)

1.2.2 Evolution d'un cancer au sein de l'organisme

La transformation des cellules normales en cellules cancéreuses dans le corps est un processus lent comportant de nombreuses étapes. Il y a généralement quatre étapes principales

- **Initiation** : il s'agit d'une étape ponctuelle correspondant à la modification de l'ADN, la plus fréquente est la mutation d'une ou de plusieurs bases de la double hélice après exposition à des carcinogènes ou à certains déclencheurs. Ces bases sont soit remplacées par d'autres bases, soit supprimées. Les cellules avec des changements de bases ne peuvent pas initier l'apoptose (mort cellulaire programmée) et ne répondent plus aux signaux qui déclenchent la mort cellulaire, perdant ainsi la fonction de maintenir l'équilibre entre la division dépendante de la taille de l'organe et la mort cellulaire (Colin, 1998; Hanahan, 2000 ; Santella, 2005).
- **Promotion** : la phase de promotion est relativement longue, durant laquelle les cellules initiales vont proliférer et conduire progressivement au développement de cellules mutantes. Divers facteurs endogènes ou exogènes, du fait de leurs effets répétés, vont alléger certains des mécanismes qui contrôlent la multiplication cellulaire
- **Progression** : cette étape est caractérisée par l'apparition de lésions malignes qui peuvent se propager dans tout le corps. L'accumulation d'anomalies génétiques confère aux cellules les caractéristiques des cellules cancéreuses leur permettant de se multiplier dans un état anarchique et de perdre leur identité liée au tissu auxquels elles appartiennent. Les cellules cancéreuses permettent à de nouveaux vaisseaux sanguins de se former, ce qui aidera à nourrir la tumeur et à la maintenir en croissance
- **Dissémination métastatique** : La propagation métastatique est un processus qui provoque la migration, l'implantation et la prolifération des cellules tumorales présentes dans une tumeur primaire dans des organes distants pour former des tumeurs secondaires ou des métastases (Thurston, 2007 ; Hanahan, 2000).

1.2.3 Caractéristiques d'une cellule cancéreuse

Les cellules susceptibles de conduire à la formation d'un cancer présentent plusieurs particularités (Thurston 2007 ; D.Hanahan, 2000- 2011- 2012):

- indépendant des signaux de prolifération qui régulent normalement sa croissance et sa division
- capacité à échapper du processus de mort cellulaire programmée.

- capacité à se diviser indéfiniment sans entrer dans le vieillissement.
- insensibilité aux signaux antiprolifératifs.
- acquisition d'un pouvoir invasif et de production de métastases.
- capacité à développer des réseaux vasculaires pour leur fournir de l'oxygène, de l'énergie et des facteurs de croissance (angiogénèse), transférant ainsi des ressources locales pour les soutenir.
- Capacité d'empêcher les défenses immunitaires de l'organisme de les attaquer.

1.2.4 Traitement médicamenteux anticancéreux

La plupart des médicaments anticancéreux actuellement disponibles ont pour but de tuer les cellules tumorales et de provoquer une réduction totale ou partielle de la tumeur, par des voies distinctes. Ils atteignent les capacités prolifératives des cellules cancéreuses mais également celle des cellules normales de l'organisme, ou leur toxicité hématologique et digestive, c'est sur la base de ces capacités antiprolifératives que la plupart ont été découverts ou sélectionnés.

Les principaux types de thérapies anticancéreuses sont les médicaments cytotoxiques, la chimiothérapie, la thérapie ciblée, l'hormonothérapie et les immunomodulateurs.

Le traitement des maladies cancéreuses fait généralement intervenir plusieurs types de médicaments, utilisés successivement ou simultanément.

- **Chimiothérapie**

La chimiothérapie est un traitement de référence dans la prise en charge des cancers, elle peut être utilisée seule ou en association avec d'autres approches thérapeutiques (chirurgie, radiothérapie, thérapie ciblée...). En cas d'association avec une chirurgie ou une radiothérapie, la chimiothérapie peut être réalisée au préalable afin d'obtenir une réduction du volume de la tumeur et de faciliter la chirurgie ou la radiothérapie, cette thérapie est appelée chimiothérapie néoadjuvante. La chimiothérapie peut être aussi prescrite après une chirurgie ou une radiothérapie c'est la chimiothérapie adjuvante, cette stratégie permet d'éliminer des micrométastases ou de diminuer le taux de récurrence et d'améliorer la survie.

Il existe plusieurs familles de médicaments de chimiothérapie ayant des modes d'actions différents, ils sont des molécules dites « cytotoxiques » qui conduisent à la mort cellulaire par action directe ou indirecte sur l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'acide ribonucléique (ARN) ou les protéines essentielles à la division cellulaire .

▪ Hormonothérapie

Le principe de l'hormonothérapie consiste à moduler ou supprimer l'action des hormones susceptibles de favoriser le développement du cancer. Elle n'est applicable que pour quelques cancers : les cancers du sein, de la prostate, de la thyroïde, mais à moindre degré pour les cancers du testicule, de l'ovaire et du rein. Les médicaments appartenant à cette famille peuvent agir de deux manières, soit en bloquant la production des hormones, tels que l'anastrozole et l'exmestaire, soit en s'opposant à l'action des hormones, tels que le fulvestrant et le tamoxifène (Figure 1.1).

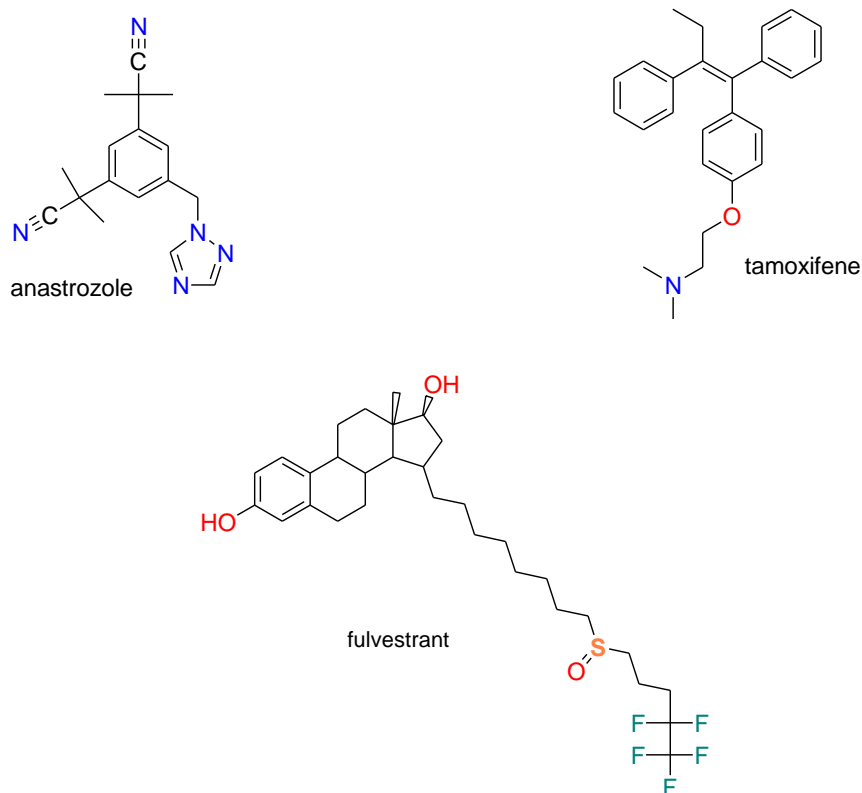


Figure 1.1 : Structures chimiques de l'anastrozole, le tamoxifène et le fulvestrant

▪ Immunothérapie

L'immunothérapie a pour objectif de stimuler le système immunitaire pour accroître l'élimination de cellules cancéreuses. Elle utilise des cytokines (interférons alpha-2a et alpha-2b) qui ont trois actions principales, une action immuno-modulatrice, une action prolifératrice et une action antivirale.

▪ **Thérapies ciblées**

Cette thérapie qui vise à inhiber spécifiquement la croissance ou la prolifération des cellules cancéreuses a moins d'effets secondaires que la chimiothérapie. Leur fonction est d'empêcher la transmission de certaines informations au sein des cellules qui conduisent à se diviser et à proliférer de façon anarchique. Les thérapies ciblées peuvent agir à différents niveaux de la cellule, sur les facteurs de croissance en déclenchant la diffusion d'informations au sein d'une cellule, sur leurs récepteurs en permettant la transmission d'informations à l'intérieur de la cellule, ou sur des éléments à l'intérieur des cellules. Il existe deux types de thérapie ciblée : les inhibiteurs enzymatiques (inhibiteurs intracellulaires) tels que l'inratinib, le sorafénib, la sunitinib ,l'erlotinib etc...(Figure1.2) ; les anticorps monoclonaux (inhibiteurs extracellulaires) tels que le transtuzumab, le bevacizumab , le cetuximab etc....

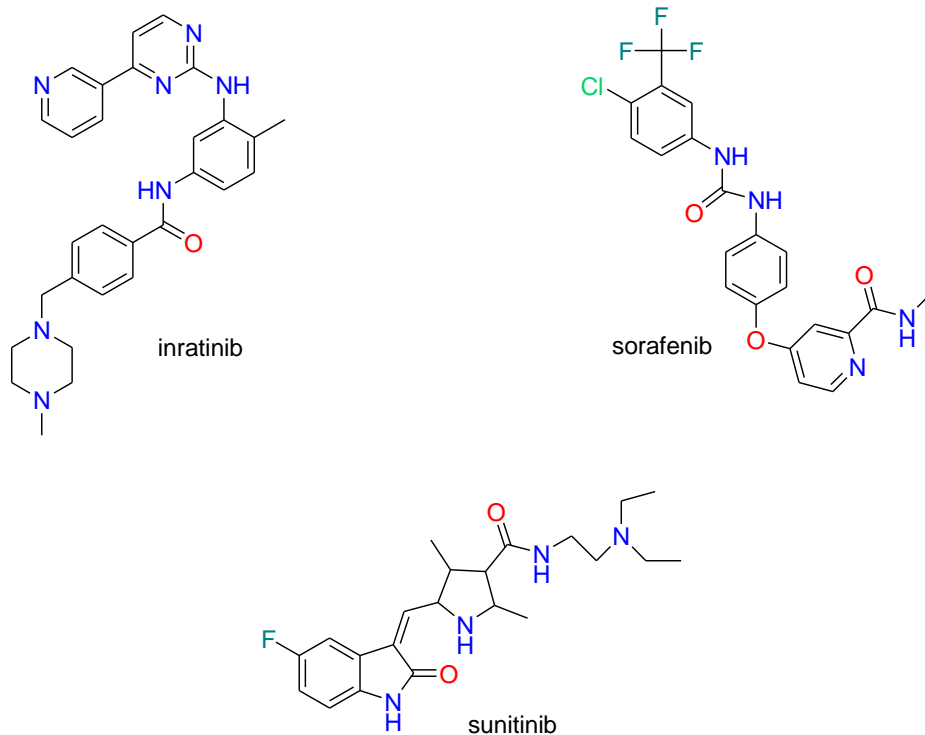


Figure 1.2 : Structures chimiques de l'inratinib, le sorafenib et la sunitinib

1.2.5 Récepteurs des anticancéreux

Les récepteurs des anticancéreux se divisent en :

- **Inhibiteurs de topoisomérase**

Les topoisomérase sont des enzymes impliquées dans la régulation du degré de superenroulement de l'ADN. Cette régulation est essentielle dans les processus de transcription et de réplication cellulaire. On distingue :

- Les topoisomérase de type 1 : Elles réduisent le degré de super-enroulement en créant des cassures monobrins, pour les relier ensuite. L'inhibiteur de ces topoisomérase 1 disponible, appartenant à la famille des camptothécines est le topotécan (Hycamtin®) (Figure1.3).

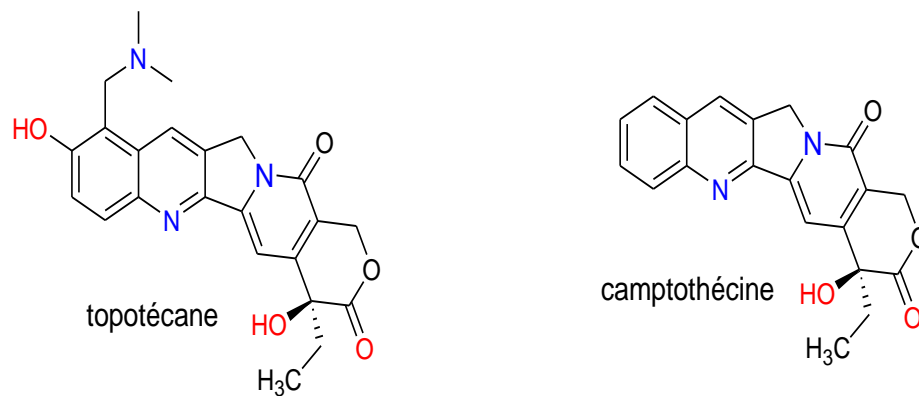


Figure 1.3: Structures chimiques de la camptothécine et le topotécan

- Les topoisomérase de type 2 : Elles créent des cassures bicaténaire. ; parmi les inhibiteurs de ces topoisomérase de type 2 utilisés en chimiothérapie: l'idarubicine (Zavedos®) appartenant à la famille des anthracyclines et l'étoposide (Celltop®) de la famille des epipodophyllotoxines (Figure1.4).

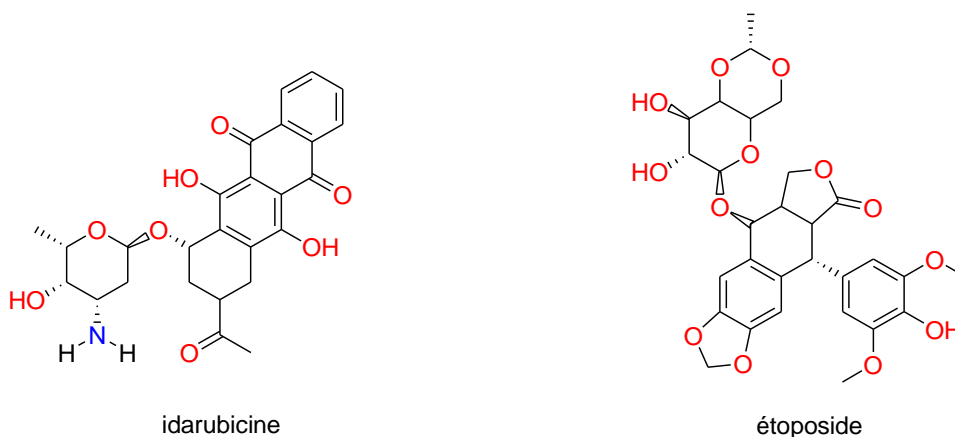


Figure 1.4: Structures chimiques de l'idarubicine et l'étoposide

- **Inhibiteurs de tyrosine kinase**

Les tyrosines kinases sont des protéines des voies de signalisation impliquées dans des processus fondamentaux tels que la prolifération et la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) sont des molécules qui diffusent à travers la membrane cellulaire et ciblent le processus de transduction du signal au niveau des récepteurs des facteurs de croissance et de protéines cytoplasmiques dotées d'une activité tyrosine kinase. Les ITK sont actuellement en plein essor en oncologie et ont une activité cliniquement importante quand la tyrosine kinase ciblée est activée par mutation et se comporte en gène-maitre de la transformation et de la progression tumorale et leurs indications s'étendent rapidement dans ce cadre. Les ITK occupent dorénavant une place majeure dans le dispositif thérapeutique contre le cancer.

Certains inhibiteurs de tyrosine kinase sont assez spécifiques du récepteur de l'EGFR (facteur de croissance épidermique) comme le géfitinib et l'erlotinib, d'autres sont surtout actifs sur le récepteur PDGFR (facteur de croissance dérivé des plaquettes) et le récepteur KIT, comme l'imatinib ou le nilotinib, d'autre encore sur les récepteurs du VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) impliqué dans l'angiogenèse, comme le sunitinib et le sorafénib (Druker,1996 ; Moyer, 1997 ; Mendel, 2000 ; Ranson, 2004 ; Strumberg, 2005) (Figure1.5).

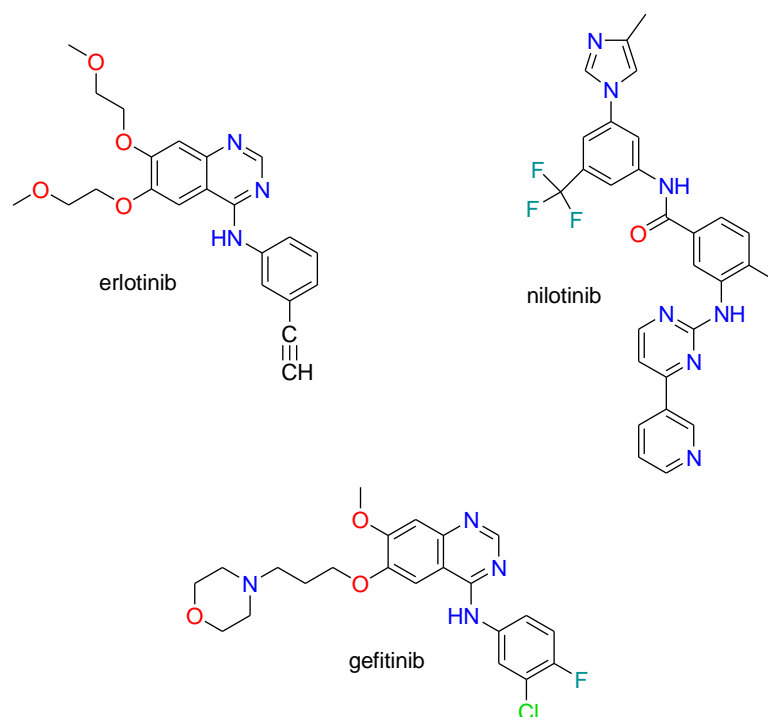


Figure 1.5: Structures chimiques de l'erlotinib, le nilotinib et le géfitinib.

- **Anti-aromatases**

L'aromatase est un complexe enzymatique essentiel dans la catalyse des androgènes en œstrogènes. Elle se situe au niveau du réticulum endoplasmique des cellules et est constituée de deux protéines. L'aromatase peut être trouvée dans de nombreux tissus comme le cerveau, le tissu adipeux, le placenta, les vaisseaux sanguins, la peau, les os, la muqueuse utérine ainsi que dans les tissus de l'endométriose, du léiomyome utérin et les testicules.

Les inhibiteurs de l'aromatase sont des médicaments qui interrompent la production d'aromatase ou qui en bloquent l'action, ce qui réduit le taux d'œstrogène. Il existe deux types d'inhibiteurs de l'aromatase utilisés dans le traitement des cancers notamment du cancer du sein : des inhibiteurs stéroïdiens irréversibles, comme l'exémestane (Aromasine®) qui forme une liaison covalente avec l'aromatase en l'inhibant de façon irréversible et des inhibiteurs non-stéroïdiens, qui inhibent la synthèse d'œstrogènes via une compétition réversible avec les autres substrats de l'aromatase tel que la létrozole (Figure 1.6).

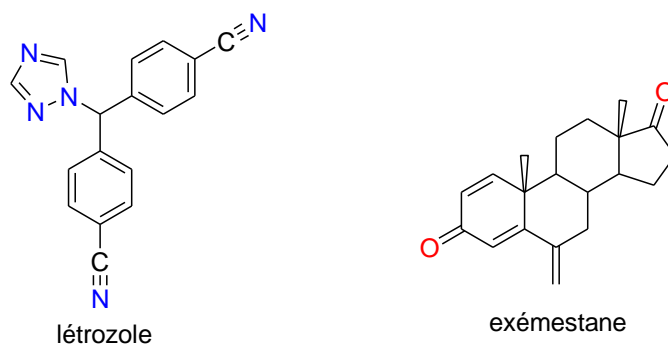


Figure 1.6: Structures chimiques de l'exémestane et la létrozole

- **Anti-estrogènes**

Les estrogènes ou les œstrogènes composent une famille d'hormones stéroïdiennes comprenant principalement l'œstrone (E1), l'œstradiol (E2) et l'oestriol (E3) sécrétée par l'ovaire, assurant la formation, le maintien et le fonctionnement des organes génitaux et des seins chez la femme. Certains œstrogènes sont également produits en petites quantités par d'autres tissus tels le foie, la surrénale, les seins et le tissu adipeux. Ces sources secondaires d'œstrogènes sont particulièrement importantes chez les femmes lors de la post-ménopause. Les œstrogènes jouent un rôle central dans la reproduction, féminine mais aussi masculine. Ils sont également impliqués dans le développement du système nerveux central et du système cardiovasculaire (Kuiper, 1997). Ils ont également des effets sur le foie et le tissu adipeux. Les

principaux récepteurs des œstrogènes sont des protéines intracellulaires appartenant à la famille des récepteurs nucléaires : il s'agit des récepteurs alpha ($ER\alpha$) et bêta ($ER\beta$) des œstrogènes (Jensen, 1962 ; Halding, 2007). Un troisième récepteur potentiel, appartenant à une autre famille (récepteur couplé aux protéines G), appelé GPER a récemment été décrit (Filardo, 2000 ; Prossnitz, 2011).

Les anti-œstrogènes sont des inhibiteurs compétitifs des œstrogènes (Figure1.7). Ils ne suppriment pas la sécrétion des œstrogènes, mais ils prennent leur place au niveau des récepteurs présents à la surface des cellules et bloquent ainsi leurs effets de stimulation sur les cellules cancéreuses (Cremoux, 2011).

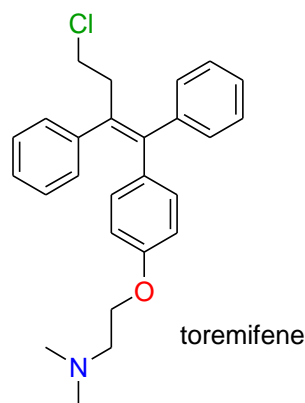


Figure 1.7: Structure chimique de la toremifene

- **Anti-androgènes**

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes sécrétées par les testicules, les ovaires ou les glandes surrénales, qui stimulent ou contrôlent le développement et le maintien des caractères physiques masculins en se liant aux récepteurs androgènes. Les androgènes comportent également les stéroïdes anabolisants d'origine (Dohle, 2003). Ils sont aussi les précurseurs de tous les œstrogènes, les hormones sexuelles femelles et permettent notamment une croissance folliculaire ainsi que l'apparition des récepteurs à l'hormone lutéinisante chez la femme. Les deux androgènes les plus actifs sont la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT) (Deslypere, 1992).

Il existe deux types d'anti-androgènes : les anti-androgènes stéroïdiens comme l'acétate de cyprotérone (Androcur®) qui ont un double effet en diminuant le taux de testostérone et en bloquant les récepteurs androgènes ; les anti-androgènes non-stéroïdiens comme le Nilutamide (Anandron®), le Flutamide (Eulexine®) ou le Bicalutamide (Casodex®) qui inhibent la

translocation du récepteur protéique, du cytoplasme vers le noyau après fixation de l'hormone androgène (Figure 1.8).

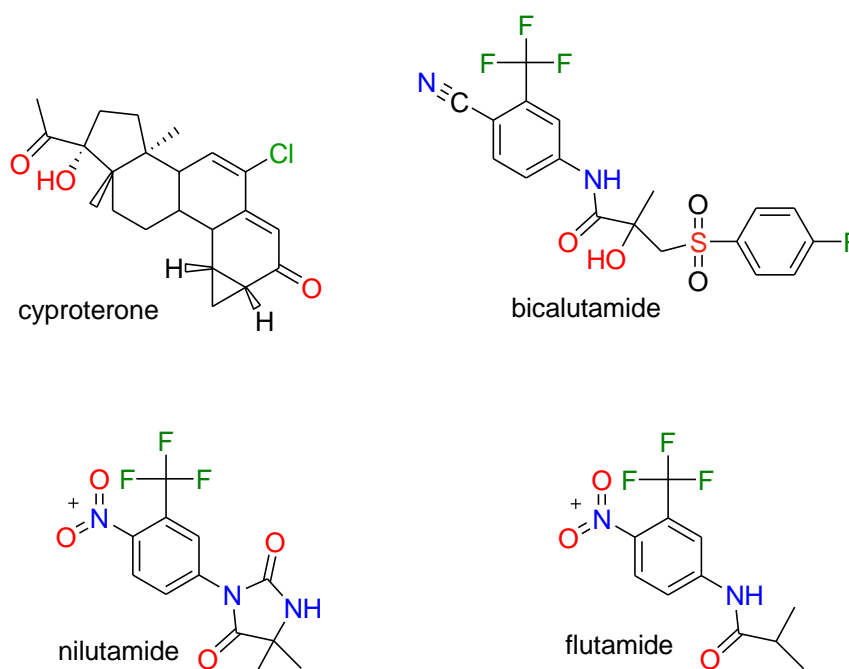


Figure 1.8: Structures chimiques de la cyprotérone, le flutamide, le nilutamide et le bicalutamide

1.3 ADN topoisomérases

1.3.1 Définition des ADN topoisomérases

L'existence des topoisomérases est directement liée à la structure de l'ADN qui se trouve sous la forme d'une entité fortement compliquée présentant un grand nombre de contraintes topologiques (entrecroisement, surenroulement, nœuds ...) lors de la réplication, les deux brins de la double hélice d'ADN ont besoin d'être séparés pour faire apparaître la fourche de réplication, ce qui entraîne l'augmentation de leur enroulement l'un autour de l'autre plus loin dans la molécule, cela provoque une résistance dans la molécule jusqu'à empêcher la progression de la fourche de réplication. De ce fait il apparaît que la régulation topologique de l'ADN est indispensable à la survie de la cellule et qu'elle nécessite la présence d'un système enzymatique permettant de résoudre les contraintes existantes sur l'ADN au cours de son métabolisme. Cette action de contrôle topologique est effectuée par des enzymes nucléaires : Les ADN topoisomérases ou topoisomérases, qui jouent un rôle essentiel dans le processus de croissance et de division cellulaire tels que : la transcription, la réplication, la recombinaison,

l'assemblage de la chromatine et la séparation des chromosomes (Pommier, 1998-1999-2016 ; Schoeffler, 2008 ; Wang, 1985-1991-1996-2002 ; Gatto, 1999 ; Wu, 1988). Elles effectuent des coupures transitoires et temporaires dans l'ADN pour y faire passer des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer (Champoux, 2001 – 2013 ; Wang, 1985).

1.3.2 Classification des ADN topoisomérase

Les topoisomérase sont des enzymes retrouvées chez l'ensemble des êtres vivants : les eucaryotes, les archaebactéries et les eubactéries (Champoux, 2001 ; Pommier, 2010). Elles sont classées en deux grandes familles, selon leur mécanisme d'action et de leur structure, les topoisomérase de type 1 et les topoisomérase de type 2 (tableau1).

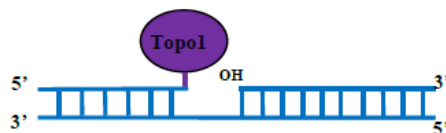
Tableau 1-1: Classification des topoisomérase selon l'origine et le mécanisme d'action

Superfamille	Topoisomérase	Espèces	Mécanisme d'action
IA	DNA Topoisomérase I bactérienne	<i>Esherichia coli</i>	Création de rupture simple brin (passage de brin)
	DNA Topoisomérase III bactérienne	<i>Esherichia coli</i>	
	DNA Topoisomérase III des levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	DNA Topoisomérase III α	Humaine	
	DNA Topoisomérase III β	Humaine	
	DNA Gyrase inverse bactérienne et archéale	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	
IB	DNA Gyrase inverse bactérienne	<i>Methanopyrus kandleri</i>	Création de rupture simple brin (rotation)
	DNA Topoisomérase I eucaryote	Humaine	
	DNA Topoisomérase poxvirus	<i>Vaccinia</i>	
IC	DNA Topoisomérase V bactérienne	<i>Methanopyrus Kandleri</i>	Création de rupture simple brin
	DNA Topoisomérase V archéale	<i>Methanopyrus Kandleri</i>	

IIA	DNA Gyrase bactérienne	<i>Esherichia coli</i>	Création de rupture double brins (passage de brin/ATPase)
	DNA Topoisomérase IV bactérienne	<i>Esherichia coli</i>	
	DNA Topoisomérase II de levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	DNA Topoisomérase II α	Humaine	
	DNA Topoisomérase II β	Humaine	
IIB	DNA Topoisomérase IV archéale	<i>Sulfolobus shibatae</i>	Création de rupture double brins

Les topoisomérases de type 1 produisent des coupures simple-brin et diminuent le surenroulement d'un tour par cycle de réaction catalytique (Champoux, 1978 ; Liu, 1989), alors que les topoisomérases de type 2 coupent simultanément les deux brins de l'ADN et enlèvent deux tours de surenroulement par cycle de réaction (Gellert, 1981 ; Sander, 1983 ; Wang, 1985) (Figure1.9).

Topoisomérase de type 1



Topoisomérase de type 2

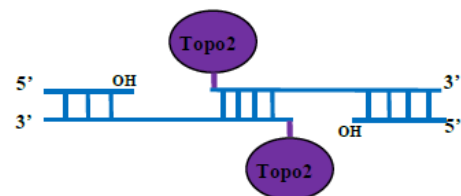


Figure 1.9: Mode de coupure de l'ADN par les différents types d'ADN Topoisomérases

1.3.3 Caractéristiques de l'ADN topoisomérase 1 humaine

La topoisomérase 1 humaine est une protéine nucléaire monomérique, d'un poids moléculaire d'environ 110 kDa, composée de 765 acides aminés et encodée par un gène localisé sur le chromosome 20q12-13.2 (Stewart, 1996 ; Redinbo, 1998 ; Champoux, 2005).

Elle est constituée de quatre régions majeures (Figure1.10) :

- Le domaine N-terminale contient 215 d'acides aminés, qui ne sont pas essentiels à l'activité de l'enzyme, mais contribuent à sa régulation par la présence de plusieurs sites

phosphorylés et de sites d'interaction avec d'autres nucléoprotéines (Stewart, 1997 ; Cretaio, 2007 ; Palle, 2008 ; Girstun, 2008).

- La région centrale se compose de 421 acides aminés, très conservée et indispensable à l'activité enzymatique. Cette région est sous-divisée en trois sous-régions impliquées dans la liaison de la top1 à l'ADN.
- La région de liaison de longueur variable relie le domaine catalytique à la région centrale, n'est pas nécessaire pour l'activité enzymatique, mais elle joue un rôle important dans la détection de la structure de l'ADN en aval du site de coupure par la top1 (Stewart, 1999 ; Ireton, 2000 ; Fiorani, 2003 ; Chillemi, 2004).
- Le domaine C-terminal, également appelé domaine catalytique, est constitué de 53 acides aminés, très conservé et contient la tyrosine catalytique de l'enzyme (Tyr273), qui est nécessaire au processus de clivage de l'ADN. (Champoux, 1981 ; Redinbo, 1998 ; Stewart, 1998).

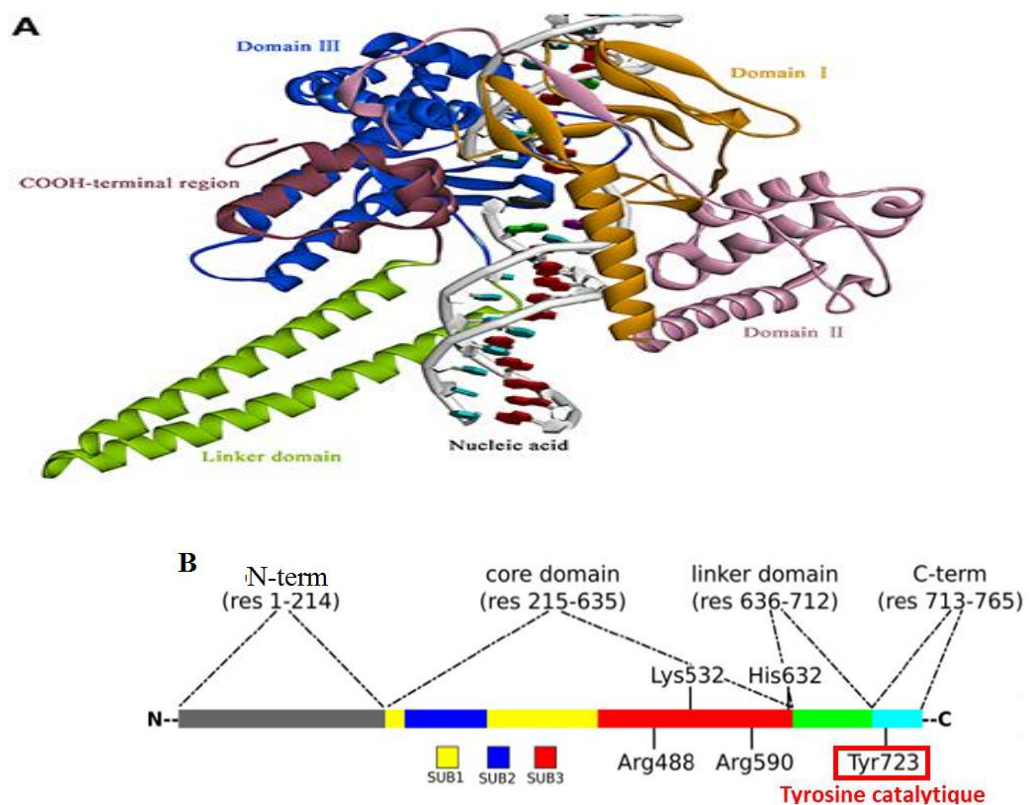


Figure 1.10: Schéma des domaines et structure 3D de la Topo1 humaine (A)Structure cristallographique du complexe Topo1-ADN (D'après Capranico, 2017). (B) Organisation des quatre domaines de la Topo1

1.3.4 Cycle catalytique de l'ADN topoisomérase 1 humaine

La topo1 humaine catalyse la relaxation de l'ADN par une succession de réactions de coupure et de religation de l'ADN surenroulé. Le cycle catalytique de l'enzyme est divisé en quatre étapes (Figure 1.11) :

- Etape de liaison de l'enzyme à l'ADN : dans cette étape l'enzyme se lie de manière non covalente à l'ADN double brin surenroulé positivement ou négativement (Been, 1984 ; Muller, 1985 ; Camilloni, 1988-1989 ; Krogh, 1991). Au moment de la liaison, la topo1 s'enveloppe autour de l'ADN en formant une pince (Redinbo, 1998).
- Etape de clivage de l'ADN : un brin de la double hélice est coupé par l'enzyme par une réaction de transestérification dans laquelle l'oxygène du groupement tyrosine 723 de l'enzyme est lié à l'extrémité 3'-phosphoryle de l'ADN et libère l'extrémité 5'hydroxyle pour générer la cassure du brin. Cette étape se fait sans hydrolyser l'ATP et forme un complexe covalent ADN-Topo1, appelé complexe de clivage (Champoux, 1981).
- Relaxation de l'ADN : le brin coupé effectue une rotation contrôlée (Stewart, 1998) autour du brin non coupé, ce qui permet la désérialisation de l'ADN surenroulé.
- Religation et libération de Topo1 : la religation se fait par une deuxième réaction de transestérification dans laquelle le groupement hydroxy du brin d'ADN clivé attaque le groupement phosphotyrosine et rejoint l'ADN clivé. Cette réaction permet de restaurer la continuité du brin d'ADN et de libérer l'enzyme de son substrat (Champoux, 1981).

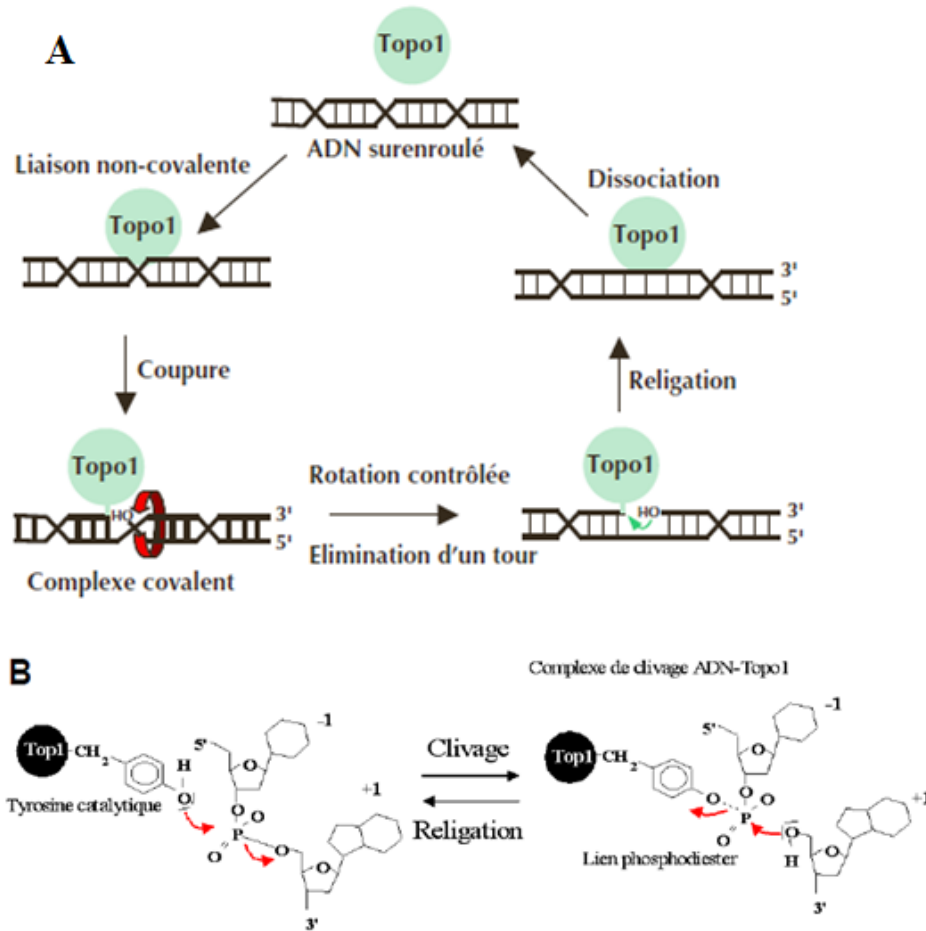


Figure 1.11: (A) cycle catalytique des topoisomérases de type1B (B) Réaction de trans-estérification entre la tyrosine 723 de la Topo1 humaine et l'extrémité 3'phosphorylée de l'ADN

1.3.5 Inhibiteurs de l'ADN Topoisomérase1 humaine

Les inhibiteurs de la Topo1 sont divisés en deux principaux groupes : les inhibiteurs catalytiques (les supprimeurs) et les poisons, ils inhibent tous les deux l'activité catalytique de l'enzyme, mais selon des modes d'actions différents.

- **Les inhibiteurs catalytiques** peuvent interagir avec l'enzyme libre ou avec l'ADN en empêchant la formation des complexes de clivage ADN-Topo1 (Figure1.12 (A)). Ils peuvent aussi inhiber la réaction de coupure de l'ADN (Boothman, 1989 ; Li, 1993). Actuellement ces inhibiteurs ne sont pas développés cliniquement.

- **Les poisons** agissent une fois que l'enzyme a coupé le brin d'ADN en stabilisant les complexes de clivage ADN-Topo1, en inhibant la religation des brins coupés et la libération de Topo1 (Figure 1.12 (B)) (Staker, 2002-2005).

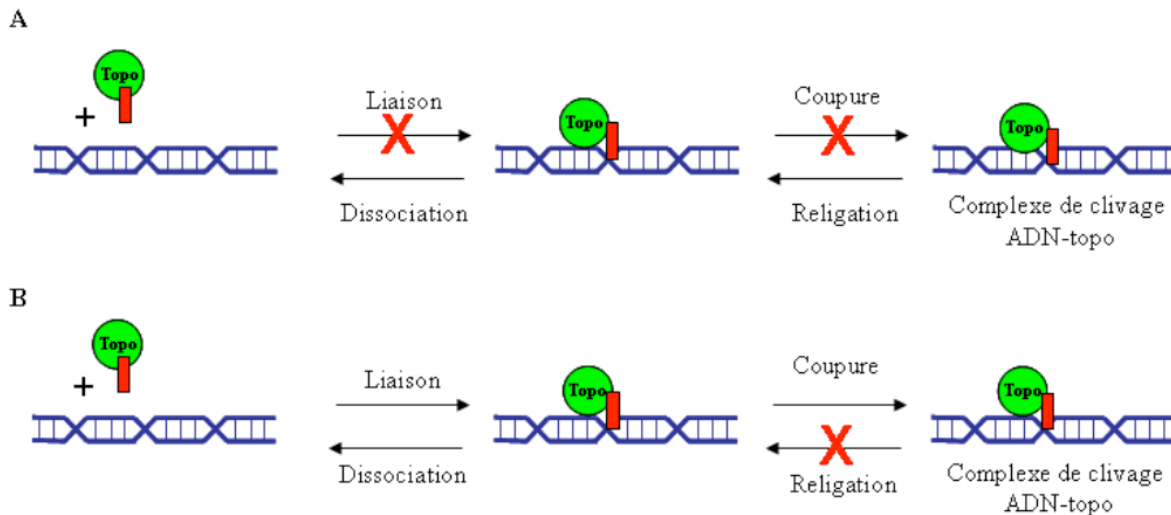


Figure 1.12: Mode d'action des deux types d'inhibiteurs de Topo1. (A) Les inhibiteurs catalytiques agissent en se fixant à l'enzyme et/ou à l'ADN et empêchent la fixation et/ou la coupure de l'ADN par la topo1. (B) Les poisons inhibent spécifiquement la religation de l'ADN.

1.3.5.1 Les inhibiteurs catalytiques

Les composés de ce groupe appartiennent à divers familles chimiques, l'exemple le plus connu est celui de la β - lapachone (Figure 1.13) qui est un composé naturel d'ortho-naphtoquinone, a été isolé de l'écorce de l'arbre lapacho en Amérique du Sud. Il inhibe l'activité catalytique de la Topo1 sans engendrer de complexes de clivage ADN-Topo1. La β -lapachone a une large gamme d'applications contre le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer du poumon, le cancer du pancréas, et aussi dans la leucémie. De plus la β - lapachone est souvent utilisée comme agent analgésique, anti-inflammatoire, antimicrobien et diurétique.

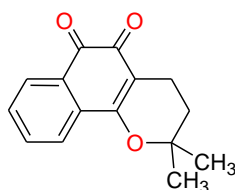


Figure 1.13: Structure chimique du β -lapachone

D'autres composés sont classés parmi ces inhibiteurs catalytique de Topo1, comme la corilagine, l'acide chebulagique, lavelutine, l'analogue de la tyrphostine AG-555, certains dérivés de la quercétine ou de dérivés de naphthoquinones comme la shiconine et quelques agents intercalants comme la doxorubicine (Wassermann, 1990), l'aclarubicine, les dérivés TAN-1518 A et B, ou le Hoechst 33258 (Beerman, 1992) (Figure 1.14).

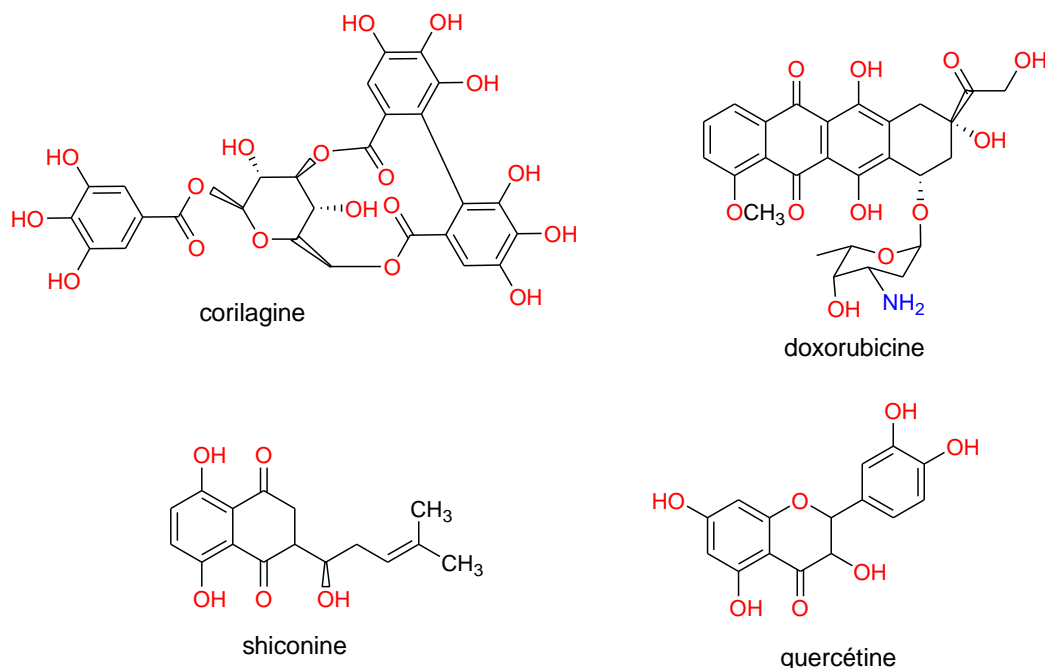


Figure 1.14: Structures chimiques de la corilagine, la doxorubicine, la shiconine et la quercétine

1.3.5.2 Les poisons

Deux grandes familles chimiques constituent les poisons de la Topo1, il s'agit des dérivés de la camptothécine et des indolocarbazoles de type rébeccamycine (pommier, 1998)

1.3.6 Camptothécine et ses dérivés

La camptothécine (CPT) est le premier poison de la Top1, isolé pour la première fois des feuilles et de l'écorce de la plante chinoise *Camptotheca acuminate* de la famille des Nyssaceae par Wall et ses collaborateurs en 1966 (Wall et al 1966) (Figure 1.15). Cette découverte résultait d'un vaste programme de criblage de produits naturels et leurs extraits alcooliques dans le but d'évaluer leur activité cancéreuse à l'Institut Nationale du Cancer (NCI). La CPT s'était révélée très efficace contre certaines tumeurs solides et antileucimiques. Ces résultats remarquables ont mené à des essais préliminaires sur des souris et encourage le

lancement rapide des essais cliniques (Creaven, 1972; Gottlieb 1970-1972; Moertel, 1972; Muggia, 1972).



Figure 11.15: Camptotheca acuminata

Cependant, la faible solubilité de la CPT ne permet pas son utilisation directe, c'est pourquoi une étude clinique a été menée sur la forme carboxylate correspondante, un dérivé plus soluble. Mais les tests ont été insatisfaisants et arrêtés en raison d'importants effets secondaires sévères et imprévisibles parmi lesquels des phénomènes de myélosuppression, des cystites hémorragiques, des vomissements et des diarrhées (Kehrer, 2001). En raison de ces résultats décourageants, la CPT n'a suscité qu'un intérêt marginal pendant une dizaine d'années. Mais dans les années 80, deux événements importants ont produit un regain d'attention pour cette famille de composés. En 1980, Wall et ses collaborateurs ont démontré que l'activité de la CPT était fortement dépendante du motif **lactonique** et que le carboxylate de sodium correspondant était dix fois moins actif. En 1985, l'équipe de Liu a découvert que la CPT agissait comme inhibiteur de la topoisomérase I et que sa cytotoxicité était liée à la formation de cassures de l'ADN (Hsiang, 1985 ; Eng, 1988).

Depuis, un grand nombre d'études ont permis d'identifier de nouveaux dérivés de la CPT plus actifs. Deux stratégies caractérisent des générations distinctes de ces dérivés. La première est développée au cours des années 90. Les substitutions des molécules sont effectuées aux niveaux des cycles A à D de la CPT et aboutissent à la mise sur le marché de l'irinotécan et le topotécan. Cette stratégie se poursuit activement et des molécules caractérisées par une fonction lactone préservée sont encore synthétisées. La seconde stratégie, initiée en 1996 sous

l'impulsion d'équipes françaises, concerne les molécules modifiées au niveau du cycle lactone E comme le gimatecan, le belotécan, l'exatecan, le luritecan et les homocamptothécines.

1.3.6.1 Structure chimique de la CPT

La CPT est une molécule plane composée de cinq cycles (A-E), constitué de trois éléments structuraux de base : un motif **pyrrolo [3'4-b]quinoléine** (cycles A, B et C), un motif **indolizine** (cycles C, D) et un cycle **σ -lactonique** (E) avec un carbone asymétrique en position 20 dont la configuration est cruciale pour l'activité de la molécule. Seul l'énantiomère 20S est actif (Figure1.16) (Mcphail, 1968).

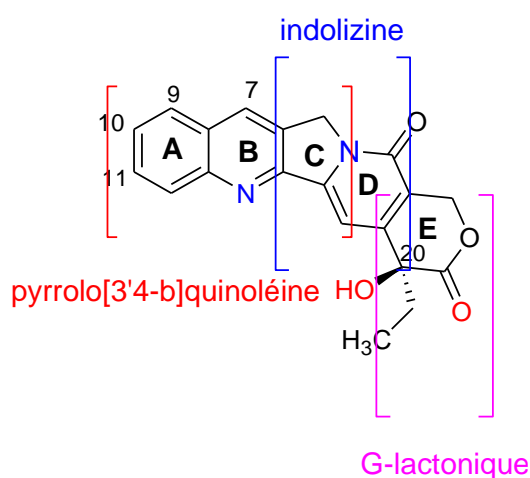


Figure 1.16: Structure chimique de la camptothécine

La CPT est insoluble dans l'eau et presque insoluble dans tous les solvants organiques, mais le diméthylsulfoxyde présente une solubilité modérée.

D'autre part, en raison de l'existence d'une forte liaison hydrogène entre l'oxygène du carbonyle de la lactone et l'hydrogène de l'hydroxyle tertiaire en C-20, le carbonyle du cycle E a une électrophilie élevée. Ainsi, en présence d'hydroxyde de sodium à température ambiante, la CPT est facilement hydrolysée pour conduire au carboxylate de sodium correspondant (Figure1.17) (Wall, 1966).

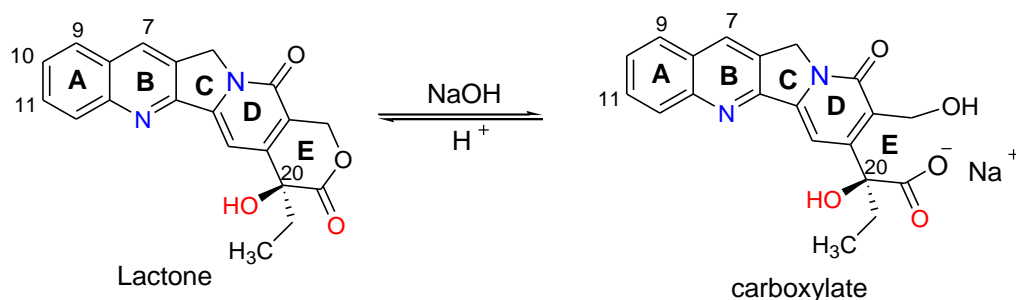


Figure 1.17: Ouverture du cycle lactonique en milieu basique

1.3.6.2 Quelques dérivés de la camptothécine

- **Topotécan**

Le topotécan, ou TPT est un dérivé semi-synthétique de la CPT, synthétisé pour la première fois par Kingsbury et al en 1991 (Kingsbury, 1991). La présence du groupement *N,N*-diéthylaminométhyle basique sur le carbone C-9 le rend plus soluble. Il stabilise le complexe ADN-topo1 à une concentration quatre fois supérieure à celle de la CPT et il est deux fois moins cytotoxique. Le topotécan est commercialisé sous le nom Hycamtin® et est utilisé pour traiter le cancer de l'ovaire métastatique, le cancer du poumon et le cancer du col de l'utérus (Garcia, 2002).

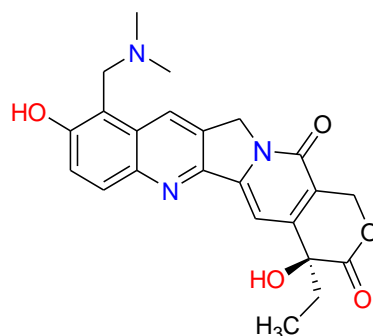


Figure 1.18: Structure chimique du topotécan

- **Irinotécan**

L'irinotécan, ou CPT-11 est un autre dérivé semi-synthétique de la CPT, synthétisé par yokokura en 1981 (yokokura, 1981). Ce composé est une prodrogue qui est transformé dans le foie en sa forme métabolique active (SN-38), par hydrolyse sous l'action de carboxylestérases (CES) et qui est de 250 à 1000 plus puissant *in vitro* que l'irinotécan. Il est administré sous le

nom Campto[®] dans le traitement des cancers colorectaux et le cancer de la prostate (Kaneda, 1990 ; Kawato, 1991 ; Satoh, 1994).

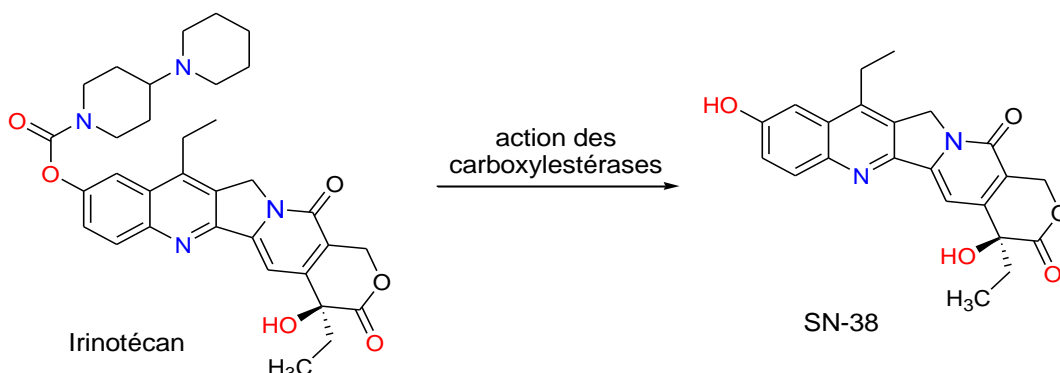


Figure 1.19: Conversion de l'irinotécan en SN-38 par estérification

- **Bélotécan**

Le bélotécan, ou CKD-602 est un analogue semi-synthétique de la CPT, synthétisé pour la première fois en 1996 par Jew et al (Jew, 1996). Il comporte un groupement isopropylaminoéthyle sur le carbone en position 7 qui lui confère une meilleure hydrosolubilité (Kim, 2002). Cette molécule a une activité trois fois plus puissante que le topotécan et elle est entrée en usage clinique en 2005. Le bélotécan est commercialisé sous le nom Camtobell[®] pour traiter le cancer du poumon, le cancer de l'ovaire et le cancer de l'utérus (Zamboni, 2009).

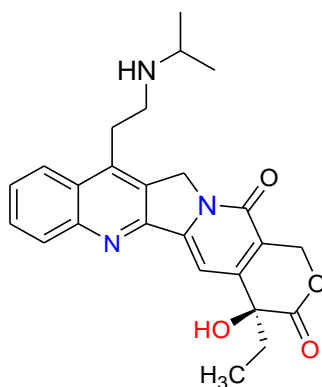


Figure 1.20: Structure chimique du belotécan

- **Lurtotécan**

Le lurtotécan est un analogue hydrosoluble semi-synthétique de la CPT, synthétisé pour la première fois en 1995 par Luzzio et al (Luzzio, 1995). Il comporte un groupe 4-

méthylpiperazinométhylène sur le carbone en 7 et une entité dioxolane sur les deux carbones en 10-11 et possède une puissance similaire à celle du Topotécan (Emerson, 1995). Des études précliniques ont démontré que la forme liposomale NX-211 du lurtotécan a un index thérapeutique supérieur à ceux du lurtotécan et du topotécan et elle est active dans plusieurs types de tumeurs dont le cancer de l’ovaire, le cancer du poumon et son profil de toxicité est semblable à celui du topotécan (Emerson, 2000 ;Loos, 2000).

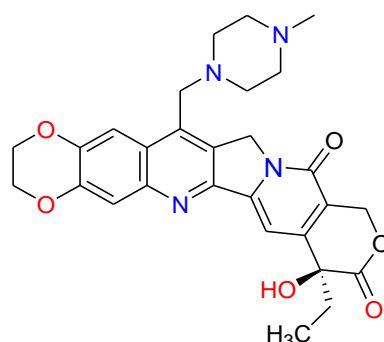


Figure 1.21: Structure chimique du lurtotécan

- **Exatécan**

L'exatécan est un analogue hexacyclique hydrosoluble de la CPT, synthétisé pour la première fois en 1995 par Mitsui et al (Mitsui, 1995) et développé par Daiichi Sankyo. Il a montré une activité plus forte que le TPT, SN-38 et la CPT elle-même (Mitsui, 1995 ; van Hattum, 2002). Des études cliniques de phase II sur une variété de tumeurs, incluant le cancer du colon, du sein, de l'estomac, des poumons et des ovaires, ont montré des effets toxiques secondaires ; la neutropénie étant la toxicité la plus fréquente (Mitsui, 1995 ; Takiguchi, 1997)

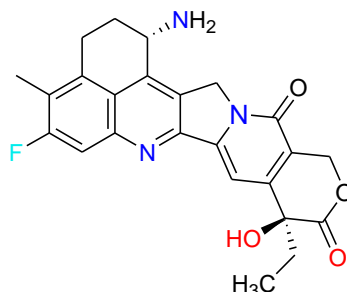


Figure 1.22: Structure chimique d'exatécan

- **Rubitécan**

Le Rubitécan, ou 9-nitroCPT est un autre dérivé de la CPT, préparé en 1986 par Wall et al (Wani, 1986). Des études précliniques ont montré la puissance de cette molécule sur une large gamme de tumeurs humaines telles que les tumeurs pulmonaires, colorectales, du sein, du pancréas, des ovaires, de la prostate, de l'estomac, du mélanome et de la leucémie (Stehlin, 1999 ;Giovanella, 2002). Cependant, ce succès préclinique prometteur n'a pas été suivi de résultats probants dans de petits essais de phase I/II contre un certain nombre de tumeurs solides (Baka, 2005 ; Patel, 2006 ; Chedid, 2006) à l'exception du cancer du pancréas (Burris, 2005).

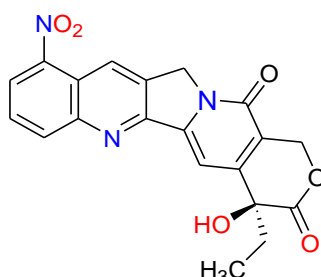


Figure 1.23: Structure chimique du rubitécan

- **Homocamptothécines**

L'homocamptothécine (hCPT ou BN80765) est un homologue de la CPT, synthétisé en 1997. Il a été développé par ajout d'un groupement méthylène entre le carbonyle et la fonction alcool du cycle E. Ce groupement renforce la stabilité en réduisant ainsi considérablement sa transformation en une forme carboxylate inactive. L'hCPT possède une activité biologique et présente une cytotoxicité supérieure à celle observée pour la CPT à l'encontre des cellules cancéreuses de sein, prostate, ovaire, côlon et leucémiques (Lavergne, 1998-1999-2000 ; Lesueur-Ginot, 1999;Demarquay, 2001).

Des essais cliniques qui ont été réalisés avec un dérivé bifluoré de cette famille, le diflomotécan ou BN80915 ont montré que l'efficacité de cet agent, était supérieure à celle du SN-38, l'irinotécan et le topotécan dans le traitement du cancer prostatique, du mélanome et du pancréas. Malheureusement, les essais cliniques de phase I et phase II n'ont pas permis à l'heure actuelle de trouver une indication pour cette molécule. L'élomotécan ou BN80927 est un deuxième dérivé de l'hCPT qui inhibe la Topo1 et la Topo2. Son efficacité a été montrée sur certaines tumeurs humaines mais elle est inférieure à celle du SN38 (Kroep, 2009).

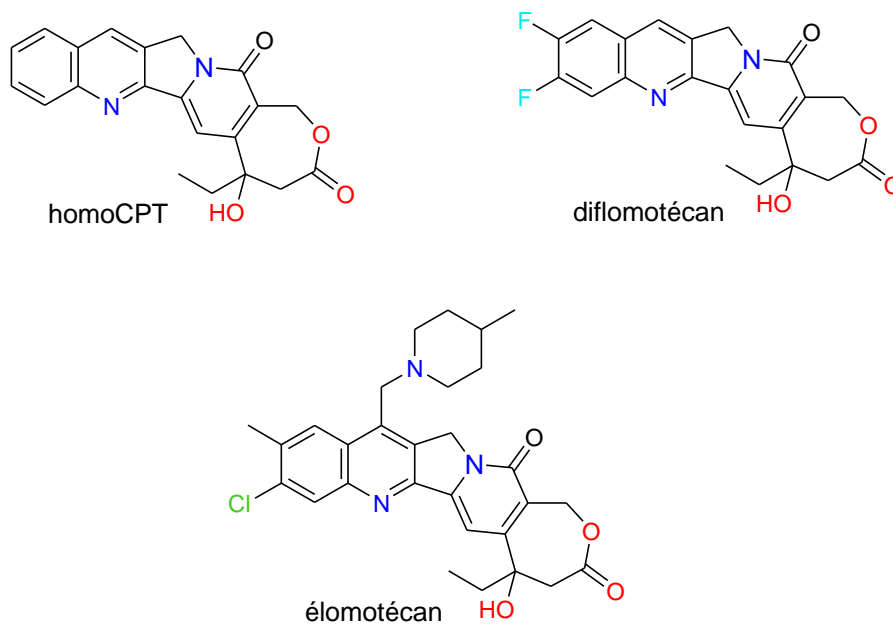


Figure 1.24: Structures chimiques de quelques dérivés de l'homocamptothécine

1.3.6.3 Mécanisme d'action de la camptothécine

La CPT est un inhibiteur non-compétitif de la topo1, son mécanisme d'action est divisé en trois étapes : (Figure1.25)

- (a) Formation et stabilisation d'un complexe ternaire « ADN-topo1-CPT » qui va empêcher ainsi le déplacement de la topo1 le long de la chaîne d'ADN (Hertzberg, 1989 ; Fan, 1998).
- (b) Les ADN polymérases se déplacent le long de la fourche de réplication et viennent ensuite percuter ce complexe en provoquant des dommages mortels à l'ADN (Hsiang, 1989 ; Tsao, 1992)
- (c) Le mécanisme de division est perturbé, ce qui conduit à la mort de la cellule (Liu, 2000).

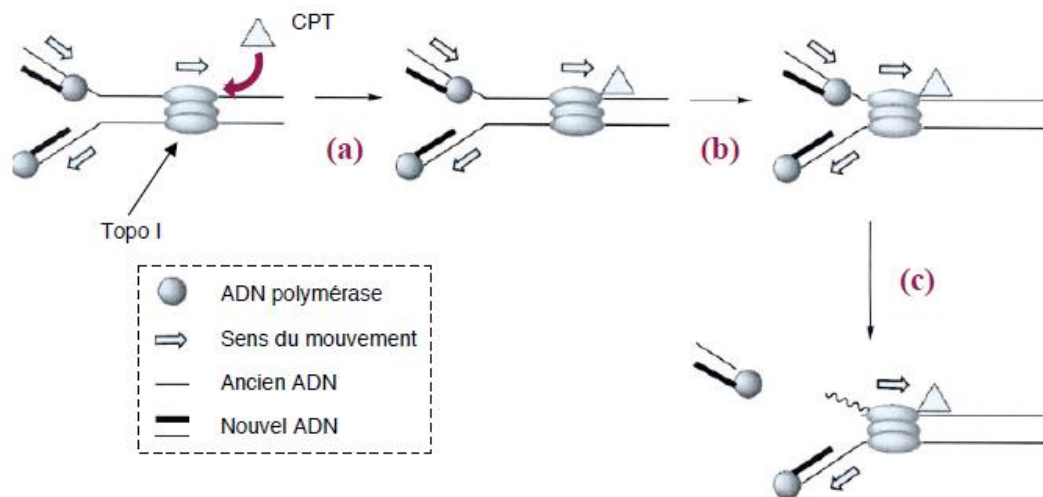


Figure 1.25: Mécanisme d'action de la camptothécine

1.3.6.4 Structure du complexe ternaire

La structure du complexe « ADN-topo1-CPT » a été largement étudiée par de différents modèles par docking: le modèle de Redinbo et al., 1998 puis le modèle proposé par Fan et al., en 1998 et enfin, celui de Laco et al., soumis au début de 2002 (Fan, 1998 ; Redinbo, 1998 ; Laco, 2002). Ensuite, Staker et ses collaborateurs ont proposé une structure cristalline d'un analogue de la camptothécine : topotécan (TPT) avec le complexe binaire ADN-enzyme par diffraction des rayons X. Deux structures cristallines ont été étudiées : une possédant la forme lactonique du TPT et l'autre dans sa forme ouverte. D'après la structure cristalline, l'insertion du TPT dans le site de clivage de l'ADN ne forme qu'une seule liaison hydrogène avec le résidu Asp533 de la protéine dans le cas de la forme lactone tandis que dans la forme ouverte, deux liaisons hydrogène sont formées avec les deux résidus Asn722 et Tyr723. De plus la liaison phosphodiester formée entre l'ADN et l'enzyme est stabilisée par des liaisons hydrogène entre Arg364 et Gly 363 (Figure1.26) (Staker, 2002).

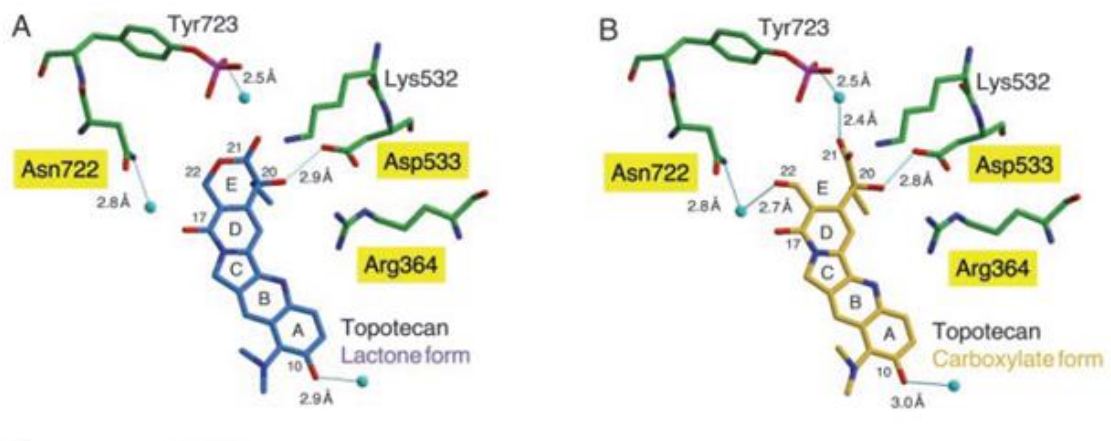


Figure 1.26: Interactions de TPT avec le complexe ADN-enzyme (TPT dans sa forme lactonique est représentée en bleu(A) alors que la forme ouverte est représentée en jaune(B))

La structure des rayons X de cristaux du complexe ternaire avec la CPT a été rapportée (Staker, 2005). L'étude révèle que la CPT s'intercale au niveau du site de clivage de l'ADN, ses interactions avec le complexe binaire sont similaires à celle réalisées par le TPT et forme deux liaisons hydrogène avec les deux résidus Asp533 et Arg364 (Figure 1.27).

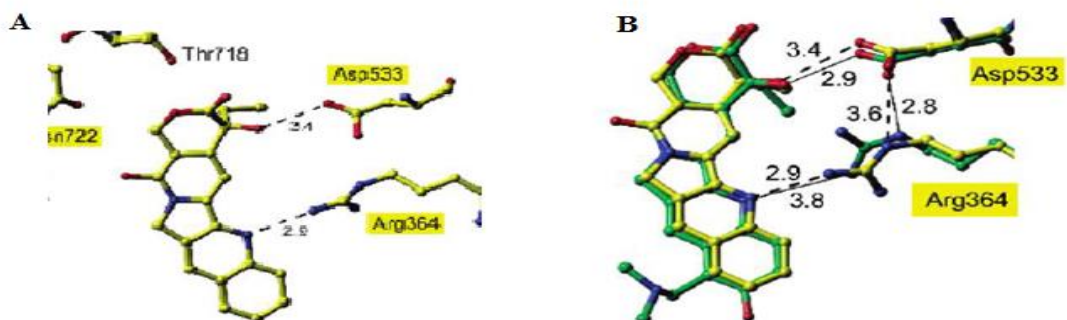


Figure 1.27: interactions de CPT avec le complexe ADN-enzyme ((A) montre les interactions de CPT avec le complexe ADN-enzyme, (B) montre les interactions de CPT avec le complexe ADN-enzyme, d'une part et entre l'ADN et TPT dans le complexe ternaire, d'autre part.

1.4 Conclusion

Le développement des anticancéreux est l'une des préoccupations des chercheurs puisqu'il s'agit de la lutte contre une maladie mortelle. L'objectif du traitement par ces médicaments est de s'opposer à la prolifération des cellules cancéreuses par la destruction des cellules malignes dont la croissance spontanée ne connaît pas de limites, ou stopper cette croissance. Parmi les divers agents thérapeutiques cités précédemment, les inhibiteurs des topoisomérases attire davantage notre attention. En effet, les nombreux rôles exécutés par les topoisomérases en font des cibles privilégiées de certains médicaments qui ont été utilisés comme anticancéreux et qui agissent en inhibant l'activité de ces enzymes. Ceci révèle l'importance d'approfondir la recherche sur ces topoisomérases en passant par une meilleure connaissance de leur mécanisme d'action afin de contribuer à la conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme.

1.5 Références Bibliographiques

Alison, M.R. (2007) “The Cancer Handbook”, 2nd edition, John Wiley and Sons, Inc, New York, pp.307-315.

Been, M.D. and Champoux, J. J. (1984) “Breakage of Single-Stranded DNA by Eukaryotic Type I Topoisomerase Occurs Only at Regions with the Potential for Base-Pairing.”, *Journal of Molecular Biology*, 180 (3), pp. 515–31.

Bocchinfuso, W.P., Korach, K.S. (1997) “Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice”, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2(4), pp. 323-334.

Boothman, D.A., Trask, D.K., and Pardee, A.B. (1989) “Inhibition of Potentially Lethal DNA Damage Repair in Human Tumor Cells by Beta-Lapachone, an Activator of Topoisomerase I”, *Cancer Research*, 49 (3), pp. 605–12.

Brueggemeier, R., Hackett, J.C., Diaz-Cruz, E.S. (2005) “Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer”, *Endocrine Reviews*, 26, pp. 331-345.

Camilloni, G., Martino, E. Di, Mauro, E. Di., and Caserta, M. (1989) “Regulation of the Function of Eukaryotic DNA Topoisomerase I: Topological Conditions for Inactivity”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (9), pp. 3080–84.

Camilloni, G., Martino, E.Di., Caserta, M., and Mauro, E. Di. (1988) “Eukaryotic DNA topoisomerase I reaction is topology dependent”, *Nucleic acids research*, 16, pp. 7071-7085.

Capranico, G., Marinello, J. and Chillemi, G. (2017) “Type I DNA Topoisomerases”, *Journal of medicinal chemistry*, 60, pp. 2169-2192.

Champoux, J.J. (1978) “Mechanism of the reaction catalysed by the DNA untwisting enzyme : attachment of the enzyme to 3'-terminus of the nicked DNA”, *J Mol Biol*, 118, pp. 441- 446.

Champoux, J.J. (1981) “DNA Is Linked to the Rat Liver DNA Nicking-Closing Enzyme by a Phosphodiester Bond to Tyrosine”, *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (10), pp. 4805–9.

Champoux, J.J. (2001) “DNA topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism”, *Annual Review of Biochemistry*, 70, pp. 369–413.

Champoux, J.J. (2013) “DNA Topoisomerases: Type I”, *Molecular Biology*, pp. 157-162.

Chillemi, G., Redinbo, M., Bruselles, A. and Desideri, A. (2004) “Role of the Linker Domain and the 203-214 N-terminal residues in the human topoisomerase I DNA complex dynamics”, *Biophysical Journal*, 87 (6), pp. 4087–4097.

Creaven, P.J., Allen, L.M. and Muggia, F.M. (1972) “Plasma camptothecin (NSC-100880) levels during a 5-day course of treatment: relation to dose and toxicity”, *Cancer chemotherapy reports*, 56, pp.573-578.

Cremoux, P. (2011) “Hormonothérapie des cancers du sein”, *Bull Cancer*, 98, pp. 1311-1319.

Cretaio, E., Luca, P., Yari, F., Piero, B., and Carmen, L. (2007) “Human DNA Topoisomerase IB: Structure and Functions”, *The Italian Journal of Biochemistry*, 56 (2), pp. 91–102.

Demarquay, D., huchet, M., coulomb, H., lesueur-ginot, L., lavergne, O., kasprzyk, P.G., bailly, C., camara, J., bigo, D.C.H. (2001) "The homocamptothecin BN80915 is highly potent orally active topoisomerase I poison", *anti-cancer drugs*, 12(1), pp. 9-19.

Deslypere, J.P., Young, M., Wilson, J.D. and McPhaul, M.J. (1992) "Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene", *Mol Cell Endocrinol*, 88, pp. 15-22.

Dohle, G.R., Smit, M. and Weber, R.F. (2003) "Androgens and male fertility", *World J Urol*, 21, pp.341-345.

Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, Fanning, G.M., S., Zimmermann, J., Lydon, N.B. (1996) "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells", *Nat Med*, 2(5),pp. 561-566.

Emerson, D.L., Bendele, R., Brown, E., Chiang, S., Desjardins, J.P., Dihel, L.C., Gill, S.C., Hamilton, M., Leray, J.D., Moon-Mcdermott, L., Moynihan, K., Richardson, F.C., Tomkinson, B., Luzzio, M.J. and Baccanari, D. (2000) "Antitumor efficacy, pharmacokinetics and biodistribution of NX211: a low-clearance liposomal formulation of lurtotecan", *Clin Cancer Res*,6, pp. 2903-2912.

Emerson, D.L., Besterman, J.M., Brown, H.R., Evans, M.G., Leitner, P.P, Luzzio, M.J., Shaffer, J.E., Sternbach, D.D., Uehling, D., Vuong, A. (1995) "In vivo Antitumor activity of two new seven-substituted water-soluble camptothecin analogues", *Cancer Res*, 55(3), pp. 603-609.

Eng, W.K., Faucette, L., Johnson, R.K. and Sternglanz, R. (1988) "Evidence That DNA Topoisomerase I Is Necessary for the Cytotoxic Effects of Camptothecin" ,*Molecular Pharmacology*, 34 (6), pp. 755-760.

Fan ,Y., Weinstein, J.N., Kohn ,K.W., Shi, L.M., Pommier, Y. (1998)" Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin", *J. Med. Chem*, 41(13), pp. 2216-2226.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I. and Frackelton, A.R. (2000) "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF", *Mol. Endocrinol*, 14, pp. 1649-1660.

Fiorani, P., Alessandro, B., Mattia, F., Giovanni, C., Alessandro, D., and Piero, B. (2003) "Single Mutation in the Linker Domain Confers Protein Flexibility and Camptothecin Resistance to Human Topoisomerase I", *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (44),pp. 43268-43275.

Garcia-Carbonero, R., Supko, J.G., (2002) "Current perspectives on the clinical experience, pharmacology and continued development of the camptothecins" *Clin Cancer Res*, 8(3), pp. 641-661.

Garner, R.C. (1998) "The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402, pp. 67-75.

Gellert, M. (1981) "DNA topoisomerases", *Annu Rev Biochem*, 50, pp. 879-910.

Girstun, A., Barbara, K.L., Alicja, C., Magdalena, K., and Krzysztof, S. (2008) "Fragment Responsible for Translocation in the N-Terminal Domain of Human Topoisomerase I", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366 (1), pp. 250–57.

Gooren, L.J., Toorians, A.W. (2003) "Significance of oestrogens in male (patho) physiology", *Annales d'endocrinology*, 64(2), pp. 126-135.

Gottlieb, J.A. and Luce, J.K. (1972) "Treatment of malignant melanoma with camptothecin (NSC-100880)", *Cancer chemotherapy reports*, 56, pp. 103-105.

Gottlieb, J.A., Guarino, A.M., Call, J.B., Oliverio, V.T. and Block, J.B. (1970) "Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880)", *Cancer chemotherapy reports*, 54, pp. 461-470.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) "The hallmarks of cancer", *Cell*, 100(1), pp. 57-70.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) "The hallmarks of cancer: The next generation", *Cell*, 144(5), pp. 646-674.

Hanahan, D., Coussens, L.M. (2012) "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment", *Cancer cell*, 21(3), pp. 309-322.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Treuter, A., Warner, M., Gustafsson, J.A. (2007) "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets", *Physiol. Rev*, 87(3), pp. 905–931.

Hertzberg, R.P., Caranfa, M.J., Hecht, S.M. (1989) "On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DANN complex", *Biochemistry*, 28(11), pp. 4629-4638.

Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S. and Liu, L. F. (1985) "Camptothecin Induces Protein-Linked DNA Breaks via Mammalian DNA Topoisomerase I", *Journal of Biological Chemistry*, 260 (27), pp. 14873–14878.

Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., Liu, L.F. (1989) " Arrest of replication forks by drug-stabilised topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin", *Cancer Res*, 49(18), pp. 5077-5082.

Ireton, G.C., Stewart, L., Parker, L.H. and Champoux J. J. (2000) "Expression of Human Topoisomerase I with a Partial Deletion of the Linker Region Yields Monomeric and Dimeric Enzymes That Respond Differently to Camptothecin", *The Journal of Biological Chemistry* 275 (33), pp. 25820–25830.

Jensen, E.V. (1962) "On the mechanism of estrogen action", *Perspect. Biol. Med*, 6(1), pp.47–60.

Kaneda, N., Nagata, H., Furuta, T., Yokokura, T. (1990) "Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse", *Cancer Res*, 50(6), pp. 1715-1720.

Kawato, Y., Aonuma, M., Hirota, Y., Kuga, H., Sato, K. (1991) "Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11", *Cancer Res*, 51(16), pp. 4187-4191.

Kehrer, D.F.S., Soepenber, O., Loos, W.J., Verweij, J., Sparreboom, A. (2001) "Modulation of camptothecin analogs in the treatment of cancer", *Anti-cancer Drugs*, 12, pp. 89-105.

Kim, J.H., Lee, S.K., Lim, J.L., Shin, H.J., Hong, C.I. (2002) "Reformulations studies of a novel camptothecin anticancer agent, CKD-602: physicochemical characterization and hydrolytic equilibrium kinetics", *Int. J. Pharm*, 239(1-2), pp. 207-211.

Kingsbury, W.D., Boehm, J.C., Jakas, D.R., Holden, K.G., Hecht, S.M., Gallagher, G., Caranfa, M.J., McCabe, F.L., Faucette, L.F., Johnson, R.K., Hertzberg, R.P. (1991) "Synthesis of water-soluble (aminoalkyl) camptothecin analogs: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity", *J. Med. Chem*, 34(1), pp. 98-107.

Kroep, J.R. and Gelderblom, H. (2009) "Diflomotecan, a promising homocamptothecin for cancer therapy", *Expert opinion on investigational drugs*, 18, pp. 69-75.

Krogh, S., Mortensen, U.H., Westergaard, O. and Bonven, B.J. (1991) "Eukaryotic topoisomerase I-DNA interaction is stabilized by helix curvature", *Nucleic acids research*, 19, pp.1235-1241.

Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1997) "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta", *Endocrinology*, 138, pp. 863-70.

L. Stewart, M. R. Redinbo, X. Qiu, W. G. Hol, and J. J. Champoux (1998) "A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I", *Science*, 279 (5356), pp. 1534-1541.

L. Stewart, G. C. Ireton and J. J. Champoux (1999) "A Functional Linker in Human Topoisomerase I Is Required for Maximum Sensitivity to Camptothecin in a DNA Relaxation Assay", *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (46), pp. 32950-32960.

Laco, G.S., Collins, J.R., Luke, B.T., Kroth, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Pommier, Y. (2002) "Human topoisomerase I inhibition: docking camptothecin and derivatives into a structure-based active site model", *Biochemistry*, 41(5), pp. 1428-1435.

Lavergne, O., D. Demarquay, C. Bailly, C. Lanco, A. Rolland, M. Huchet, H. Coulomb, N. Muller, N. Baroggi, J. Camara, C. L. Breton, E. Manginot, J.B. Cazaux, D.C.H. Bigg (2000) "Topoisomerase I-mediated antiproliferative activity of enantiomerically purefluorinated homocamptothecins", *J. Med. Chem*, 43(11), pp.2285-2289;

Lavergne, O., harnett, J., Rolland, A., lanco, C., lesueur-ginot, L., demarquay, D., huchet, M., coulomb, H., bigg, D.C.H. (1999) "BN80927: a novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase II", *bioorg med chem lett*, 9(17), pp. 2599-2602.

Lavergne, O., Lesueur-Ginot, L., Pla Rodas, F., Kasprzyk, P.G., Pommier, J.J., Demarquay, D., Prevost, G., Ulibarri, G., Rolland, A., Schiano-Liberatore, A.M., Harnett, J., Pons, D., Camara, J., Bigg, D.C.H. (1998) "Homocamptothecins: synthesis and antitumor activity of novel E-ring-modified camptothecin analogues", *J. Med. Chem*, 41(27), pp.5410-5419.

Lee, J.H., Lee, J.M., Kim, J.K., Ahn, S.K., Lee, S.J., Kim, M.Y., Jew, S.S., Park, J.G., Hong, C. (1998) "Antitumor activity of 7-[2-(N-isopropylamino) ethyl]-(20S)-camptothecin, CKD-602, as a potent DNA topoisomerase I inhibitor", *Arch. Pharmacol Res*, 21(5), pp. 581-590.

lesuer-ginot, L., demarquay, D., kiss, R., kasprzky, P., dassonville, L., bailly, C., camara, J., lavergne, O., bigg, D.C.H. (1999) "homocamptothecin, an e-ring modified camptothecin with enhanced lactone stability, retains topoisomerase I-targeted activity and antitumor properties", *cancer res*, pp. 2939-2944.

Li, C.J., Averboukh, L. and Pardee, A.B. (1993) "Beta-Lapachone, a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor with a Mode of Action Different from Camptothecin", *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (30), pp. 22463–22468.

Liu, L.F. (1989) "DNA topoisomerases poisons as antitumor drugs", *Annu Rev Biochem*, 58, pp. 351-375.

Liu, L.F., Desai, S.D., Li, T.K., Mao, Y., Sun, M., Sim, S.P. (2000) "Mechanism of action of camptothecin", *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 922(1), pp. 1-10.

Loos, W.J., Kehrer, D., Brouwer, E., Verweij, J., Bruijn, P., Hamilton, M., Gill, S., Nooter, K., Stoter, G. and Sparreboom, A. (2000) "Liposomal lurtotecan (NX211): determination of total drug levels in human plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 738, pp. 155-163.

Luzzio, M.J., Besterman, J.M., Emerson, D.L., Evans, M.G., Lackey, K., Leitner, P.L., G., McIntyre, Morton, B., Myers, P.L., Peel, M., Sisco, J.M., Sternbach, D.D., Tong, W.Q., Truesdale, A., Uehling, D.E., Vuong, A., Yates, J. (1995) "Synthesis and antitumor activity of novel water soluble derivatives of camptothecin as specific inhibitors of topoisomerase I", *J. Med. Chem*, 38(3), pp. 395-401.

Mcphail, A.T., Sim, G.A. (1968) "The structure of camptothecin: X-ray analysis of camptothecin iodoacetate", *J. Chem. Soc*, pp. 923-928.

Mendel, D.B., Schreck, R.E., West, D.C., Li, G., Strawn, L.M., Tanciongco, S.S., Vasile, S., Shawver, L.K., Cherrington, J.M. (2000) "The angiogenesis inhibitor SU5416 has long-lasting effects on vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and function", *Clin Cancer Res*, 6(12), pp. 4848-4858.

Mitsui, I., Kumazawa, E., Hirota, Y., Aonuma, M., Sugimori, M., Ohsuki, S., Uoto, K., Ejima, A., Terasawa, H., Sato, K. (1995) "A new water-soluble camptothecin derivative, DX-8951f, exhibits potent antitumor activity against human tumors *in vitro* and *in vivo*", *Cancer Sci*, 86(8), pp.776-782.

Moertel, C.G., Schutt, A.J., Reitemeier, R.J. and Hahn, R.G. (1972) "Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer", *Cancer chemotherapy reports*, 56, pp. 95-101.

Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., Diorio, C., Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., Neveu, M., Miller P. (1997) "Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase", *Cancer Res*, 57(21), pp. 4838-4848.

Muggia, F.M., Creaven, P.J., Hansen, H.H., Cohen, M.H. and Selawry, O.S. (1972) "Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies", *Cancer chemotherapy reports*, 56, pp. 515-521.

Muller, M.T. (1985) “Quantitation of Eukaryotic Topoisomerase I Reactivity with DNA Preferential Cleavage of Supercoiled DNA”, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 824 (3), pp. 263–267.

Palle, K., Luca, P., Marié, V. D. M., Carmen, L., Piero, B., and Mary, A. B. (2008) “Disulfide Cross-Links Reveal Conserved Features of DNA Topoisomerase I Architecture and a Role for the N Terminus in Clamp Closure”, *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (41), pp. 27767–27775.

Pommier, Y. (1998) “Diversity of DNA Topoisomerases I and Inhibitors”, *Biochimie*, 80 (3), pp. 255–270.

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H.L. and Marchand, C. (2010) “DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs”, *Chemistry & Biology*, 17 (5), pp. 421–433.

Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y. and Strumberg, D. (1998) “Mechanism of Action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme”, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1400 (1-3), pp. 83–106.

Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S.N. and J.L. Nitiss (2016) “Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, pp. 703–721.

Prendergast, C.G., Metz, R. and Muller, A. J. (2010) “Towards a genetic definition of cancer-associated inflammation role of the IDO pathway”, *American Journal of Pathology*, 176 (5), pp. 2082–2087.

Prossnitz, E.R. and Barton, M. (2011) “The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease”, *Nat. Rev. Endocrino*, 7, pp.715–726.

Ranson, M. (2004) “Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors”, *Br J Cancer*, 90, pp. 2250–2255.

Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J. and Hol, W. G. (1998) “Crystal Structures of Human Topoisomerase I in Covalent and Noncovalent Complexes with DNA”, *Science*, 279 (5356), pp. 1504–1513.

Sander, M. and Hsieh, T. (1983) “Double strand DNA cleavage by II DNA topoisomerases from *Drosophila melanogaster*”, *J Biol Chem*, 258, pp.8421–8428.

Santella, R.M., Gammon, M., Terry, M., Senie, R., Shen, J., Kennedy, D., Agrawal, M., Faraglia, B. and Zhang, F. (2005) “DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592(1-2), pp. 29–35.

Satoh, T., Hosokawa, M., Atsumi, R., Suzuki, W., Hakusui, H., Nagai, E. (1994) “Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase”, *Biol. Pharm. Bull*, 17(5), pp. 662–664.

Sawada, S., Matsuoka, S., Nagata, H., Furuta, T., Yokokura, T., Miyasaka, T. (1991) “Synthesis and antitumor activity of 20(S)-camptothecin derivatives: A-ring modified and 7,10-disubstituted camptothecins”, *Chem. Pharm. Bull*, 39, pp.3183–3188.

Sawada, S., Yokokura, T., Miyasaka, T. (1996) "Synthesis of CPT-11 (irinotecan hydrochloride trihydrate)", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 803, pp. 13–28.

Schoeffler, A.J. and Berger, J.M. (2008) "DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology", *Quarterly reviews of biophysics*, 41, pp. 41-101.

Staker ,B.L., Feese, M.D., Cushman, M., Pommier, Y., Zembower, D., Stewart, L. and Burgin, A.B. (2005) "Structure of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex", *Journal of medicinal chemistry*, 48, pp. 2336-2345.

Staker, B.L., Hjerrild, K., Feese, M.D., Behnke, C.A., Burgin, A.B. and Stewart, L. (2002) "The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99(24), pp. 15387-15392.

Stehlin, J.S. , Giovanella, B.C. , Natelson, E.A.N., Ipolyi, P.D.D., Coil, D., Davis, B., Wolk, D., Wallace, P., Trojacek, A. (1999) "A study of 9-nitrocamptothecin (RFS-2000) in patients with advanced pancreatic cancer", *Int J Oncol* 14(5), pp.821-32

Stewart, L., Ireton, G.C. and Champoux, J.J. (1996) "The domain organization of human topoisomerase I", *Journal of biological chemistry*, 271, pp. 7602-7608.

Stewart, L., Ireton, G.C. and Champoux, J.J. (1997) "Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation", *Journal of molecular biology*, 269, pp. 355-372.

Strumberg, D., Richly, H., Hilger, R.A., Schleucher, N., Korfee, S., Tewes, M., Faghieh, M., Brendel, E., Voliotis, D., Seeber, S. (2005) "Phase I clinical and pharmacokinetic study of the novel raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors", *J Clin Oncol*, 23(5) , pp. 965-972.

Takiguchi, S., Kumazawa, E., Shimazoe, T., Tohgo, A. and Kono, A. (1997) "Antitumor effect of DX-8951, a novel camptothecin analog, on human pancreatic tumor cells and their CPT-11 resistant variants cultured in vitro and xenografted into nude mice", *Jpn J Cancer Res*, 88, pp.760-769.

Thurston, D.E. (2007) "Chemistry and pharmacology of anticancer drugs" second edition, Boca Raton, Fla, CRC London , Taylor & Francis (distributor).

Tsao, Y.P., D'Arpa, P., Liu, L.F. (1992) "The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G₂ arrest: altered regulation of p34^{cdc2}/cyclinB", *Cancer Res*, 52(7), pp. 1823-1829.

Tubiana, M. (2008) "Généralités sur la cancérogenèse ", *Comptes. Rendus. Biologies*, 331(2), pp. 114–125.

Van Hattum, A.H., Pinedo, H.M., Schlüper, H.M.M., Erkelens, C.A.M., Tohgo, A., Boven, E. (2002) "The activity profile of the hexacyclic camptothecin derivative DX-8951f in experimental human colon cancer and ovarian cancer", *Biochem.Pharmacol*, 64(8), pp.1267-1277.

Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T. and Sim, G.A. (1966) "Plant Antitumor Agents. I. The isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal

Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*1,2”, *Journal of the American Chemical Society*, 88, pp.3888-3890.

Wang, J.C. (1985) “DNA Topoisomerases”, *Annual Review of Biochemistry*, 54, pp. 665–697.

Wang, J.C. (1991) “DNA Topoisomerases: Why so Many?”, *Journal of Biological Chemistry*, 266 (11), pp. 6659–6662.

Wang, J.C. (1996) “DNA Topoisomerases”, *Annual Review of Biochemistry*, 65, pp. 635–692.

Wang, J.C. (2002) “Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective”, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3 (6), pp. 430–440.

Wani, M.C., Nicholas, A.W., Wall, M.E. (1986) “Plant antitumor agents.23.synthesis and antileukemic activity of camptothecin analogs”, *J. Med. Chem*, 29(11), pp. 2358-2363

Zamboni, W.C., Ramalingam, S., Friedland, D.M., Edwards, R.P., Stoller, R.G., Strychor, S., Maruca, L., Zamboni, B.A., Belani, C.P., Ramanathan, R.K. (2009) “Phase I and pharmacokinetic study of pegylated liposomal CKD-602 in patients with advanced malignancies”, *Clin. Cancer Res*, 15(4), pp. 1466-1472.

Chapitre 2

Modélisation des interactions protéine-ligand par Docking moléculaire

2.1	Introduction	43
2.2	Définition du docking moléculaire	43
2.3	Types de docking	43
2.3.1	Le docking rigide	44
2.3.2	Le docking semi-flexible	44
2.3.3	Le docking flexible	44
2.4	Principe du docking moléculaire	44
2.4.1	Représentation du système	45
2.4.2	Les algorithmes de recherche	46
2.4.2.1	Les méthodes de recherche conformationnelle	47
2.4.2.2	Les méthodes par fragmentation	47
2.4.2.3	Les méthodes des bases de données	47
2.4.2.4	Les méthodes aléatoires	48
2.4.2.5	Les méthodes de simulation	50
2.4.3	Processus de score	50
2.4.3.1	Principe	50
2.4.3.2	Famille de fonctions de score	50
2.5	Molegro Virtual Docker (logiciel de docking moléculaire utilisé dans l'étude)	52
2.5.1	L'algorithme de recherche implémentée dans MVD	52
2.5.1.1	MolDock Optimizer	52
2.5.1.2	L'algorithme MolDock SE (Simplex Evolution)	54
2.5.1.3	L'algorithme Simplex Itéré	55
2.5.2	Fonction Score	55
2.5.2.1	Moldock Score	55
2.5.2.2	Plant Score	58
2.6	Les principales classes d'interaction	59
2.6.1	Les interactions électrostatiques	59
2.6.2	Liaison hydrogène	59
2.6.3	Les interactions de Van Der Waals	61
2.6.4	Interactions hydrophobes	62
2.7	Conclusion	63
2.8	Références bibliographiques	64

2.1 Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre deux molécules. De même, la découverte de nouveaux médicaments activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom de "amarrage" ou "Docking" moléculaire ont été développées. Le docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir d'une combinaison de plusieurs molécules, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales. Le docking moléculaire est très utile en biologie, pharmacie et médecine, où la plupart des principes actifs sont de petites molécules appelées ligands qui interagissent avec une cible biologique macromoléculaire d'intérêt thérapeutique, généralement un acide nucléique ou une protéine désigné par le terme récepteur.

Dans ce chapitre, nous abordons la définition du docking moléculaire en mentionnant son principe et ses types ainsi que les algorithmes et les fonctions de score misent en œuvre. Nous présenterons le logiciel Molegro Virtual Docker utilisé dans notre étude, avec plus de détails.

2.2 Définition du docking moléculaire

Le docking ou amarrage moléculaire est une simulation informatique d'un ligand candidat se liant à un récepteur. Cette méthode prédit l'orientation, la conformation et la position d'une molécule vers une autre molécule lorsqu'elle est liée l'une à l'autre pour former un complexe stable (Lengauer, 1996 ; Yu, 2010). Les résultats obtenus à partir de cette technique peuvent être utilisés pour analyser la force d'association ou l'affinité de liaison entre deux molécules. Le plus souvent, le récepteur est une protéine qui possède un ou plusieurs sites actifs spécifiques, plus ou moins accessibles selon les cas. Le ligand est généralement une molécule flexible de petite taille. (Corbeil, 2007).

2.3 Types de docking

Il existe trois types de docking moléculaire

2.3.1 Le docking rigide

Il consiste à obtenir l'orientation et la conformation privilégiée d'un système en considérant que la protéine et le ligand sont une entité complètement rigide. Par conséquent, seuls les degrés de liberté translationnels et rotationnels du ligand par rapport au récepteur sont examinés. Le docking rigide est souvent utilisé pour l'amarrage entre deux macromolécules (docking protéine-protéine ou protéine/acide nucléique) pour lesquelles les degrés de liberté sont importants pour réaliser un échantillonnage conformationnel efficace dans un temps de calcul raisonnable (Friesner, 2004 ; Nicklaus, 1995)

2.3.2 Le docking semi-flexible

Il est généralement utilisé pour l'amarrage protéine-ligand, le ligand est considéré comme flexible et le récepteur reste rigide. Ainsi, l'échantillonnage des degrés de liberté du ligand s'ajoutent aux explorations translationnelles et rotationnelles. Ce type de docking repose sur l'hypothèse de base que la conformation du récepteur utilisée est capable de reconnaître le ligand. De nombreuses études utilisant le docking semi-flexible ont montré que cette stratégie conduit à des résultats plus précis (Kuntz, 1982 ; Miller, 1994).

2.3.3 Le docking flexible

Il traite à la fois la flexibilité du ligand et du récepteur. Les degrés de liberté conformationnels de ce dernier peuvent être limités à certaines chaînes latérales ou des mouvements plus larges peuvent également être envisagés, impliquant par exemple les différents arrangements possibles d'une protéine. Ce type de docking représente une approche plus réaliste en considérant des modèles de liaison du ligand au récepteur de type "ajustement induit" et/ou "sélection conformationnelle". D'autre part, l'exploration de l'ensemble des degrés de liberté du ligand et du récepteur implique des difficultés importantes liées à l'utilisation efficace du temps de calcul nécessaire pour le docking flexible (Ewing, 2001 ; Rarey, 1996 ; Welch, 1996 ; Sousa, 2006 ; Yuriev, 20011)

2.4 Principe du docking moléculaire

La plupart des logiciels de docking développés à l'heure actuelle se décomposent en trois étapes principales: la première consiste à présenter le système moléculaire, la seconde consiste à procéder un algorithme de recherche, grâce auquel l'espace conformationnel de chacune des

molécules est exploré et la troisième permet d'évaluer l'énergie de formation du complexe par la fonction de score (HUANG, 2010).

2.4.1 Représentation du système

Le choix de la représentation du système correspond à la façon d'engendrer un ensemble de poses d'un ligand dans le site actif de la protéine. Il existe trois façons de représenter le système moléculaire par exemple les représentations par atomes, par surface ou par grille (Halperin, 2002).

- La représentation atomique est très complexe, elle utilise à une fonction d'énergie potentielle classique de la mécanique moléculaire (Halperin, 2002) et n'intervient que dans le stade final du processus de recherche pour affiner et calculer l'énergie du système sans trop de dépense informatique (Burnett, 2000). Il existe plusieurs programmes de docking qui utilisent cette représentation comme exemple logiciel DARWIN (DARWIN, 2000) et le logiciel de dynamique moléculaire CHARMM (Brooks, 1983)
- La deuxième représentation est très répandue dans les logiciels de docking. Elle représente les molécules par une surface qui prend en compte différentes caractéristiques géométriques. La surface proposée par Connolly en 1983 est composée des rayons de van der Waals des atomes exposés reliés par un réseau de surfaces concaves ou convexes (Connolly, 1985 ; Shoichet, 1992) (Figure 2.1). Une recherche conformationnelle par complémentarité de surface est alors effectuée jusqu'à trouver les affinités min et max (Norel, 1994 ; 1999).

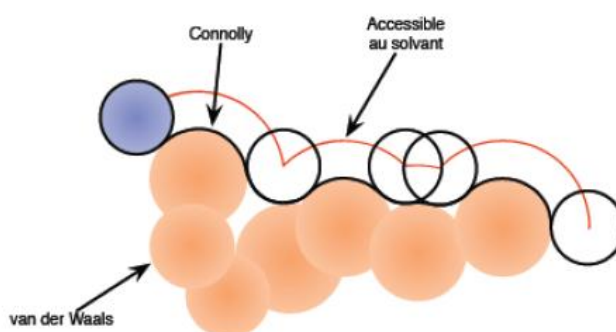


Figure 2.1: Illustration d'une surface de Connolly. La surface de Connolly est représentée en noir et la surface accessible au solvant, en rouge. En bleu, la balle d'eau virtuelle. Couleur orange, les différents atomes de la molécule. (Dréo, 2003)

- La représentation du système par une grille est également une approche largement utilisée. Elle a été présentée par Goodford en 1985 et est basée sur le choix d'une grille tridimensionnelle, représentant les interactions électrostatiques, Van der Waals et hydrophobes, qui ne doivent être évaluées que durant l'étape de score. (Dréo, 2003)

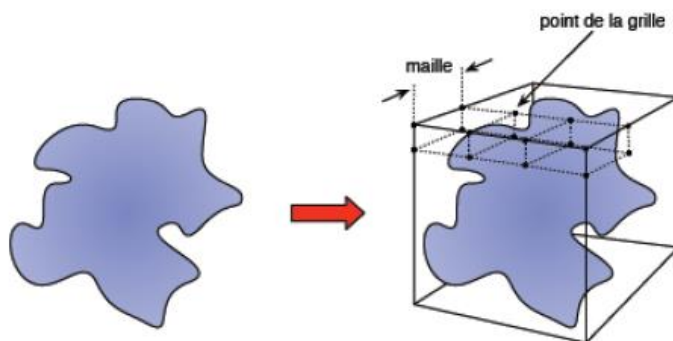


Figure 2.2: Projection d'une molécule dans une grille tridimensionnelle

2.4.2 Les algorithmes de recherche

Les algorithmes de recherche sont employés pour trouver et sélectionner les géométries possibles pour le complexe en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine. Ils peuvent également être utilisés pour échantillonner les conformations, positions et orientations (appelés poses), en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables au sein du site actif d'une cible enzymatique avec une énergie libre totale acceptable. Les ligands flexibles subissent plusieurs opérations de symétrie (translation, rotation et torsion) afin de trouver leur emplacement idéal dans le site actif d'une protéine que l'on considère rigide.

Il existe deux approches pour le traitement de la flexibilité du ligand (Brooijmans, 2003)

- La recherche et le test de toutes les conformations possibles de l'espace du ligand.
- Une recherche supplémentaire dans l'espace conformationnel.

La première regroupe toutes les méthodes de recherche systématiques qui cherchent l'investigation de tous les degrés de liberté d'un ligand, on trouve à titre d'exemple :

2.4.2.1 Les méthodes de recherche conformationnelle

Les liaisons covalentes du ligand reçoivent une rotation de 0 à 360° avec un incrément fixe, jusqu'à ce que toutes les combinaisons d'angles (conformations) autorisées soient échantillonnées. L'inconvénient de cette méthode est le risque d'avoir une explosion de calcul à cause de l'augmentation du nombre de combinaisons avec le nombre de liaisons.

2.4.2.2 Les méthodes par fragmentation

Au départ le ligand est décomposé en fragments rigides et flexibles. Ensuite une première partie rigide est placée au sein du site actif et mise en interaction avec le récepteur puis les parties flexibles sont attachées d'une façon consécutive en exploitant les angles de torsion et de manière à prévenir une explosion combinatoire (Figure 2.3). Cette méthode est la plus étendue dans les logiciels de docking comme :FlexX, Surflex, ADAM, LUDI et Dock (Kuntz, 1982 ; Miteva, 2005).

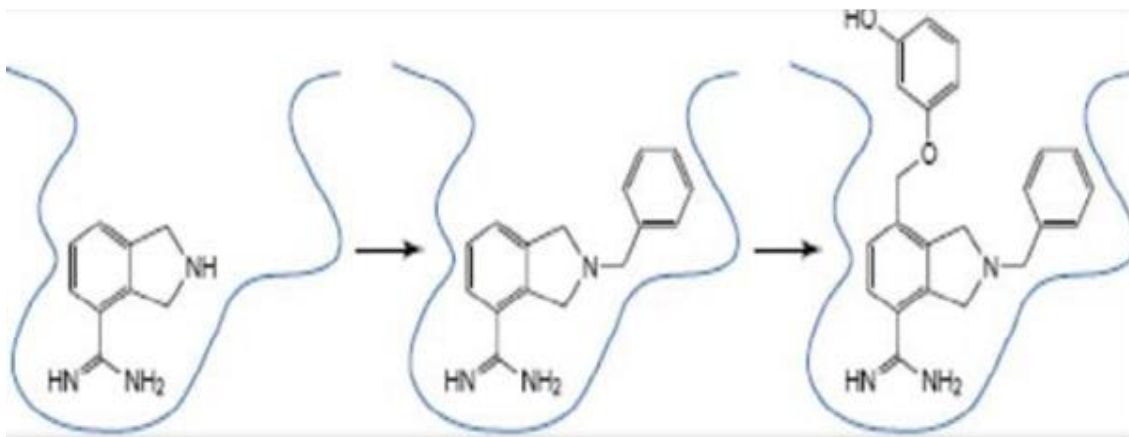


Figure 2.3: Construction par fragmentation d'un ligand au sein d'un récepteur

2.4.2.3 Les méthodes des bases de données

Plusieurs programmes procèdent la recherche conformationnelle par un appel à une base de données de conformations par molécule qui sont ensuite amarrées de manière rigide pour éviter le problème d'explosion combinatoire. Le logiciel FLOG utilise cette méthode.

La seconde approche comprend deux types de méthodes :

2.4.2.4 Les méthodes aléatoires

Ces méthodes consistent à effectuer des changements aléatoires dans la structure tridimensionnelle du ligand, généralement il s'agit de modifier le degré de liberté du ligand.

On distingue trois principales classes de méthodes aléatoires : les méthodes de Monte Carlo, les méthodes évolutionnaires basées sur des algorithmes génétiques et les méthodes de recherche de tabou (Huang, 2010).

- **Les algorithmes de Monte Carlo**

Les algorithmes de Monte Carlo entraînent aléatoirement des changements sur le ligand, qui peuvent être la perturbation d'une longueur de liaison, d'un angle, d'un angle dièdre ou alors le changement des coordonnées cartésiennes d'un atome ou d'un groupe d'atomes. La pose obtenue par ces transformations est testée avec un critère de Métropolis permettant d'accepter ou rejeter cette pose qui est associée à une fonction de probabilité. Le principe général de la méthode de Monte Carlo-Métropolis (Metropolis , 1949) peut être décrit de la manière suivante :

- Des changements sont appliqués à une pose initiale d'énergie E_0 de manière à obtenir une nouvelle pose d'énergie E_1 .
- Si $E_1 < E_0$, la nouvelle pose est alors acceptée et une nouvelle itération peut déclencher
- Si $E_1 \geq E_0$, donc une probabilité d'acceptation P est calculée par cette équation :

$$P = e^{-\frac{E_1 - E_0}{kT}} \quad \text{eq(1)}$$

Où k représente la constante de Boltzman et T la température.

- Si P est supérieure à une valeur tirée aléatoirement et comprise entre 0 et 1, alors la nouvelle pose est acceptée, sinon elle est rejetée et l'ancienne pose est gardée. Ensuite le programme engendrera les prochaines poses jusqu'à ce que la quantité prédéterminée de poses soit collectée (Abagyan , 1994 ; Liu, 1999 ; Zauhar, 2003).

- **Les méthodes évolutionnaires**

les algorithmes génétiques sont les plus courants des approches évolutionnaires, leur but est d'obtenir une approximation de résolution de problèmes par un mécanisme d'optimisation (Mitchell, 1996). Les algorithmes génétiques utilisent des techniques dérivées de la science génétique et de l'évolution naturelle de Charles Darwin : la sélection, la mutation et le croisement tout en cherchant à améliorer une fonction objective. Dans le programme de docking une population initiale aléatoire de poses (solutions) d'un seul ligand est définie et les degrés de liberté à explorer sont assimilés à un ensemble de gènes. L'échantillonnage de l'espace se fait ensuite par les opérations génétiques sur la population soit de manière ponctuelle (mutation), soit en échangeant deux groupes de variables (croisement), formant une nouvelle génération de poses. La sélection des individus générés est basée sur leur capacité d'adaptation à l'environnement, ils sont évalués par une fonction de score et les meilleures sont conservées.

Bien que d'une grande efficacité, les algorithmes génétiques appliqués au docking ont parfois tendance à sélectionner des minima locaux. Pour pallier ce problème, une solution consiste à répéter un même calcul plusieurs fois afin de maximiser les chances d'obtenir au moins un résultat satisfaisant (structure proche du minimum global) en fin de processus. Les programmes de docking les plus connus adaptant un algorithme génétique sont AutoDock (Morris, 1998), GOLD (Jones, 1997) et DARWIN (Taylor, 2000).

- **Les méthodes de Tabou**

Ces méthodes sont parmi les méthodes méta-heuristiques générales développées dans le domaine de l'optimisation combinatoire. Elles consistent en effet en un ensemble de règles et de mécanismes généraux qui ont comme fonction de contrôler et de guider une heuristique interne, dans lesquels de nouveaux états sont aléatoirement générés à partir d'un état premier désigné sous le nom de « la solution courante ». Ces nouvelles solutions sont alors scorées et classées dans un ordre croissant. La meilleure solution est choisie en tant que nouvelle solution courante, puis le même traitement est répété.

Ces méthodes exploitent la notion de mémoire. Elles consistent à garder la trace du cheminement passé du processus de recherche dans une ou des mémoires et à se servir de cette information afin d'en orienter le déroulement futur. L'exemple de logiciels de docking moléculaire qui utilisent la recherche Tabou est le PRO LEADS (Soriano, 1997 ; Glover, 1997 ; Baxter, 1998).

2.4.2.5 Les méthodes de simulation

Les méthodes de simulation reposent sur la dynamique moléculaire et la minimisation d'énergie. La minimisation d'énergie est essentiellement utilisée pour optimiser la géométrie d'un système en l'amenant dans un minimum d'énergie. Elle est fréquemment utilisée dans les programmes de docking moléculaire en combinaison avec d'autres méthodes de recherche car elle ne permet d'atteindre que de minima locaux.

La dynamique moléculaire permet de simuler l'évolution d'un système moléculaire au cours du temps dans des conditions thermodynamiques (température, pression et volume). Cette approche admet donc une modélisation plus réaliste, elle peut traiter les molécules d'eau ainsi que l'ensemble des degrés de liberté du système, aussi bien ceux du ligand, de la protéine et du solvant. Les temps de calculs sont plus coûteux et ils sont réalisés sur une durée suffisamment longue pour dépasser des barrières énergétiques très élevées, en réduisant l'exploration de l'espace possible des poses. La dynamique moléculaire est en conséquence, comme la minimisation, la plus souvent utilisée avec d'autres approches de docking, particulièrement pour évaluer la stabilité de poses et/ou les affiner (Brooijmans,2003; Yu , 2018 ; Rastelli, 2009).

2.4.3 Processus de score

2.4.3.1 Principe

Les fonctions de score sont des formules mathématiques utilisées pour évaluer une énergie d'interaction entre un récepteur et un ligand. Dans une approche de docking réalisée pour prédire leur mode d'interaction, les fonctions de score doivent être capables de distinguer, parmi un ensemble varié de poses, celles qui sont adéquates. D'autre part, elles doivent aussi être capables d'identifier quels sont ceux qui peuvent réellement s'y lier et les classer selon leur affinité respective et elles doivent être calculées rapidement pour pouvoir cribler des bases de données de grande taille (Dias, 2008).

2.4.3.2 Famille de fonctions de score

Les fonctions de score peuvent être classées en quatre grandes catégories : les fonctions de score basées sur un champ de force, les fonctions empiriques, les fonctions reposant sur des potentiels statistiques et les fonctions basées sur des techniques d'apprentissage automatique (Kitchen, 2004).

- **Fonctions de score basées sur un champ de force**

Les fonctions d'un champ de force correspondent à des formalismes mathématiques qui sont assimilés à des paramètres puis utilisés pour calculer plusieurs types d'énergie potentielle. Parmi ces paramètres : la masse des atomes, leur charge, leur rayon de van der Waals ainsi que les longueurs de liaisons interatomiques (liaisons hydrogène) et d'angles plans et dièdres. Ces paramètres sont souvent dérivés d'expériences ou de simulations quantiques généralement effectuées sur de petites molécules organiques. Les fonctions de score du programme de docking DOCK, Autodock, GOLD et G-Score (Weiner, 1986 ; Brooks, 1983 ; Kuntz, 1982) sont des exemples de ce type de fonction de score.

- **Fonctions de score empiriques**

Les fonctions de score empiriques estiment l'affinité des complexes protéine-ligand en fonction du nombre d'interactions dans le système récepteur-ligand, tels que le nombre de liaisons hydrogène, les contacts hydrophobes, les contacts hydrophiles, et parfois les contributions entropiques. La plupart des programmes de Docking utilisent ce type de fonction de score témoignant de leur efficacité de point de vue rapidité et précision. Cependant, le principal inconvénient de ces fonctions empiriques est leur forte dépendance aux données utilisées pour les calibrer. Elles sont utilisées dans la plupart des algorithmes de docking notamment **FlexX** (Stahl, 2001), **Chemscore** (Eldridge, 1997) et **LUDI** (Rarey, 1996 ; Muegge, 2001 ; Bohm, 1992 ; Meng, 2011).

- **Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based »**

Ces fonctions dérivent de données statistiques obtenues par l'analyse expérimentale des fréquences d'interaction entre atomes au sein de complexes protéine-ligand. (Sousa, 2006 ; Holloway, 1995). Elles ne peuvent modéliser que les interactions qui existent dans leurs bases de données expérimentales. Le PLP (Piecewise Linear Potential) est l'un des potentiels les plus simples, basé sur quatre types d'atomes et prend en compte les interactions stériques, les liaisons hydrogènes et les distances interatomiques sont prises en compte en dessous de 5 Å (Boehm, 1994). Les fonctions de score type knowledge-based ont été utilisées avec succès dans des études de docking de différentes cibles protéiques et ont montré une certaine amélioration dans la prédiction des modes de liaison et le classement des complexes protéine-ligand par rapport aux fonctions de score empiriques et celles basées sur le champ de force (Perez, 1998).

- **Fonctions de score consensus**

Les fonctions de score consensus combinent les informations obtenues à partir des autres différentes fonctions de scores (Charifson, 1999). Plusieurs stratégies ont été employées et ont montré une amélioration dans la prédiction du mode de liaison, de l'affinité et même dans l'identification de ligands qui peuvent se lier au récepteur lors des criblages virtuels (Bissantz, 2000; Chaput, 2017; Ericksen, 2017; Kaserer, 2015). MultiScore (Terp, 2001) et XCScore (Wang, 2002 ; Schneider,2002) sont deux exemples de fonctions de score consensus.

2.5 Molegro Virtual Docker (logiciel de docking moléculaire utilisé dans l'étude)

Le nombre de programme de docking actuellement disponibles est élevé et n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies. Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons utilisé le programme Molegro Virtuel Docker V.06.

Le Molegro Virtuel Docker (MVD) est un logiciel performant qui permet la prévision des interactions enzyme-ligand. Il réalise automatiquement toutes les étapes du processus et offre un amarrage de haute qualité. Il utilise une technique d'optimisation basée sur la rentabilité et la productivité.

2.5.1 L'algorithme de recherche implémentée dans MVD

Le programme Molegro Virtuel Docker (MVD) dispose de trois algorithmes de recherche. Ces algorithmes sont : MolDock optimizer, MolDock SE (MSE), et Iterated Simplex (Simplex).

2.5.1.1 MolDock Optimizer

L'algorithme de recherche Moldock Optimizer intégré dans le logiciel Molegro Virtuel Docker est basé sur la famille des algorithmes évolutionnaires (Michalewicz 1992 ; 2000). Ces algorithmes sont des techniques d'optimisation inspirés de la théorie de l'évolution Darwinienne (Figure 2.4).

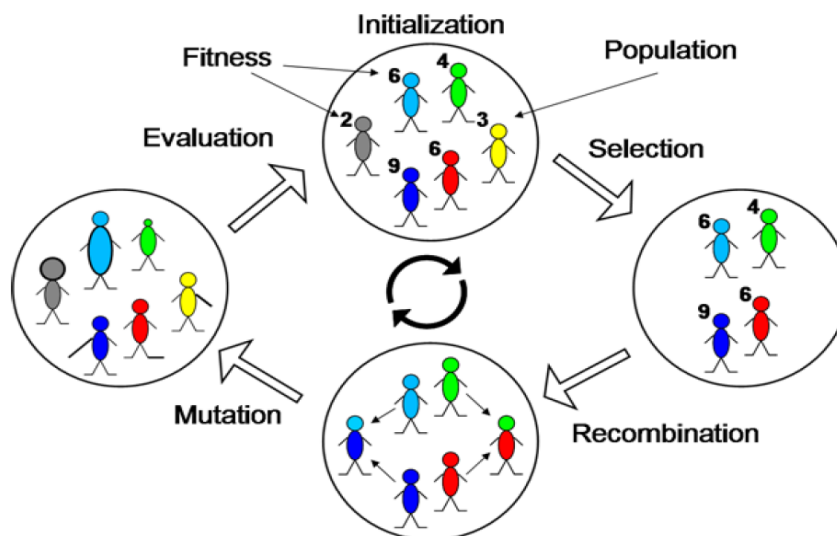


Figure 2.4: Principe de l'algorithme évolutionnaire différentiel de MVD

Les algorithmes évolutionnaires sont simplifiés et composés des étapes suivantes :

- 1- Création de la population des solutions (représente dans le docking moléculaire les poses du complexe Ligand-Protéine)
- 2- Génération des nouvelles solutions à partir de la population initiale à travers les opérations de croisement et mutation entre les solutions de la population initiale. Les solutions nouvellement créés sont appelés des enfants (*Offspring*).
- 3- A chaque itération, l'ensemble de solutions est évalué à l'aide d'une fonction d'évaluation.

L'algorithme de recherche Moldcok Optimizer est basé sur une variante des algorithmes évolutionnaires connue sous le nom algorithme évolutionnaire différentiel (AED) introduit par Storn et Price en 1995 (Storn, 1995). La principale idée innovante dans l'algorithme AED est de générer *Offspring* à partir d'une différence pondérée de solutions parentes et fonctionne comme suit :

- 1- Initialisation de la population des solutions leur évaluation par la fonction de score (fonction d'évaluation).
- 2- Pour chaque individu (solution=pose), un enfant est généré par l'addition d'une différence pondérée des solutions parentes aléatoirement sélectionnées.

- 3- L'enfant remplace la solution (la pose) parent si et seulement si plus adéquat, sinon, la solution parent maintient et passe à la génération suivante (itération).

De plus, l'algorithme AED exploite les résultats de l'algorithme de prédiction de cavité (utilisé par MVD) pour la construction des poses (conformations) durant le processus de recherche.

La représentation des ligands : chaque solution candidate est encodée par un vecteur englobant la position, la conformation et l'orientation.

Initialisation : chaque individu dans la population initiale est créé aléatoirement dans l'espace de recherche défini par l'utilisateur.

L'initialisation de l'orientation se fait par l'affectation aux axes d'orientation des valeurs limitées entre -1 à +1 ; l'angle de rotation et l'angle de torsion flexible sont alors générées aléatoirement entre -180° et +180°.

Paramètres d'ajustement de l'algorithme Moldock Optimizer :

L'algorithme Moldock Optimizer contient les paramètres d'ajustement (par défaut) suivants :

- La taille de la population : 50
- Le taux de croisement : 0.9
- Facteur de calibrage : 0.5

Ces valeurs représentent un meilleur ajustement lors d'une étude de docking moléculaire effectuée sur un ensemble de 77 complexes (PDB) (Thomsen, 2006 ; Venkatachalam, 2003).

2.5.1.2 L'algorithme MolDock SE (Simplex Evolution)

L'algorithme MolDock SE (Simplex Evolution) est une méthode de recherche heuristique qui utilise la fonction de score MolDock. Cet algorithme a présenté une supériorité sur quelques complexes et il est recommandé notamment lorsque le ligand a de nombreux degrés de liberté internes et d'angles de torsion (Thomsen, 2006).

L'algorithme passe par les étapes suivantes :

- 1- Génération des poses : Création d'une population de poses, dont la taille de la population est définie par l'utilisateur.

- 2- L'évolution : l'algorithme de l'évolution simplex (SE algorithm) fonctionne avec une recherche locale et globale sur les poses générées par le Pose Generator. La recherche locale est effectuée en utilisant l'algorithme de recherche local Nelder-Mead (Nelder, 1965).

2.5.1.3 L'algorithme Simplex Itéré

L'algorithme Simplex Itéré est un algorithme de recherche heuristique qu'on peut utiliser avec les deux fonctions de score : Moldock et Plants. Son mode de fonctionnement commence par la création des poses (le nombre est défini par l'utilisateur). Chaque individu de la population est affiné en utilisant l'algorithme de recherche local simplex (également connu sous le nom Nelder-Mead). Ce dernier parcourt un maximum d'étapes jusqu'à atteindre les conditions de terminaison. Quand tous les individus de la population sont affinés, le meilleur (la meilleure solution dans cette itération) sera affiné en utilisant le même algorithme une autre fois mais avec une tolérance faible. Lorsque le maximum d'itérations est atteint par le programme, les meilleures solutions sont regroupées et affichées (Thomsen, 2006).

2.5.2 Fonction Score

Lors de la simulation du docking plusieurs poses candidates peuvent être obtenues pour chaque ligand. Le choix du score est de sélectionner les meilleures poses avec les énergies les plus basses. Deux fonctions de score sont examinées par le programme Molegro Virtuel Docker (MVD), MolDock Score et PLANTS Score.

2.5.2.1 Moldock Score

La fonction MolDock Score employée par MVD est une dérivée de la fonction de score PLP initialement proposée par Gehlhaar et al. (Gehlhaar 1995 ; 1998), développée ensuite par Yang et al. (Yang 2004). Cette fonction contient des termes additifs des énergies des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, et des interactions hydrophobiques.

La fonction de score de docking E_{score} , est définie par les termes énergétiques suivants :

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad \text{eq (2)}$$

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

E_{intra} : Energie interne de ligand.

L'énergie d'interaction ligand-protéine est donnée par l'équation suivante:

$$E_{inter} = \sum_{i \in ligand} \sum_{j \in protein} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \text{ eq(3)}$$

Cette équation prend en compte tous les atomes lourds du ligand (i) et les atomes lourds de la protéine (j) ainsi que les atomes des cofacteurs et des molécules d'eau dans le cas échéant.

Avec :

- E_{PLP} : le potentiel linéaire PLP
- $332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2}$: décrit les interactions électrostatiques entre les atomes chargés.

La valeur numérique 332.0 est donnée pour fixer l'unité de l'énergie électrostatique en Kcal.mol⁻¹.

- $D(r) = 4r_{ij}$: constante diélectrique
- q_i et q_j : représentent respectivement les charges des atomes du ligand et de la protéine.

Des exemples de charges des atomes sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 2-1: Exemples de charges d'atomes. Modèle de charges prises en compte par MolDock Score pour différents ligands et protéines.

Atomes de ligand	Atomes de protéines	Charge
Les atomes de l'azote (N) dans -C(NH ₂) ₂	His (atomes N); Arg (atomes N)	0.5
Les atomes de l'azote (N) dans -N(CH ₃) ₂ et -(NH ₃)	lys (atomes N)	1.0
Les atomes de l'oxygène (O) dans -COO. -SO ₄ ; -PO ₂	Asp (atomes O) ; Glu (atomes O)	-0.5
Les atomes de l'oxygène (O) dans -PO ₃		-0.66
Les atomes de l'oxygène (O) dans -SO ₃		-0.33

Les atomes de l'azote (N) dans -SO₂NH		-0.1
Ions métalliques tel que Na⁺		+1.0
Ions métalliques tels que Ca²⁺ et Fe²⁺		+2.0

Le potentiel E_{PLP} est un potentiel linéaire qui utilise principalement deux ensembles de paramètres différents :

- Le premier concerne l'optimisation des interactions stériques (Van der Waals) entre les atomes.
- Le second correspond à l'optimisation des potentiels des liaisons hydrogènes.

Les types d'atomes qui peuvent contribuer à la formation de liaisons hydrogène sont classés selon le tableau 2-2.

Tableau 2-2: Type d'atomes contribuant à la formation d'une liaison hydrogène.

Atomes	Types
N et O sans H liés	Accepteur
N et S avec un ou plusieurs H liés	Donneur
O avec H attachés	Accepteur et donneur
Tous les autres atomes	Apolaire

L'équation suivante représente l'énergie d'interaction intramoléculaire du ligand :

$$E_{int ra} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{protein}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{flexible bonds}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad \text{eq (4)}$$

Le premier terme de cette équation correspond à la somme d'énergies d'interaction entre toutes les paires d'atomes du ligand. Le second terme représente l'énergie de torsion, cette énergie dépend essentiellement de l'hybridation des atomes liés (Tableau 2-3). θ est l'angle de torsion de la liaison, cet angle ne correspond pas nécessairement à une seule torsion, une moyenne est définie dans le cas où plusieurs torsions sont déterminées. Le dernier terme, E_{clash} correspond à une constante de pénalité attribuée à l'équation afin d'éliminer les conformations irréalisables du ligand; la valeur de cette constante est de 1000 si la distance entre deux atomes lourds est inférieure à 2,0 Å. Si un atome lourd du ligand est situé en dehors de la région du site d'interaction (l'espace de recherche) une constante de pénalité E_{clash} de 10000 est attribuée.

Tableau 2-3: Les paramètres correspondant à l'énergie de torsion.

Liaison	θ_0	m	A
$sp^2 - sp^3$	0.0	6	1.5
$sp^3 - sp^3$	π	3	3.0
$*sp^2 - sp^3$	0.0	2	3.0

2.5.2.2 Plant Score

La fonction de score, PlantScore, est définie par les termes d'énergie suivants

$$E_{plantscore} = f_{PLP} + f_{clash} + f_{tors} + f_{site} - 20 \quad \text{eq(5)}$$

Le potentiel PLP est similaire à celui utilisé par MolDock Score, sauf qu'il prend en compte plusieurs types d'interactions (répulsifs, enterrés, non polaires, liaisons hydrogène et métaux). Le choc de ligand et les potentiels de torsion, f_{clash} et f_{tors} prennent en compte les conflits des ligands internes et les contributions de torsion pour les liaisons flexibles dans le ligand. Le terme f_{site} spécifie une pénalité qui est calculée dans le cas d'une conformation (pose) de ligand qui est située à l'extérieur du site de liaison. Le décalage énergétique de -20 est initialement requis pour l'algorithme de recherche PLANTS. Ce décalage énergétique est inclus ici afin que les scores PLANTS soient comparables à celle standard (MolegroVirtual Docker, User manual 2011, 273).

2.6 Les principales classes d'interaction

De nombreux types d'interactions non covalentes, ont été mis en évidence dans les complexes protéine- ligand. Parmi les interactions qui peuvent exister celles de type polaire comme les liaisons hydrogène et celles de type hydrophobe qui résultent d'un contact entre des groupements hydrophobes.

2.6.1 Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques peuvent être de type ion-ion, ion-dipôle ou dipôle-dipôle où les dipôles peuvent être permanents ou induits. Les interactions électrostatiques ion-ion ont une plus grande portée que les autres types d'interactions électrostatiques (Prausnitz, 1999).

Les interactions ioniques sont des interactions fortes, attractives entre charges de signe opposé (fig 2.5) et de distance inférieure à 4.5 Å. L'énergie de ces liaisons reste très importante de l'ordre de 10 K.cal.mol⁻¹ et elles stabilisent fortement les structures tridimensionnelles au cœur des protéines (Israelachvili, 1997 ; Lahana, 1997; Bosshard, 2004) .



Figure 2.5: Interactions électrostatiques ioniques

2.6.2 Liaison hydrogène

La liaison hydrogène est une force attractive qui s'effectue entre deux groupes d'atomes contenant un atome d'hydrogène. C'est une liaison physique qui se situe entre la liaison covalente et l'interaction électrostatique, mais la force d'interaction dominante reste électrostatique (Isaacs, 1999). Cette liaison ne s'opère pas avec n'importe quel atome. Il faut un donneur et un accepteur :

- Le donneur est l'atome d'hydrogène lié de manière covalente à un atome électronégatif ; généralement un azote, un oxygène, ou un fluor.
- L'accepteur est un autre atome électronégatif ; comme l'azote, l'oxygène ou le fluor.

Par conséquent la liaison hydrogène est le résultat d'une interaction dipôle-dipôle, comme le montre la figure 2.6.

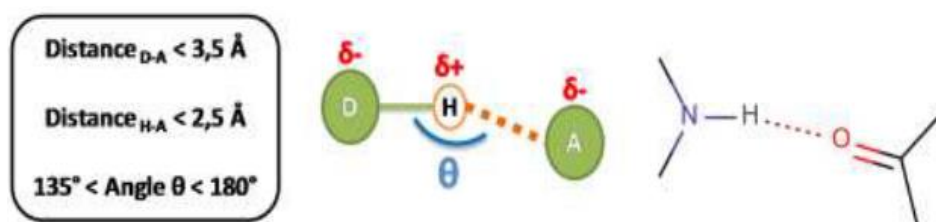


Figure 2.6: Liaison hydrogène

Les liaisons hydrogène sont généralement présentées par deux paramètres : la longueur de la liaison et l'angle formé par les trois atomes. Les valeurs des angles et des distances varient respectivement de 90 à 180 degrés et de 1.2 à 4.0 Å.

Ces paramètres caractéristiques vont apprécier la force des liaisons hydrogènes. On distingue trois catégories classées dans le tableau 2.4.

Tableau 2-4: Les trois catégories de liaison hydrogène.

Longueur (Å)	Angle (°)	Energie (kcal/mol)	Description
2.2 à 4.0	90 à 150	0.24 à 1	Faible intensité, comparable à Van der Waals, liaison de type électrostatique.
1.5 à 3.2	130 à 180	1 à 4	Liaisons modérées, situées entre les deux extrêmes
1.2 à 2.5	175 à 180	4 à 10	Liaison forte de type covalente

Ces interactions qui s'établissent entre deux groupes d'atomes, peuvent s'effectuer entre deux molécules différentes (intermoléculaires), ou d'une même molécule (intramoléculaires).

Elles sont importantes pour le repliement protéique, les changements conformationnels et la reconnaissance protéine/ligand. De plus, elles affectent les propriétés physico-chimiques des molécules, telles que la solubilité et la perméabilité membranaire qui sont des éléments cruciaux dans le développement d'un médicament (Pauling, 1951 ; Berman, 2000).

2.6.3 Les interactions de Van Der Waals

Ce sont des interactions entre atomes, ou molécules neutres, elles résultent des interactions attractives multipolaires, d'induction et de dispersion qui sont équilibrées à courte distance par les forces répulsives. Ces interactions s'appliquent à très courte distance et ne concernent donc que les atomes de surface. Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la corrélation stérique entre le ligand et la protéine réceptrice (Karp,2004 ; . Voet 2005). On distingue trois types d'interactions :

- Interaction dipôle permanent – dipôle permanent ou effet d'orientation de Keesom : Ce type d'interaction se développe entre deux molécules polaires.



Figure 2.7: Les forces de Keesom : dipôle permanent/permanent

- Interaction dipôle permanent – dipôle instantané ou effet d'induction de Debye : Ce type d'interaction se développe entre une molécule polaire et une molécule quelconque (polaire ou apolaire).

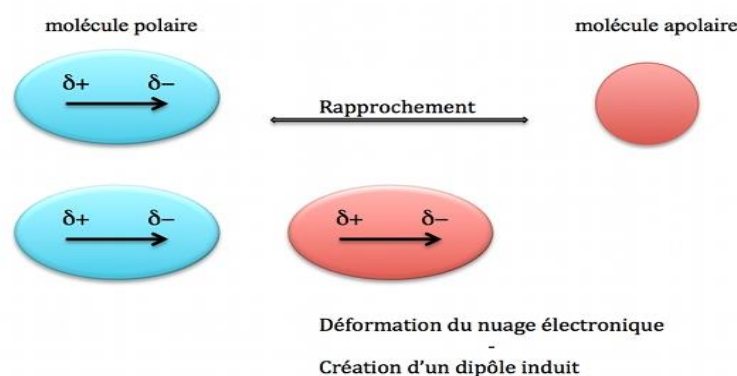


Figure 2.8 : Les forces de Debye : dipôle permanent/induit

- Interaction dipôle instantané – dipôle instantané ou dispersion de London : Ce type d'interaction se développe entre deux molécules quelconques (polaires ou apolaires).

Ces interactions sont très faibles mais dans le cas des macromolécules, leur nombre élevé va produire au totale une force importante.

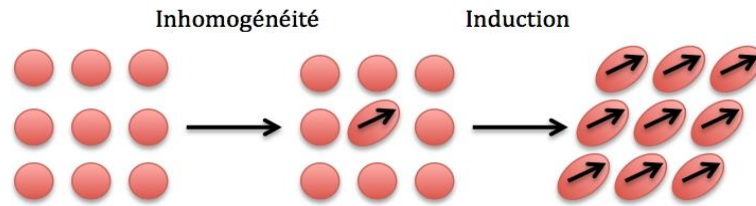


Figure 2.9: Les forces de London : dipôle induit/induit

2.6.4 Interactions hydrophobes

Les substances hydrophobes sont des molécules ou un groupe d'atomes non polaires qui ne sont pas capables de former des liaisons hydrogènes et ne peuvent pas s'hydrater. Elles ont la tendance à se rassembler de façon à minimiser les contacts avec l'eau. Les molécules d'eau se réorganisent alors autour de ces substances hydrophobes de manière à minimiser l'énergie de l'ordre 7 Kcal mol^{-1} (Schulz, 1978). Cet effet hydrophobique a d'importantes influences sur la conformation et la stabilité des molécules (Lin, 2008; Eriksson, 1992). Il existe plusieurs type d'interactions hydrophobiques ; on peut citer celles qui se forment entre un cycle aromatique et les atomes d'un autre cycle, d'un amide ou des groupements méthyle. Des études sur l'interaction protéine-ligand ont montré que ce type d'interaction est le plus fréquent.

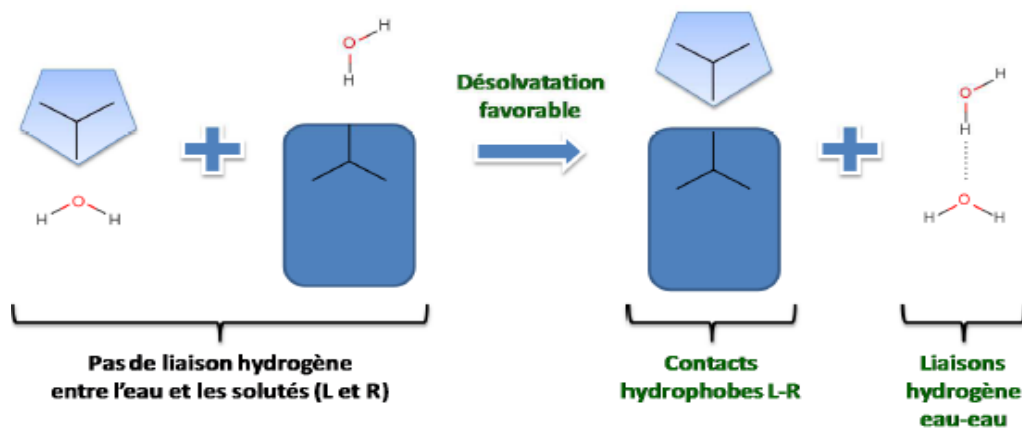


Figure 2.10: Interaction hydrophobe

2.7 Conclusion

Le processus de docking est l'une des premières étapes dans la conception de médicaments. Il consiste à faire interagir un ligand avec un récepteur, généralement de nature protéique. En conséquent, le plus grand avantage des méthodes de docking protéine-ligand est qu'ils peuvent proposer des hypothèses structurales sur la façon dont une petite molécule peut interagir avec sa cible macromolécule. Des études ont montré que certains algorithmes de docking sont plus fiables que d'autres pour reproduire le mode de fixation expérimentale de ligand. La contrepartie de ces techniques est généralement une hausse des temps de calcul et des ressources. Le nombre de programmes de docking actuellement disponibles est élevé et n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies.

Après avoir présenté dans ce chapitre les éléments bibliographiques essentiels relatifs à la compréhension de la méthodologie du docking moléculaire nous présenterons dans les chapitres suivants , l'application de cette méthodologie dans l'étude des interactions Enzyme-Ligand : cas des inhibiteurs de la topoisomérase1 dans le but de caractériser les mécanismes d'interaction mis en jeu et principalement de développer de nouveaux inhibiteurs en faisant appel aux approches *in silico* de modélisation des interactions enzyme-inhibiteur par docking moléculaire en utilisant le programme Molegro Virtuel Docker (MVD).

2.8 Références bibliographiques

Abagyan, R., Totrov, M., Kuznetov, D. (1994) "ICM - A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation", *Journal of Computational Chemistry*, 15, pp. 488-506.

Araújo, J.Q., Lima, J.A., Pinto, A.D.C., Alencastro, R.B.D and Albuquerque, M.G. (2011) "Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease", *J. Mol. Model*, 17(6), pp.1401-1412.

Baxter, C.A., Murray, C.W., Clark, D.E., Westhead, D.R., Eldridge, M.D. (1998) "Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 33(3), pp. 367-382.

Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. (2000) "The Protein Databank", *Nucl. Ac. Res*, 28, pp. 235-242.

Bissantz, C., Folkers, G., Rognan, D. (2000) "Protein-based virtual screening of chemical databases. Evaluation of different docking/scoring combinations", *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(25), pp. 4759-4767.

Boehm, H.J. (1994) "The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three dimensional structure", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 8, pp. 243-256.

Bohm, H.J. (1992) "The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 6(1), pp. 61-78.

Bosshard, H., Marti, D., Jelesarov, I. (2004) "Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings", *Journal of Molecular Recognition*, 17, pp. 1-16.

Brooijmans, N., Kuntz, I.D. (2003) "Molecular recognition and docking algorithms", *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 32, pp. 335-73.

Brooks, B.R., Brucoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., Karplus, M. (1983) "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations", *Journal of Computational Chemistry*, 4(2), pp. 187-217.

Chaput, L., Mouawad, L. (2017) "Efficient conformational sampling and weak scoring in docking programs ? Strategy of the wisdom of crowds", *Journal of Cheminformatics*, 9(1), pp. 1-18.

Charifson, P.S., Corkery, J.J., Murcko, M.A., Walters, W.P. (1999) "Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins", *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(25), pp. 5100-5109.

Connolly, M.L. (1985) "Computation of Molecular Volume", *JACS*, 107, pp. 1118-1124.

Corbeil, C.R., Englebienne, P., Moitessier, N. (2007) "Docking Ligands Into Flexible And Solvated Macromolecules-1. Development And Validation Of Fitted 1.0", *Journal Of Chemical Informatic Modelling*, 47, pp. 435-449.

Dias, R., Azevedo, J.D., Waler, F. (2008) "Molecular docking algorithms", *Curr Drug Targets*, 9(12), pp. 1040-7.

Dréo, J., Pérowski, A., Siarry, P., Taillard, E. (2003) "Métaheuristiques pour l'optimisation difficile", Ouvrage Eyrolles coordonné par Patrick Siarry, p.356

Eldridge, M.D., Murray, C.W., Auton, T.R., Paolini, G.V., Mee, R.P. (1997) "Empirical scoring functions: The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 11(5), pp. 425-445.

Ericksen, S.S., Wu, H., Zhang, H., Michael, L.A., Newton, M.A., Hoffmann, F.M., Wildman, S.A. (2017) "Machine Learning Consensus Scoring Improves Performance Across Targets in Structure-Based Virtual Screening", *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(7), pp. 1579-1590.

Eriksson, A., Baase, W., Zhang, X., Heinz, D., Blaber, M., Baldwin, E., Matthews, B. (1992) "Response of a Protein Structure to Cavity-Creating Mutations and its Relation to the Hydrophobic Effect", *Science*, 255, pp. 178-183.

Ewing, T.J., Makino, S., Skillman, A.G., Kuntz, I.D. (2001) "DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15(5), pp. 411-428.

Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, H.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelly, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P., Shenkin, P.S. (2004) "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. I. Method and assessment of docking accuracy", *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), pp. 1739-1749.

Gehlhaar, D.K., Verkhivker, G., Rejto, P.A., Fogel, D.B., Fogel, L.J., Freer S.T. (1995) "Docking Conformationally Flexible Small Molecules Into a Protein Binding Site Through Evolutionary Programming", *Proceedings of the Fourth International Conference on Evolutionary Programming*, pp. 615-627.

Gehlhaar, D.K.G, Bouzida, D., Rejto, P.A. (1998) "Fully Automated And Rapid Flexible Docking of Inhibitors Covalently Bound to Serine Proteases", *Proceedings of the Seventh International Conference on Evolutionary Programming*, pp. 449-461.

Glover, F. (1997) "Tabu Search and adaptive memory programming- advances, applications and challenges", *Interfaces in Computer Science and Operations Research*, pp. 1-75.

Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R. (2002) "Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions", *Proteins*, 47, pp. 409-443.

Heberlé, G. and Azevedo, W. F. d. (2011) "Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations", *Curr. Med. Chem*, 18(9), pp. 1339 -1352.

Holloway, M.K. (1995) "A priori Prediction of Activity for HIV-1 Protease Inhibitors Employing Energy Minimization in the Active Site", *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, pp. 305-317

Huang, S.Y., Zou, X. (2010) "Advances and challenges in protein-ligand docking", *Int J Mol Sci*, 11(8), pp. 3016-3034.

Isaacs, E.D., Shukla, A., Platzman, P.M., Hamann, D.R., Barbielleini, B.R., Tulk, C.A. (1999) "Covalency of the Hydrogen Bond in Ice: A direct X-Ray Measurement", *Phys. Rev. Lett*, 82, pp. 600-603.

Israelachvili, J.N. (1997) "Intermolecular and surface forces. Academic Press", 2e édition, Londres.

Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., Leach, A.R., Taylor, R. (1997) "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking", *J. Molec. Bio*, 267(3), p. 727-748.

Karp, G., Isawa, J., Marshall, W. (2018) "Biologie cellulaire et moléculaire", 4ème édition, France : De Boeck, p.850.

Kaserer, T., Temml, V., Kutil, Z., Vanek, T., Landa, P., Schuster, D. (2015) "Prospective performance evaluation of selected common virtual screening tools. Case study: Cyclooxygenase (COX) 1 and 2", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 96, pp. 445-457.

Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., Bajorath, J. (2004) "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications", *Nat Rev Drug Discov*, 3(11), pp. 935-949.

Kuntz, I.D., Blaney, J.M., Oatley, S.J., Langridge, R., Ferrin, T.E. (1982) "A geometric approach to macromolecule ligand Interactions", *J Mol Biol*, 161(2), pp. 269-88.

Lahana, R. (1999) "How many leads from HTS", *Drug Discov*, pp. 447-448.

Lengauer, T., Rarey, M. (1996) "Computational methods for biomolecular docking", *Current Opinion in structural Biology*, pp. 402-406.

Lin, M.S., Chen, L.Y., Tsai, H.T., Wang, S.S., Chang, Y., Higuchi, A., Chen, W.Y. (2008) "Investigation of the Mechanism of Beta-Amyloid Fibril Formation by Kinetic and Thermodynamics Analyses", *Langmuir*, 24, pp. 5802-5808.

Liu, M. and Wang, S. (1999) "MCDOCK: a Monte Carlo simulation approach to the molecular docking problem", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 13(5), pp. 435-451.

Massova, I., Kollman, P.A., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D.A., Cheatham, T.E. (2000) "Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models", *Acc. Chem. Res*, 33, pp. 889-897.

Mcdonald, I.K., Thornton, J.M. (1994) "Satisfying Hydrogen Bonding Potential in Proteins", *J. Mol. Biol*, 238, pp. 777-793.

Mcmartin, C. and Bohacek ,R.S. (1997) "QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 11(4), pp. 333-344.

Meng, X.Y., Zhang, H.X. (2011) "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery", *Current computer-aided drug design*, 7(2), pp.146-157.

Metropolis, N., Ulam, S. (1949) "The Monte Carlo method", *J Am Stat Assoc*, 44(247), pp. 335-341.

Michalewicz, Z., Janikow, C.Z., Krawczyk, J.B. (1992) "A modified Genetic Algorithm for optimal control problems", *Computers and Mathematics with Applications*, 23(12), pp. 83-94.

Miller, M.D., Kearsley, S.K., Underwood, D.J., Sheridan, R.P. (1994) "FLOG: a system to select 'quasi-flexible' ligands complementary to a receptor of known three-dimensional structure", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 8(2), pp. 153-174.

Miteva, M.A., Lee, W.H., Montes, M.O., Villoutreix, B.O. (2005) "Fast structure-based virtual ligand screening combining FRED, DOCK, and Surflex", *J Med Chem*, 48(19), pp. 6012-6022.

Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J. (1998) "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function", *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), pp. 1639-1662.

Muegge, I. (2001) "Effect of ligand volume correction on PMF scoring", *J. Comput .Chem*, 22(4), pp. 418-425.

Nelder, J.A., Mead, R. (1965) "A Simplex-Method for Function Minimization", *Computer journal*, 7, pp. 308-313.

Nicklaus, M.C., Wang, S., Driscoll, J.S., Milne, G.W. (1995) "Conformational changes of small molecules binding to proteins", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 3(4), pp. 411-428.

Norel, R., Lin, S.L., Wolfson, H.J., Nussinov, R. (1994) "Shape complementarity at protein-protein interfaces", *Biopolymers*, 34, pp. 933-94.

Norel, R., Petrey, D., Wolfson, H.J., Nussinov, R. (1999) "Examination of shape complementarity in docking of unbound proteins", *Proteins*, 36, pp. 307-317.

Pang, Y.P., Perola, E., Xu, K., Prendergast, F.G. (2001) "UDOC: a computer program for identification of drug interaction sites in macromolecules and drug leads from chemical databases", *Journal of Computational Chemistry*, 22(15), pp. 1750-1771.

Pauling, L., Corey, R.B. (1951) "Configurations of Polypeptide Chains with Favoured Orientations Around Single Bonds Two Pleated Sheets", *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 37, pp. 729-740.

Pauling, L., Corey, R.B., Branson, H.R. (1951) "The Structure of Proteins: Two Hydrogen Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain", *PNAS*, 37, pp. 205-211.

Perez, C., Pastor, M., Ortiz, A.R., Gago, F.J. (1998) "Comparative binding energy analysis of HIV-1 protease inhibitors: incorporation of solvent effects and validation as a powerful tool in receptorbased drug design", *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, pp. 836-852.

Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Klebe, G. (1996) "A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm", *J.Mol. Biol*, 261(3), pp. 470-489.

Rastelli, G., Degliesposti, G., Del-Rio, A., Sgobba, M. (2009) "Binding Estimation after Refinement, a New Automated Procedure for the Refinement and Rescoring of Docked Ligands in Virtual Screening", *Chemical Biology & Drug Design*, 73(3), pp. 283-286.

Schneider, G., Böhm, H.J. (2002) "Virtual screening and fast automated docking methods", *Combinatorial Chemistry*, 7, pp. 64-70.

Schulz, G.E., Schirmer, R.H. (1978) "Principles of Protein Structure", Boston university, Center for advanced biotechnology, Boston, USA.

Schulz-Gasch, T., Stahl, M. (2004) "Scoring Functions for Protein-ligand Interactions: A Critical Perspective", *Drug Discovery Today: Technologies*, 1, pp. 231-239.

Shoemake, K. (1992) "Uniform Random Rotations", *Graphics Gems III, (IBM Version)*, pp. 124-132.

Shoichet, B.K., Bodian, D.L., Kuntz, I.D. (1992) "Molecular Docking Using Shape Descriptor", *J. Comp. Chem*, 13, pp. 380-397.

Soriano, P., Gendreau, M. (1997) "Fondements et applications des méthodes de recherche avec tabous RAIRO. Recherche opérationnelle", tome 31, no 2, pp. 133-159.

Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2006) "Protein-ligand docking: current status and future challenges", *Proteins*, 65(1), pp. 15-26.

Stahl, M., Rarey, M. (2001) "Detailed analysis of scoring functions for virtual screening", *J. Med. Chem.* 44, pp. 1035-1042.

Storn, R., Price, K. (1995) "Differential evolution - a Simple and efficient adaptive scheme for global optimization over continuous spaces", *journal of global optimization*, 11(4), pp. 341-359.

Taylor, J.S. and Burnett, R.M. (2000) "DARWIN: a program for docking flexible molecules", *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 41(2), pp. 173-191.

Terp, G.E., Johansen, B.N., Christensen, I.T., Jorgensen, F.S. (2001) "A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities", *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(14), pp. 2333-2343.

Thomsen, R. and Thomsen, M. H. (2006) "MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking", *J. Med. Chem*, 49(11), pp. 3315-3321.

Venkatachalam, C.M., Jiang, X., Oldfield, T., Waldman, M. (2003) "Ligand Fit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 21, p. 289-307.

Voet, D., Voet, J.G. (2005) "Biochimie", 2^{ème} édition, France : De Boeck, p.1600.

Wang, R., Lai, L., Wang, S. (2002) "Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 16(1), pp. 11-26.

Wang, R., Lu, Y., Fang, X., Wang, S. (2004) "An Extensive Test of 14 Scoring Functions Using the PDBbind Refined Set of 800 Protein-ligand Complexes", *J. Chem. Inf. Comp. Sci*, 44, pp. 2114-2125.

Weiner, S.J., Kollman, P.A., Nguyen, D.T., Case, D.A. (1986) "An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids", *Journal of Computational Chemistry*, 7(2), pp. 230-252.

Welch, W., Ruppert, J. and Jain, A.N. (1996) “Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites”, *Chemistry & Biology*, 3(6), pp. 449-462.

Yang, J.M., and Kao, C.Y. (2000) “flexible ligand docking using a robust evolutionary algorithm”, *J. Comput. Chem*, 21(11), pp. 988-998.

Yang, J.M., Chen, C.C. (2004) “GEMDOCK: A Generic Evolutionary Method for Molecular Docking”, *Proteins*, 55, pp. 288-304.

Yu, J., Ciancetta, A., Dudas, S., Duca, S., Lottermoser, J., Jacobson, K.A. (2018) “Structure-Guided Modification of Heterocyclic Antagonists of the P2Y₁₄ Receptor”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(11), pp. 4860–4882.

Yu, J., Zhou, Y., Tanaka, I., Yao, M. (2010) “Un nouvel algorithme pour la détection des poches de protéines et des cavités avec une sonde sphère de roulement ”, *Bioinformatics*, 26 (1), pp. 46 -52.

Yuriev, E., Agostino, M., Ramsland, P.A. (2011) “Challenges and advances in computational docking: 2009 in review”, *J Mol Recognit*, 24(2), pp. 149-64.

Zauhar, R.J., Moyna, G., Tian, L. (2003) “Shape signatures: a new approach to computeraided ligand- and receptor-based drug design”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, pp. 5674-5690.

Partie pratique

Chapitre 3

Matériels et méthodes

3.1	Introduction	72
3.2	Matériels utilisés	72
3.2.1	Microordinateurs	72
3.2.2	Programmes (logiciels)	73
3.2.3	Banques de données (chimiothèques)	73
3.3	Méthodes	74
3.3.1	Docking moléculaire	74
3.3.2	Reproduction de la structure cristalline	74
3.3.3	Le choix du complexe 1K4Tpdb	74
3.3.4	Choix du logiciel de docking moléculaire	75
3.3.5	Préparation des molécules au docking moléculaire	75
3.3.5.1	Préparation du récepteur (protéine)	75
3.3.5.2	Préparation de ligands	76
3.3.6	Criblage de la chimiothèque	77
3.3.7	Protocole du docking moléculaire	77

3.1 Introduction

La découverte de nouvelles molécules anticancéreuses, plus efficaces et moins toxiques, à base de plantes et dérivées de la camptothécine, constitue un défi pour les chercheurs jusqu'à nos jours. Plusieurs travaux ont été réalisés sur le plan de l'extraction et l'identification de nouvelles structures dérivées de la camptothécine, ou bien la synthèse organique des similaires de ce principe actif. Le règne végétal est toujours l'une des ressources naturelles, offrant aux chercheurs plus d'opportunités d'obtenir de nouvelles structures de base et une plus grande diversité structurale. Dans ce chapitre, nous utiliserons une base de données virtuelle des similaires de la camptothécine et une seconde base de données de produits naturels d'Afrique du Nord.

L'objectif de ce travail est de cribler des molécules par amarrage moléculaire à l'aide du logiciel Molegro Virtual Docker V.06.

3.2 Matériels utilisés

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé les matériels suivants :

3.2.1 Microordinateurs

Station de travail HP Z230 Tower équipée de :

- Processeur : quadricoeur Intel® Xeon® E3 1225 V3 3.20 GHz ;
- Mémoire installée (RAM) : 8.00 Go ;
- Carte graphique NVIDIA GeForce GTX 1050Ti ;
- Système d'exploitation : Windows 7 pro 64 bits.

Station de travail HP Z230 Tower équipée de :

- Processeur : Intel® Xeon® E5- 2620 V3 2.4 GHz (double processeurs);
- Mémoire installée (RAM) : 32.00 Go ;
- Carte graphique TESLA K40 CARD 12 GB DDR5 ;
- Système d'exploitation : Windows 7 pro 64 bits.

Ordinateur équipé de :

- Processeur : Intel® core™i5-4300 CPU 2.50 GHz ;

- Mémoire installée (RAM) : 8.00 Go ;
- Carte graphique VGA Standart ;
- Disque dur : 500 Gb ;
- Système d'exploitation : Windows 7 pro 64 bits.

3.2.2 Programmes (logiciels)

Plusieurs logiciels ont été utilisés pour la réalisation de ce travail :

- Logiciel de docking moléculaire : MVD 6.0 sous licence développé par Molegro Aps-Danemark ;
- Logiciel openbabel ;
- Microsoft Excel 2010.

3.2.3 Banques de données (chimiothèques)

- **PDB (Protein Data Bank) :**

La banque de données protéiques (Protein Data Banc ou PDB) est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (Structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines essentielles et acides nucléiques. Ces structures sont déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Cette base de données est accessible gratuitement à l'adresse (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

- **ZINC database :**

La base de données ZINC est une collection organisée de composés chimiques disponibles, commercialisés et destinés au criblage virtuel. Cette base de données est disponible en téléchargement gratuit (<http://zinc.docking.org>) dans plusieurs formats de fichiers courants, notamment les formats SMILES, mol2, 3D SDF et DOCK.

- **ANPDB :**

La base de données (ANPDB) produits naturels africains est une fusion de bases de données NP de diverses régions d'Afrique. Actuellement, l'ANPDB comprend la base de données sur les produits naturels d'Afrique du Nord (NANPDB) et la base de données sur les produits naturels d'Afrique de l'Est (EANPDB). L'ANPDB est la plus grande base de données de NP isolées d'organismes indigènes du continent africain. Elle couvre 6 515 composés isolés principalement à partir de 1 042 organismes sources ; principalement des plantes, avec des

contributions de micro-organismes, d'animaux et de sources marines. Cette base de données est disponible en téléchargement gratuit (<http://african-compounds.org/>).

3.3 Méthodes

3.3.1 Docking moléculaire

Le docking moléculaire est l'une des stratégies les plus fondamentales et les plus importantes pour la découverte de médicaments. Il permet de prédire la position et l'orientation d'une petite molécule par rapport à une autre comme cible macromoléculaire pour avoir le complexe le plus stable, dans lequel différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre ces deux molécules. Ce travail consiste à étudier les interactions entre deux séries de molécules avec l'enzyme ou la cible choisies comme inhibiteurs de l'ADN Topo1 humaine par le docking moléculaire en utilisant le logiciel MVD.

3.3.2 Reproduction de la structure cristalline

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 jugée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (Root-Mean-Square-Derivation) de la pose du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence. La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms, au-delà de laquelle la prédiction est considérée non adéquate.

Afin de nous assurer que le programme MVD peut être utilisé sans trop d'erreurs, dans ce travail nous avons appliqué le test RMSD sur six structures cristallines des protéines Topo1 humaines-ADN téléchargées à partir de la banque de données de protéines, dans lesquelles les codes PDB sont 1T8I, 1K4T, 1RR8, 1SC7, 1TL8 et 1SEU qui sont respectivement complexés avec six inhibiteurs différents EHD, TTC, TTG, M38, AI3, et SA3.

3.3.3 Le choix du complexe 1K4Tpdb

La **Topoisomérase1 humaine** est la cible thérapeutique que nous avons étudiée dans notre travail, sa structure tridimensionnelle est disponible sous format pdb via la banque de données Protein Data Bank. Parmi les six complexes "Topo1 humaine-ADN-inhibiteur" proposés par cette banque (Tableau 3.1), nous avons choisi le complexe Topo1-ADN- Topotecan ayant pour code : 1K4T. Le choix de ce complexe est dicté par sa faible valeur de résolution 2.10 Å.

Tableau 3-1: Les codes PDB des complexes "Topo1 humaine -ADN-inhibiteur" avec Leur résolution.

Code PDB du complexe	Code PDB du ligand	Résolution (Å)	Poids moléculaire (kDa)
1T8I	<i>EHD</i>	3.00	70
1K4T	<i>TTC</i>	2.10	84.97
1RR8	<i>TTG</i>	2.60	70
1SC7	<i>M38</i>	3.00	70
1TL8	<i>AI3</i>	3.10	70
1SEU	<i>SA3</i>	3.00	70

3.3.4 Choix du logiciel de docking moléculaire

Le logiciel « Molegro Virtual Docker » (MVD) a été sélectionné pour les calculs de docking moléculaire en raison de sa disponibilité au laboratoire, sa grande modularité des paramètres (contraintes, docking, scoring, clustering) et sa précision de docking. Il permet également d'avoir une évaluation différenciée (composantes de la fonction de scores accessibles à l'utilisateur) de l'affinité vers le cofacteur et vers le ligand.

3.3.5 Préparation des molécules au docking moléculaire

3.3.5.1 Préparation du récepteur (protéine)

Dans notre étude nous avons utilisé un complexe ternaire constitué de l'ADN topoisomérase1 humaine et le ligand « topotecan » qui a été publié en 2001 par staker *et coll* sous le nom « 1K4T pdb », et qui a été extrait de la banque de données (RCSB) (<http://www.rcsb.org/pdb>). Sa structure cristalline 3D a une résolution de 2,10 Å, un poids structurel de 84,97 kDa, une longueur d'acides aminés de 592 et ne contient qu'une seule chaîne (chaîne A) (Figure3.1) (McDonald, 1994 ; Neelam, 2019).

Avant le docking, les atomes d'hydrogène sont rajoutés aux protéines et tous les hétéroatomes non récepteurs tels que l'eau et les ions ont été supprimés pour avoir un modèle simplifié de la protéine.

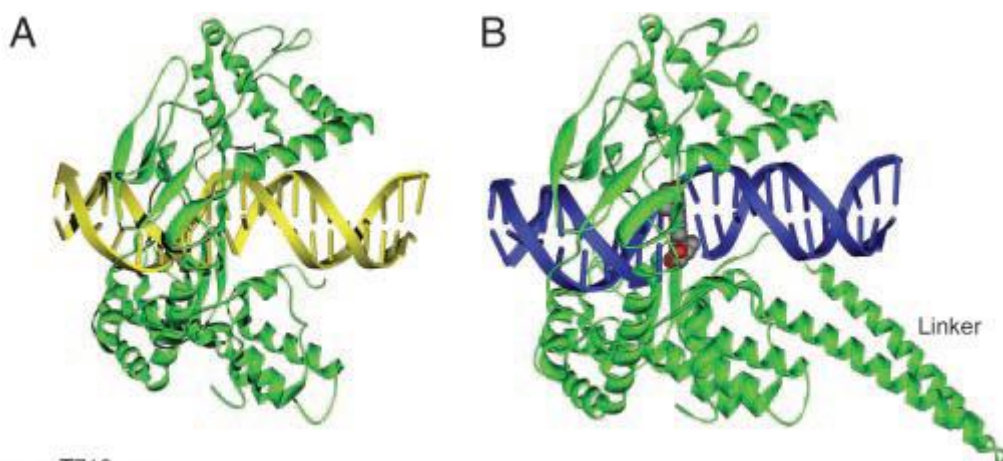


Figure 3.1: Structure cristalline du complexe ADN-topo1 (A) Structure cristalline du complexe ADN-topo1- Topotecan (B)

3.3.5.2 Préparation de ligands

Dans ce travail, nous avons utilisé deux chimiothèques :

Une **chimiothèque** tirée ou téléchargée à partir de la base de données (<http://zinc15.docking.org/>) avec l'extension « sdf » et déclarées comme similaires de la Camptothécine avec un coefficient de similarité de Tanimoto égal ou supérieur à 50%.

Au total, 738 structures de ligands ont été collectées et enregistrées sous format « mol2 » à l'aide du logiciel OpenBabel ensuite préparées à l'aide du programme MVD.

Une **deuxième chimiothèque** regroupe plus de 5790 molécules extraites de plantes médicinales d'Afrique du Nord, représentant plusieurs familles, telles que les flavonoïdes, les terpènes, les alcaloïdes. Les molécules de cette chimiothèque ont été déterminées par les chercheurs des pays de cet espace géographique en utilisant plusieurs techniques et méthodes expérimentales. Les molécules possèdent un poids moléculaire varie de 94.112 à 1108.78 dalton et constituées de plusieurs fonctions chimiques telles que la fonction hydroxyle, acide carboxylique, noyaux aromatiques, aldéhyde et esters. Cette chimiothèque est téléchargée sous l'extension « sdf » à partir du site web www.african.compounds.org. Les molécules sont ensuite enregistrées sous format « mol2 » à l'aide du logiciel OpenBabel en gardant les numéros les identifiant avec l'élimination des noms connus accompagnant chaque structure.

3.3.6 Criblage de la chimiothèque

Le criblage débute par l'importation de tous les ligands de notre chimiothèque dans le «work space» du MVD. Le «score» des poses obtenues pour chaque ligand mène à un classement des meilleures poses basées sur leurs énergies d'interaction «Moldock score».

3.3.7 Protocole du docking moléculaire

Le docking moléculaire a été réalisé à l'aide du logiciel Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD)

- **Paramètres de la grille de calculs**

Le programme MVD utilise dans les calculs de docking moléculaire une grille tridimensionnelle, permettant d'augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie d'interaction ligand/récepteur. Cette grille englobe largement le site actif de la protéine étudiée et permet la libre rotation du ligand dans ce site (Puspaningtyas, 2014; Yang, 2004). Le centre de cette boîte est déterminé par les coordonnées X et Y et Z avec les dimensions 21.24 Å, - 3.97 Å, 28.12 Å, respectivement. La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés. Les paramètres par défaut ont été utilisés pour tous les calculs (Wang, 1999; Korb, 2009). Le docking moléculaire qui a été effectué avec une règle de grille de 0,3 Å contient 50 exécutions indépendantes avec un nombre maximum de 20 itérations exécutées sur une seule population de 100 individus. Le site de liaison actif était considéré comme une molécule rigide, tandis que les liaisons rotatives des ligands étaient libres et les brins de l'ADN convertis en cofacteur avant de lancer les calculs du docking moléculaire.

- **L'algorithme de recherche**

Nous avons choisi Moldock Optimizer, algorithme de recherche basé sur les algorithmes génétiques (voir chapitre 02).

- **Fonction de score**

Lors de la simulation du docking plusieurs poses candidates peuvent être obtenues pour chaque ligand, nous avons sélectionné les meilleures poses avec les énergies les plus basses selon la fonction de score basée sur une grille «MolDock Score» (voir chapitre 02). Toutes ces énergies sont stockées et regroupées dans un fichier destiné à être inspecté dans le «work space» du MVD.

Chapitre 4

Résultats et discussion

4.1	Redocking du programme MVD	79
4.2	Docking moléculaire de la première série de chimiothèques	81
4.2.1	Analyse des résultats	86
4.3	Docking moléculaire de la deuxième chimiothèque	93
4.3.1	Analyse des résultats	100
4.4	Références Bibliographiques	119

4.1 Redocking du programme MVD

Les résultats obtenus du Redocking des ligands de référence contre les complexes top1-ADN sont rassemblés dans le tableau 4.1 Nous remarquons que le RMSD de tous les atomes entre deux conformations est inférieur à 2 Å pour toutes les protéines, indiquant que les paramètres pour la simulation d'amarrage est bonne pour reproduire les structures cristallines De plus, la structure cristalline (1K4T) a la plus petite valeur de RMSD (0.57 Å) ; par conséquent, son ligand cocristallisé a été sélectionné et validé pour le reste de cette étude.

Tableau 4-1: Redocking des ligands de référence dans plusieurs PDB

Code PDB du complexe	Code PDB du ligand	RMSD (Å°)
1T8I	<i>EHD</i>	0.673119
1K4T	<i>TTC</i>	0.576747
1RR8	<i>TTG</i>	0.831694
1SC7	<i>M38</i>	1.51331
1TL8	<i>A13</i>	1.23254
1SEU	<i>SA3</i>	0.873734

Ces résultats sont fortement confirmés par l'analyse visuelle qui montre à chaque fois une superposition maximale de la meilleure pose du ligand calculée par MVD avec la géométrie du même ligand donnée par diffraction des rayons-X (Figure 4.1- 4.6). Le programme choisi peut donc être considéré comme adéquat pour traiter ce problème.

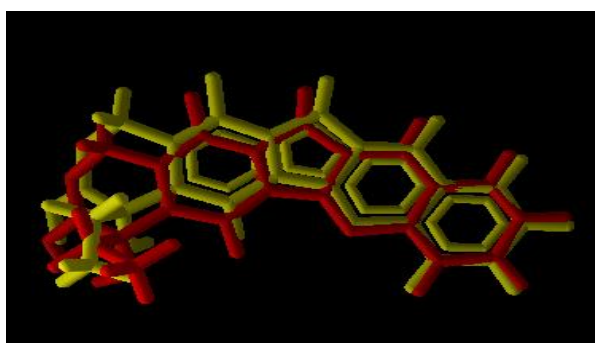


Figure 4.1 : Superposition de la géométrie du ligand EHD obtenu par rayon-X (coloré en jaune) et celle calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).

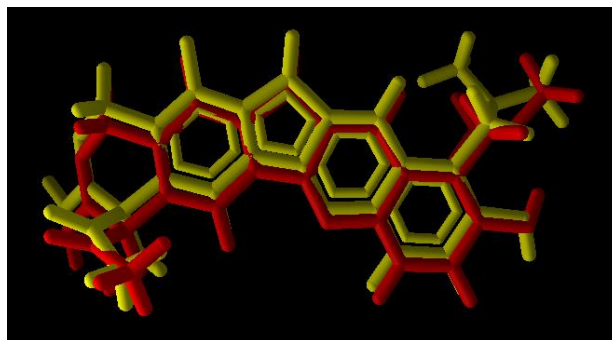


Figure 4.2: Superposition de la géométrie du ligand TTC obtenu par rayon-X (coloré en jaune) et celle calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).

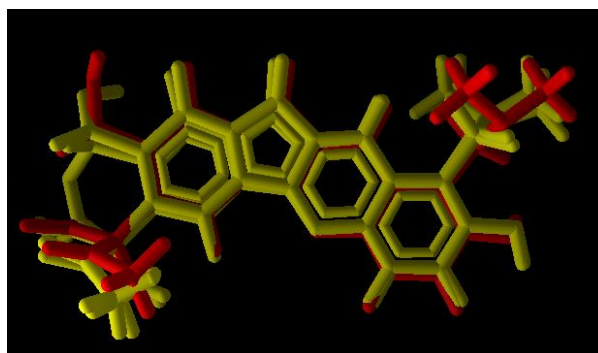


Figure 4.3: Superposition de la géométrie du ligand TTG obtenu par rayon-X (coloré en jaune) et celle calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).

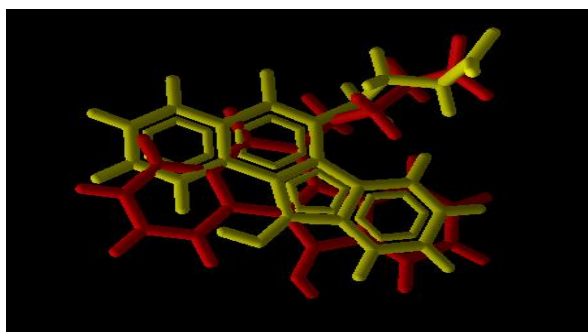


Figure 4.4: Comparaison de la conformation expérimentale du ligand M38 (coloré en jaune) avec sa conformation optimale calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).

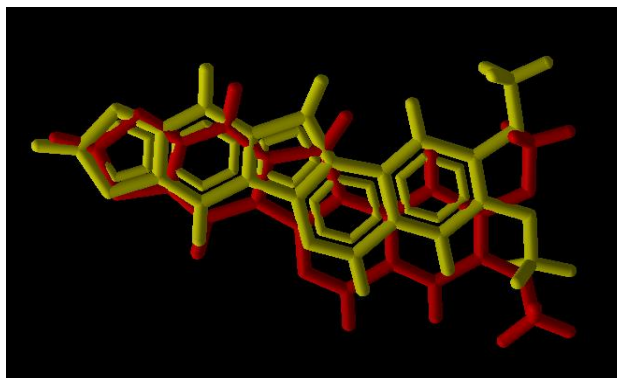


Figure 4.5: Comparaison de la conformation expérimentale du ligand AI3 (coloré en jaune) avec sa conformation optimale calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).

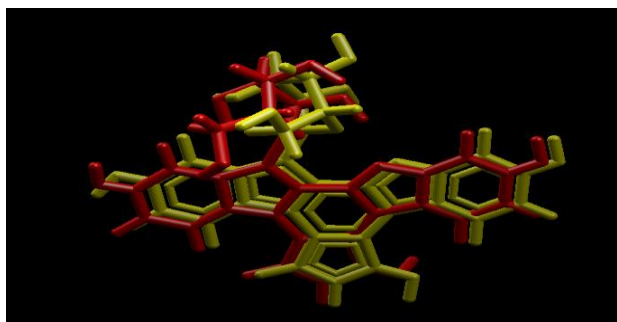


Figure 4.6: Superposition de la géométrie du ligand SA3 obtenu par rayon-X (coloré en jaune) et celle calculée par docking moléculaire avec MVD (coloré en rouge).

4.2 Docking moléculaire de la première série de chimiothèques

Afin d'améliorer l'activité inhibitrice de la CPT, nous avons utilisé la méthode de criblage virtuel d'une première série de chimiothèques pour étudier son mode d'inhibition contre la protéine cible. La base de données propose 738 similaires de la CPT. La technique de simulation d'amarrage a été réalisée en utilisant Molegro Virtual Docker (MVD) avec des similaires de la CPT et qui ont été amarrés avec l'ADN-topo1 humaine comme cible protéique. Les calculs ont été terminés après sept jours, et nous avons obtenu 506 poses, qui représentent 10% du nombre totale des poses sélectionnées.

Les dix meilleures poses ont été classées en fonction de leur Moldock score, de la liaison hydrogène, de l'interaction protéine-ligand et de l'interaction ligand-ADN. Les résultats selon l'énergie du Moldock score sont rassemblés dans le Tableau 4.2, ceux obtenus selon l'énergie de

la liaison hydrogène sont rassemblés dans le tableau 4.3. Les résultats selon l'énergie du ligand-ADN et l'énergie des interactions ligand-protéine sont résumés dans les tableaux 4.4 et 4.5, respectivement, générés à partir de ces quatre descripteurs.

Les structures des 34 meilleurs ligands sélectionnés sur la base du criblage virtuel sont illustrées dans la figure 4.7.

Tableau 4-2: Classification des dix premières poses suivant l'énergie du Moldock score

Molécule	ID/pose	E.Moldock Score (kcal/mol)	L'E L.H (kcal/mol)	N°de L.H	Interactions des résidus
1(Irrinotecan)	1612996/00	-265.15	-2.536	5	Arg364, Asp533, Thr718
2	21882279/00	-229.993	-5.442	7	Arg364
3	96316309/00	-227.305	-2.077	4	Asp533, Thr718
4	40407694/00	-227.077	-1.902	10	Arg364
5	95911711/00	-225.539	-9.747	13	Arg364,Asn352,Glu365, Tyr426
6	96399379/00	-224.825	-0.035	4	Arg364
7	72329717/00	-224.473	-0.562	13	Arg364,Thr718
8	601814/00	-224.349	-1.928	10	Arg364
9	27884431/00	-224.348	-2.289	6	Asp533, Thr718
10	27981817/00	-224.298	-2.192	8	Asp533, Thr718
Topotecan	1611274/00	-213.925	-2.479	6	Arg364, Asp533, Thr718
Camptothecin	105309/00	-189.818	-2.104	4	Asp533, Thr718

Tableau 4-3: Classification des dix premières poses suivant l'énergie de la liaison hydrogène (H) dans l'interaction Ligand – Top1

Molécule	ID/pose	E.Moldock Score (K.cal/mol)	L'E L.H (K.cal/mol)	N°de L.H	Interactions des résidus
1	95911711/00	-225.539	-9.747	13	Arg364, Asn352, Tyr426, Glu365
2	9407486/00	-206.022	-7.443	10	Arg364, Arg488,

					Asp533, Thr718
3	18968484/00	-209.558	-7.136	11	Arg364, Arg488
4	13728929/00	-196.368	-5.858	8	Arg364, Asn722, Lys532
5	80332264/00	-182.288	-5.775	6	Arg364, Arg488
6	9405527/00	-194.408	-5.447	9	Arg364, Asn722
7	21882279/00	-229.993	-5.442	7	Arg364
8	12303514/00	-216.735	-5.416	9	Arg488, Lys532, Thr718
9	33010359/00	-200.517	-5.221	10	Arg364, Thr718, Lys532
10	270395407/00	-195.684	-5.156	9	Arg364, Asn722, Thr718
Irrinotecan	1612996/00	-265.150	-2.536	5	Arg364, Asp533, Thr718
Topotecan	1611274/00	-213.925	-2.479	6	Arg364, Asp533, Thr718
Camptothecin	105309/00	-189.818	-2.104	4	Asp533, Thr718

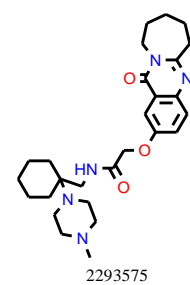
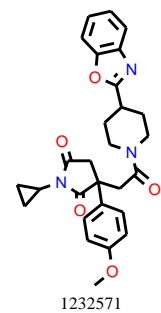
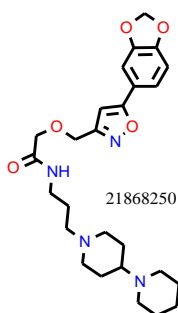
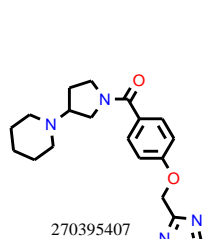
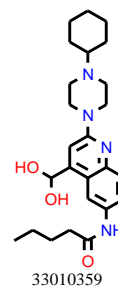
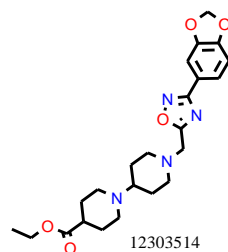
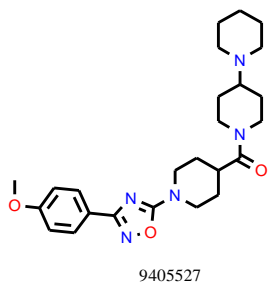
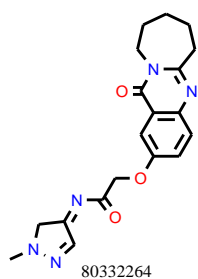
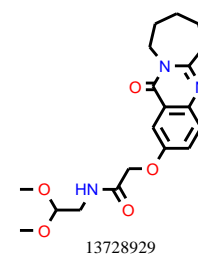
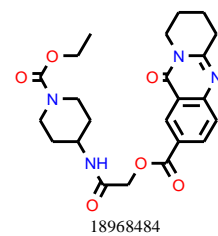
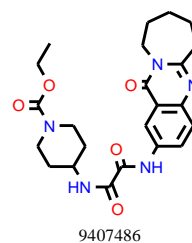
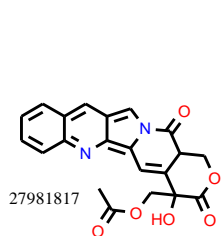
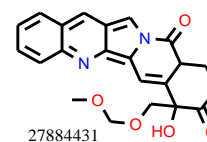
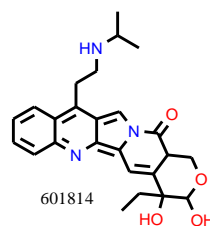
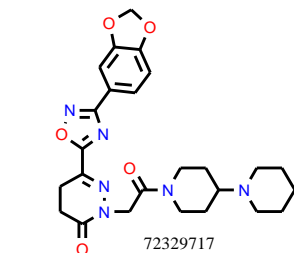
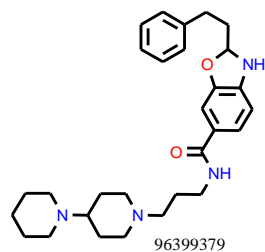
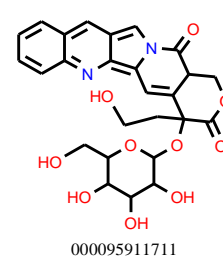
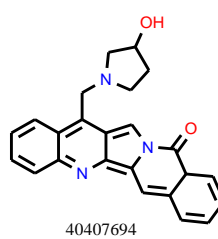
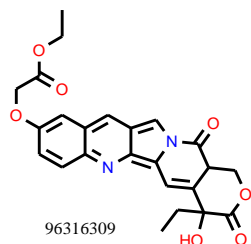
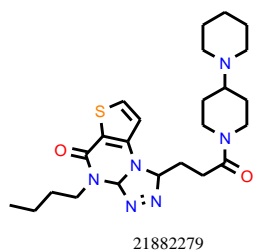
Tableau 4-4: Classification des dix premières poses suivant l'énergie d'interaction ligand-ADN

Molécule	ID/pose	E.Moldock Score (K.cal/mol)	L'énergie L.H (K. Cal/mol)	N° de L.H	Interactions des résidus
1(Irrinotecan)	1612996/00	-265.15	-2.536	5	Arg364, Asp533, Thr718
2	36369738/00	-208.625	-2.500	4	Arg364
3	34922052/00	-199.681	-2.305	6	Arg364
4	12789672/00	-220.626	-3.057	10	Arg364
5	40407694/00	-227.077	-1.902	10	Arg364
6	8603572/00	-212.594	-0.613	4	Arg364
7	96399379/00	-224.825	-0.035	4	Arg364
8	58541838/00	-209.362	-1.512	5	Asn722, Thr718

9	72329717/00	-224.473	-0.562	13	Arg364, Thr718
10	13690303/00	-221.125	-3.606	6	Arg364, Thr718
Topotecan	1611274/00	-213.925	-2.479	6	Arg364, Asp533, Thr718
Camptothecin	105309/00	-189.818	-2.104	4	Asp533, Thr718

Tableau 4-5: Classification des dix premières poses suivant l'énergie d'interaction ligand-protéine

Molécule	ID/pose	E Moldock Score (K.cal/mol)	L'E L.H (K. Cal/mol)	N° de L.H	Interactions des résidus
1	21868250/00	-206.689	-4.932	5	Arg364
2	12325713/00	-199.374	-3.360	5	Arg364, Lys374
3	22935752/00	-198.55	-3.227	7	Arg364, Tyr426
4	18968484/00	-209.558	-7.136	11	Arg364, Arg488
5	9407486/00	-206.022	-7.443	10	Arg364, Arg488, Asp533, Thr718
6	12303514/00	-217.497	-4.306	9	Arg488, Lys532, Thr718
7	8931715/00	-200.449	-2.35317	7	Arg364
8	33260536/00	-197.137	-0.726	11	Arg364, Thr718, Lys532
9	13693741/00	-201.814	-4.371	8	Arg364, Arg488, Lys532, Asn722
10	34912206/00	-195.247	0.000	0	No residues
Irrinotecan	1612996/00	-265.15	-2.536	5	Arg364, Asp533, Thr718
Topotecan	1611274/00	-213.925	-2.479	6	Arg364, Asp533, Thr718
Camptothecin	105309/00	-189.818	-2.104	4	Asp533, Thr718



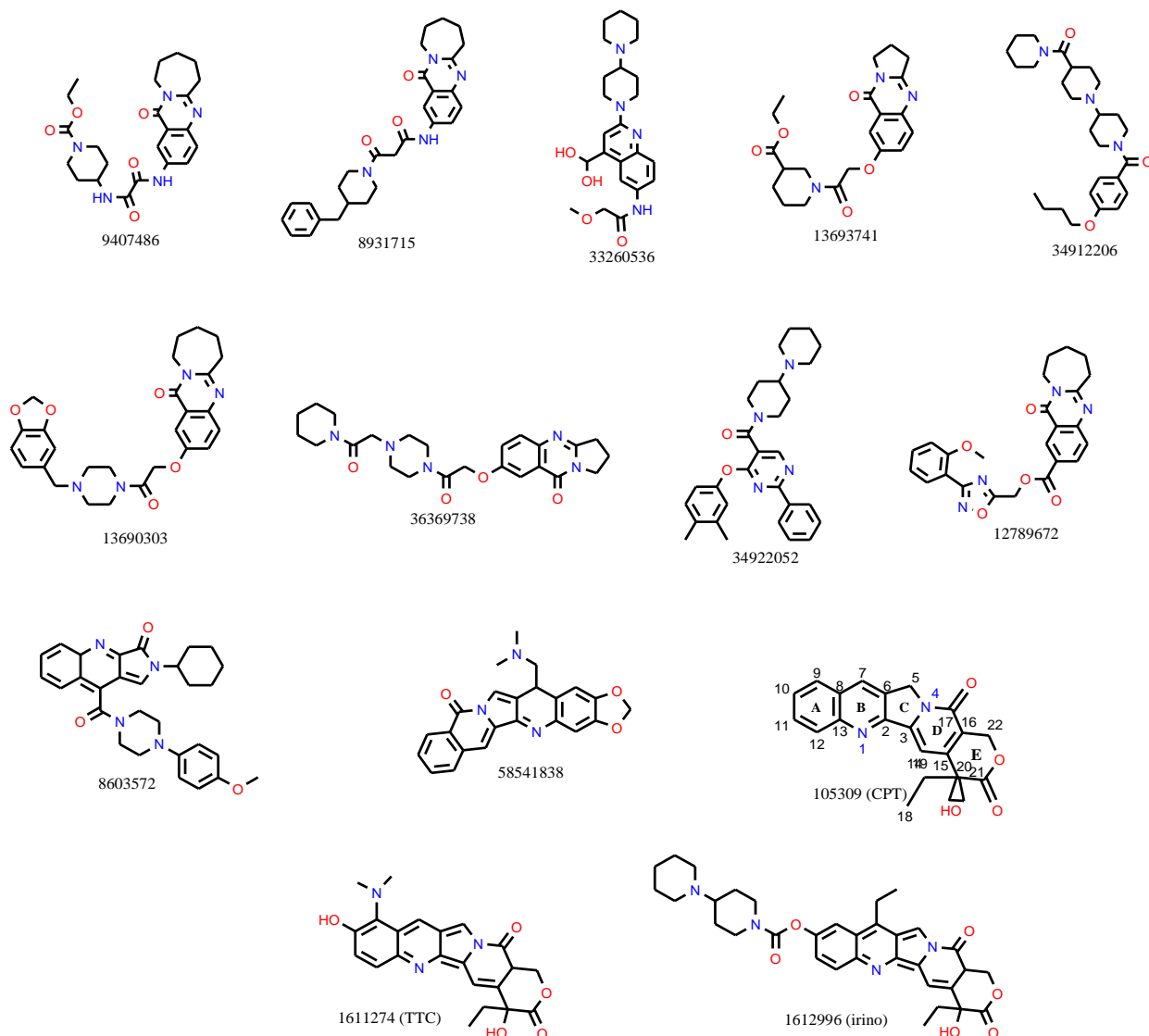


Figure 4.7: structures des 34 meilleurs ligands sélectionnés sur la base du criblage virtuel

4.2.1 Analyse des résultats

D'après les résultats obtenus, selon le vecteur d'énergie protéine-ligand les dix meilleures poses présentent huit structures similaires à la CPT, d'autre part, nous avons trouvé neuf composés similaires par rapport au vecteur d'énergie de liaison hydrogène, huit composés similaires par rapport au vecteur interaction ligand-ADN et trois composés similaires selon le vecteur énergétique de Moldock score.

L'analyse du mode d'interaction du complexe TopoI-TTC-ADN en tant que référence montre que l'effet inhibiteur de TTC est du essentiellement à :

- Une stabilisation du TTC dans le site actif avec une énergie totale de -213,925 kcal/mol.
- La formation de six liaisons hydrogène avec les résidus Arg364, Asp533 et Thr718 avec une énergie totale de -2,47 kcal/mol.

Les résultats ressortant du docking des dix meilleurs poses de chaque vecteur de notre chimiothèque, en comparaison avec le ligand de référence, sont résumés comme suit :

- Les énergies de score totale des composés similaires sont comparables à celle de la TTC, variant entre -182,288 et -229,993 kcal/mol. Il est à noter que les composés ayant les meilleures énergies de score total sont 21882279, 96399379, 72329717 et 12303514.
- Les énergies de score total de tous les composés similaires sont meilleures que celle de la CPT, qui a une valeur énergétique de -189,818 kcal/mol.
- La majorité des composés similaires montre une meilleure énergie de liaison hydrogène, en comparaison avec la référence, variant entre -0,03 et -7,44 kcal/mol. Selon le nombre de liaison hydrogène formée entre le ligand et la cible, vingt et une molécules forment de quatre à treize liaisons hydrogènes, parmi lesquelles les composés : 21882279, 96399379, 72329717, 33010359, 9407486, 18968484, 13728929....interagissent avec le résidu Arg364. En revanche, les deux molécules 12303514 et 58541838 ne forment aucune liaison hydrogène avec ce résidu et la molécule 34912206 ne forme aucune liaison hydrogène.
- L'irinotécan a la pose la mieux classée, sur la base des deux vecteurs d'interactions étudiés TopoI – ligand et ADN – ligand, avec une énergie de -265,15 kcal/mol.
- Les énergies de score totale de tous les dérivés de la CPT sont meilleurs que celles de la TTC et de la CPT à l'exception de la molécule 18968484, qui a une valeur énergétique de -209,558 kcal/mol.
- La majorité des dérivés de la CPT montre une meilleure énergie de liaison hydrogène, en comparaison avec la référence, variant entre -1,90 et -9,74 kcal/mol.

Nos résultats sont complétés par une analyse visuelle des interactions de chaque molécule avec Topo I-ADN.

Le composé 1612996 (Irinotécan) est classé en premier pour les deux vecteurs (ADN-ligand et score de Moldock), qui fournit un complexe enzyme-inhibiteur hautement stabilisé, ainsi qu'une

énergie de -265,15 kcal/mol. La molécule est bien centrée dans la région du site actif de l'enzyme et forme des interactions de liaison hydrogènes. La première liaison H établie avec l'atome d'azote du cycle pyridinique (cycle B) et l'atome d'azote de résidu Arg364 (=N...H-N (Arg364)) d'une longueur de 3,4880 Å, une seconde liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle en position 20 et le carbonyle du résidu Asp533 (O-H...O=C (Asp533)) avec une longueur de 2,60496 Å. L'oxygène du cycle pyranonique (cycle E) forme une troisième liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle du résidu Thr718 (O...HO(Thr718)). De plus, deux liaisons hydrogène sont identifiées séparément ; une liaison est entre l'ADN et le groupe carbonyle du cycle de la pyridinonique (cycle D), et l'autre est établie entre l'ADN et l'atome d'azote du cycle B. Enfin, l'Irinotécan est stabilisé par les interactions de Van Der Waals (Figure 4.8).

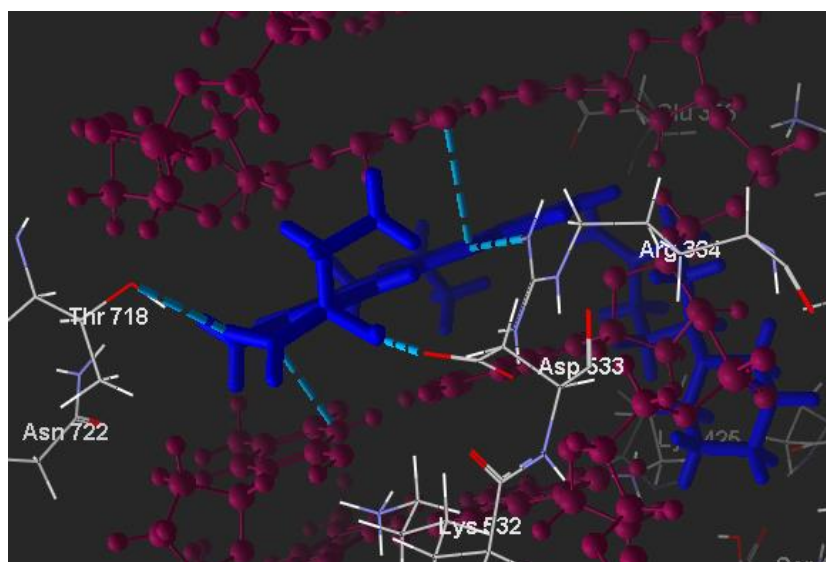


Figure 4.8: Interactions entre l'Irinotécan et le complexe ADN-topo1

Le composé 21882279 est une molécule similaire au CPT, bien centralisée dans le site actif de l'enzyme et classée dans la seconde pose selon le vecteur MolDock Score avec une valeur énergétique de -229,993 kcal/mol. Ainsi, le résidu Arg364 semble être le résidu interagissant significativement dans le site actif, dans lequel on a remarqué qu'il y a une formation de deux liaisons hydrogène entre les acides aminés et les atomes d'azote du cycle triazole (=N... H-N (Arg364)). Leurs longueurs de liaisons correspondantes sont respectivement de 2,59 et 2,89 Å. De plus, la stabilité de ce composé est renforcée par quatre interactions de liaison H formées entre la base de l'ADN et les atomes d'azote du cycle triazole et le groupe carbonyle du cycle pyridazinone (Figure 4.9). Par conséquent, l'inhibition du composé 21882279 pourrait être attribuée aux interactions stériques qui ont lieu dans le complexe formé.

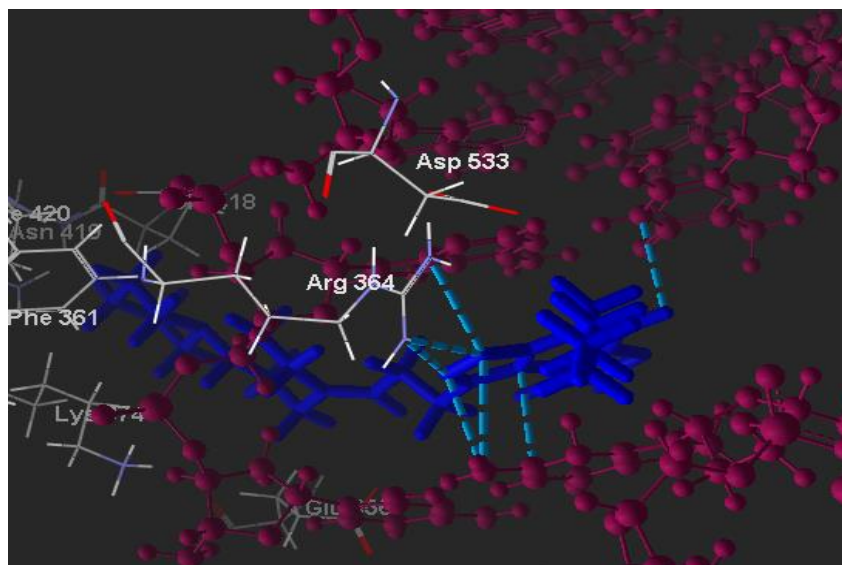


Figure 4.9: Interactions entre le composé 21882279 et le complexe ADN-topo1

Les composés : 96316309 (Figure 4.10 (A)), **40407694** (Figure 4.10 (B)) et **95911711** (Figure 4.10 (C)), dérivés de la CPT sont également bien centrés dans la région du site actif de l'enzyme. Ces molécules présentent des liaisons hydrogènes avec les résidus : Asp533, Thr718, Arg364, Asn352, Glu365 et Tyr426, rendant les complexes formés plus stables et ils sont stabilisés aussi par des interactions de Van der Waals avec la base d'ADN et les résidus enzymatiques.

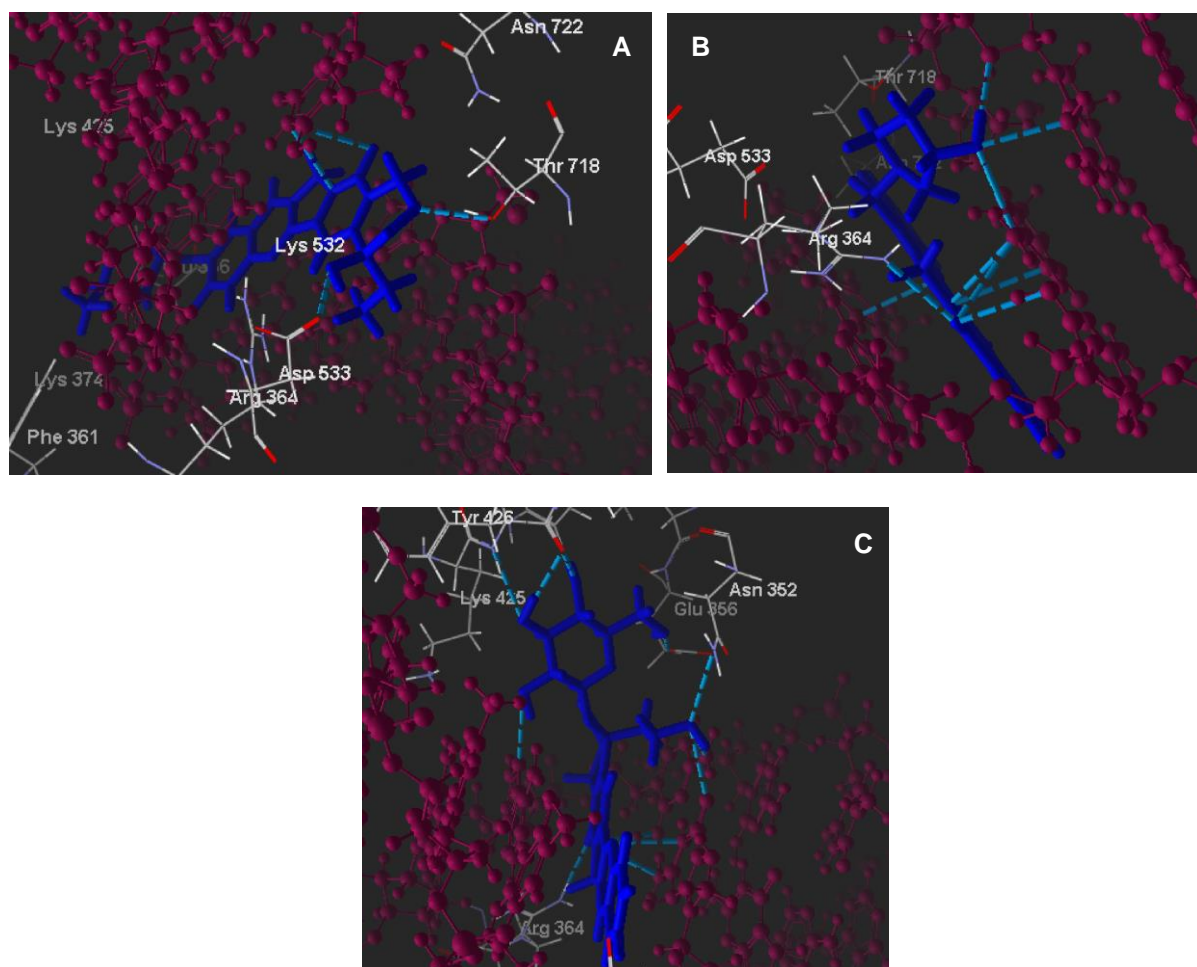


Figure 4.10: interactions entre le composé 96316309 et le complexe ADN-topo1, (B) interactions entre le composé 40407694 et le complexe ADN-topo1, (C) interactions entre composé 95911711 et le complexe ADN-topo1.

D'autre part, **les deux composés 9407486 et 18968484** sont des molécules similaires au CPT, classées respectivement dans les deuxième et troisième poses comme prédit par les résultats du vecteur de liaison H. Ces molécules sont bien centralisées dans le site actif de l'enzyme, montrant six liaisons hydrogène avec des résidus d'acides aminés (Arg488, Thr718, Arg364 et Asp533) pour **le composé 9407486** (Figure 4.11 (D)), et quatre liaisons hydrogène avec des résidus (Arg364, Arg488 et Thr718) pour **le composé 18968484** (Figure 4.11 (E)). En outre, les deux composés présentent des liaisons hydrogène avec l'ADN et des interactions stériques.

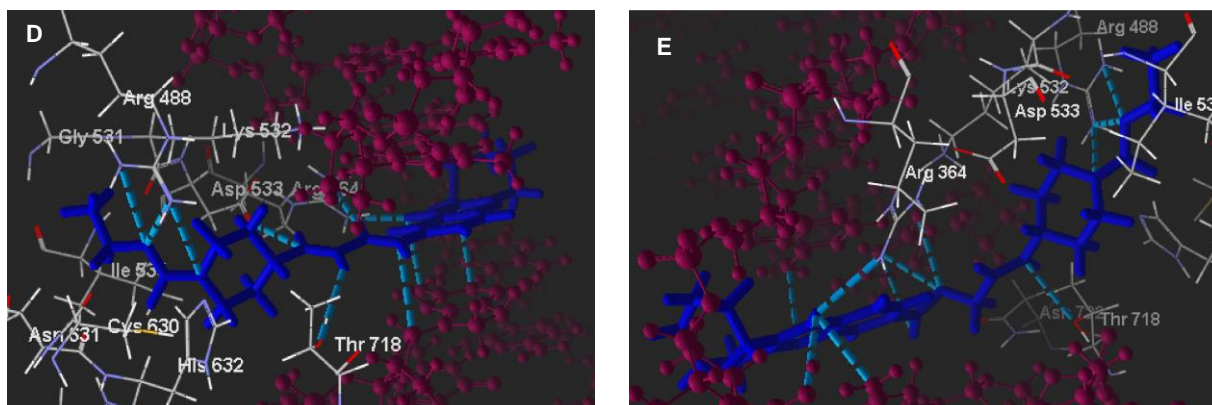


Figure 4.11: (D) interactions entre le composé 9407486 et le complexe ADN-topo1, (E) interactions entre le composé 18968484 et le complexe ADN-topo1.

Par ailleurs, **les deux composés 21868250, 12327513** sont similaires au CPT avec des énergies de score de -206,689 kcal/mol et -199,374 kcal/mol et sont classés en première et deuxième poses par rapport au vecteur protéine-ligand respectivement. Ces molécules sont bien centrées dans le site actif de l'enzyme, **le composé 21868250** présente une liaison hydrogène avec le résidu Arg364 de longueur 2,96761 Å et quatre liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.12 (F)). **Le composé 12327513** a établi une liaison hydrogène avec le résidu Arg364 et une seconde liaison avec le résidu Lys374 et trois autres liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.12 (G)). De plus, ces deux molécules sont stabilisées par des interactions de Van Der Waals

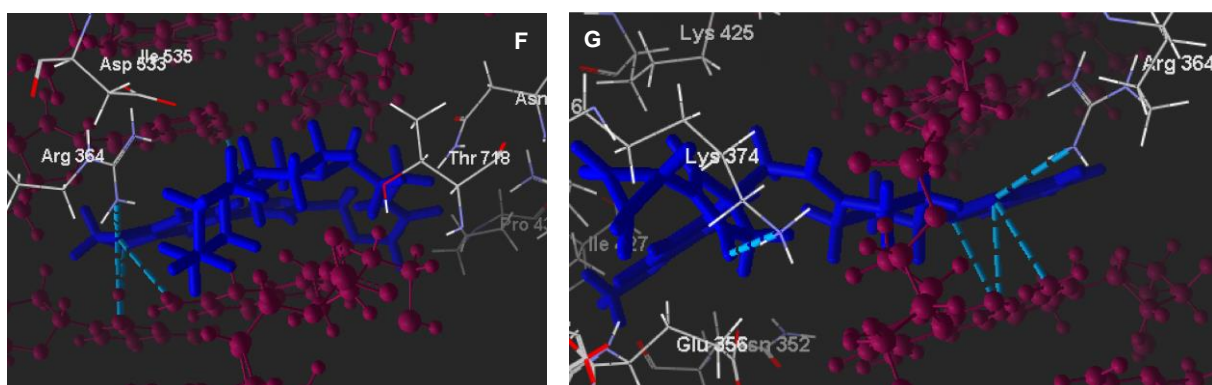


Figure 4.12: (F) interactions entre le composé 21868250 et le complexe ADN-topo1, (G) interactions entre le composé 12327513 et le complexe ADN-topo1.

De même, les composés **36369738**, **34922052** identifiés comme similaires au CPT, présentent une énergie de score comprise entre -208,62 kcal/mol et -199,68 kcal/mol. Ils sont classés, respectivement, dans la deuxième et la troisième pose comme prédit par le descripteur ADN-ligand. Les deux molécules sont bien insérées dans la cavité de l'enzyme, le composé **36369738** a montré une liaison hydrogène avec le résidu Arg364 de 2,86Å de longueur et trois liaisons avec l'ADN (Figure 4.13(H)). Le composé **34922052** a établi une liaison hydrogène avec le résidu Arg364 de longueur 2,73 Å et quatre liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.13 (I)). De plus, ces deux molécules sont également stabilisées par l'ADN et le résidu Arg364 par des interactions stériques.

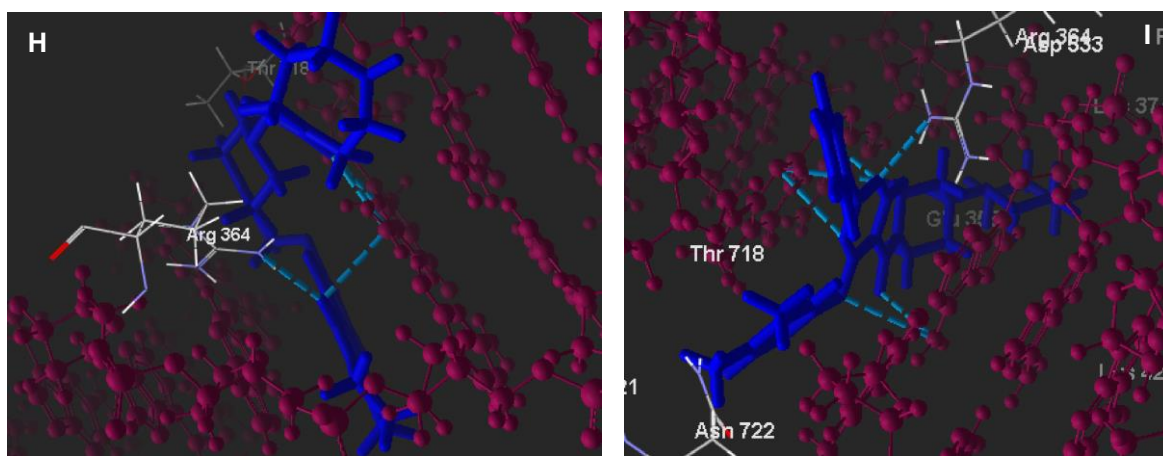


Figure 4.13: (H) interactions entre le composé 36369738 et le complexe ADN-topo1, (I) interactions entre le composé 34922052 et le complexe ADN-topo1.

En conclusion, une étude d'amarrage moléculaire a été menée afin de comprendre l'interaction de liaison entre un ensemble de 24 inhibiteurs similaires à la camptothécine et le complexe topo1-ADN. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que :

- Les ligands les mieux classés ont montré de fortes interactions stériques ADN-ligand.
- Tous les composés similaires représentent, du point de vue énergétique, une bonne affinité avec les résidus du site actif, en raison de leurs structures moléculaires hétérocycliques et conjuguées. Cette affinité est due essentiellement à la présence des interactions de liaisons hydrogène ainsi que des interactions stériques de type π - π (Van Der Walls). Ce qui nous permet de prédire un caractère inhibiteur prometteur de ces molécules

4.3 Docking moléculaire de la deuxième chimiothèque

Après la préparation de la deuxième chimiothèque, nous avons lancé le criblage virtuel à l'aide du Molegro Virtual Docker avec les paramètres cités dans la section précédente. Les calculs ont été terminés après quatre jours, et on a obtenu 4004 poses classées suivant leurs valeurs de Moldock Score comme fonction de score. Une vingtaine de poses (Figure 4.14) avec les meilleures valeurs énergétiques sont retenues et présentées dans le tableau 4.6.

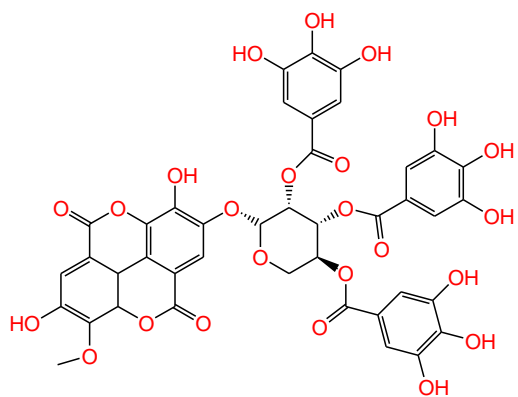
Tableau 4-6: Les énergies d'interaction Moldock Score des vingt meilleures poses obtenues

		Interactions externes						Interactions Internes			
		Interactions Protéine-ligand				Interactions Cofacteur-ligand		Interactions Ligand-ligand			
Molécule	Energie Totale (K.cal/mol)	L'énergie L.H (K.cal/mol)	Stérique by PLP (K.cal/mol)	Electrostatique (K.cal/mol)		L'énergie L.H (K.cal/mol)	Stérique by PLP (K.cal/mol)	Electrostatique (K.cal/mol)	Torsion strain (K.cal/mol)	Stérique by PLP (K.cal/mol)	Electrostatique (K.cal/mol)
				Short range	Long range						
1	-352.335	-2.499	-38.187	0.000	0.000	-30.285	-280.997	0.000	24.780	26.526	0.000
2	-334.827	-11.741	-47.381	0.000	0.000	-45.725	-252.324	0.000	21.137	56.741	0.000
3	-334.188	-13.762	-63.835	0.000	0.000	-43.170	-223.635	0.000	12.092	67.240	0.000
4	-322.133	-16.512	-91.154	0.000	0.000	-25.645	-148.336	0.000	29.411	1.613	0.000
5	-319.231	-12.242	-85.543	0.000	0.000	-21.305	-209.854	0.000	5.281	63.872	0.000

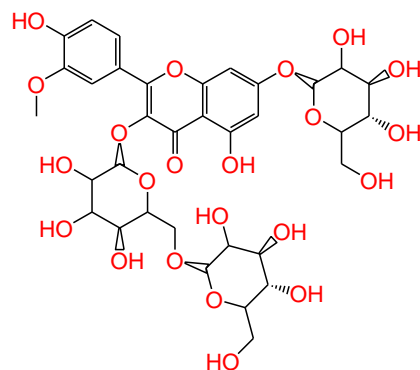
6	-309.268	-7.695	-67.429	0.000	0.000	-30.349	-194.312	0.000	18.285	52.653	0.000
7	-306.681	-9.269	-80.732	0.000	0.000	-26.963	-214.553	0.000	15.266	57.236	0.000
8	-302.752	-12.560	-73.463	0.000	0.000	-15.240	-167.333	0.000	20.284	-1.363	0.000
9	-297.144	-11.749	-60.566	0.000	0.000	-26.555	-199.342	0.000	9.531	29.976	0.000
10	-294.952	-3.713	-53.863	0.000	0.000	-24.669	-209.386	0.000	14.439	34.722	0.000
11	-292.118	-14.620	-64.423	0.000	0.000	-10.142	-198.682	0.000	19.731	78.686	0.000
12	-281.987	-2.726	-52.821	0.000	0.000	-22.543	-181.683	0.000	5.561	32.337	0.000
13	-277.470	-8.858	-63.806	0.000	0.000	-21.452	-178.956	0.000	14.870	40.332	0.000
14	-272.533	-13.136	-131.184	0.000	-7.217	-30.792	-115.724	9.838	1.552	84.967	0.000
15	-268.664	-6.158	-34.967	0.000	0.000	-29.686	-192.802	0.000	25.082	47.742	0.000
16	-256.426	-3.185	-116.178	0.000	0.000	-16.060	-130.796	0.000	2.957	69.099	0.000

17	-253.279	-4.394	-42.395	0.000	0.000	-25.709	-199.865	0.000	5.554	45.853	0.000
18	-243.728	-8.060	-38.992	0.000	0.000	-12.042	-198.818	0.000	6.425	58.327	0.000
TTC	-224.996	-4.596	-32.707	-2.534	6.860	-1.797	-188.441	-9.145	0.133	17.047	0.000
20	-202.796	-9.647	-98.794	0.000	0.000	-11.833	-115.447	0.000	0.972	72.546	0.000
21	-187.083	-2.950	-9.668	0.000	0.000	-13.597	-158.036	0.000	0.000	18.770	0.000

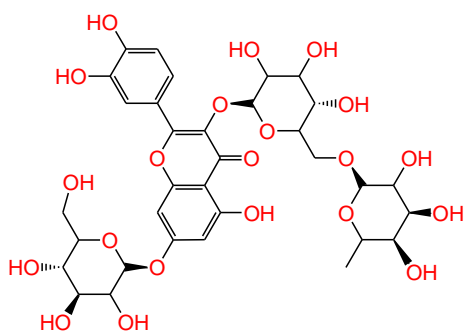
Nous avons représenté dans la figure 4.14 les structures des vingt molécules obtenues.



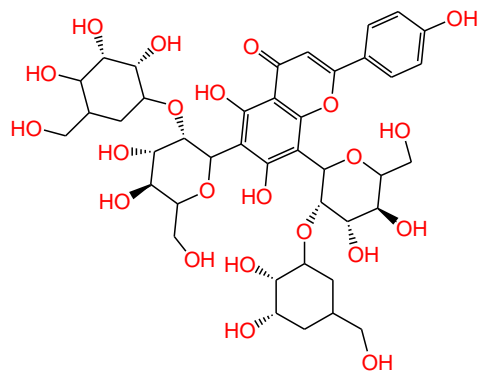
1- acide 3'-O-methyl-4-O-(n''-O-galloyl-beta-D-xylopyranosyl) élлагique



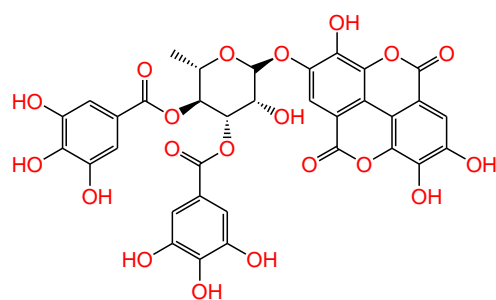
2- isorhalnetin-3-gentiobioside-7-glucoside



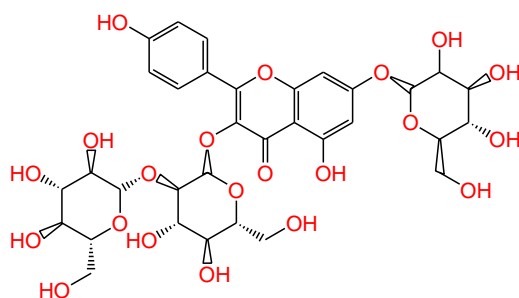
3- quercetin-3-rutinoside-7-glucoside



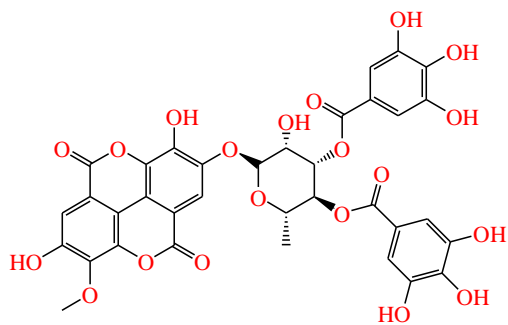
4- 2'',2'''-di-O-beta-glucopyranosyl-vicenin II



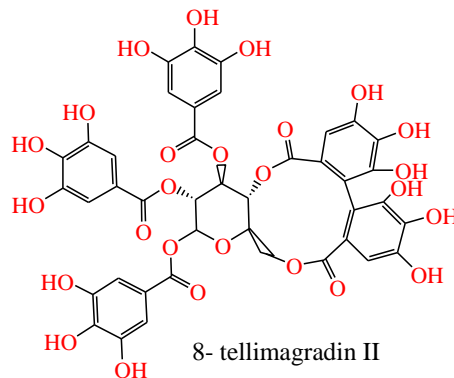
5- acide 4-O-(3'',4''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) élлагique



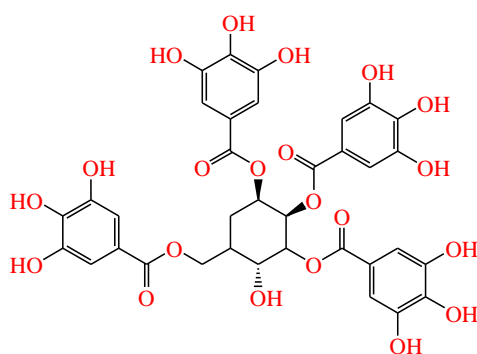
6- kaempferol -3-sophoroside-7-glucoside



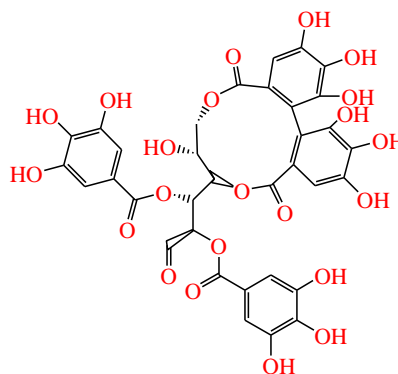
7- acide 3'-O-méthyl-4-O-(3'',4''-di-O-galloyl- α -L-rhamnopyranosyl)éllagique



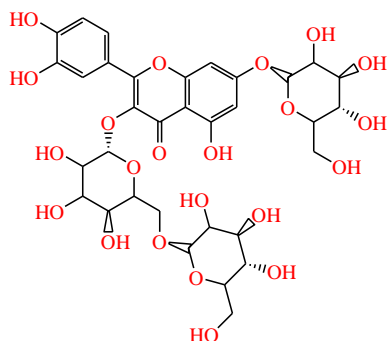
8- tellimagradin II



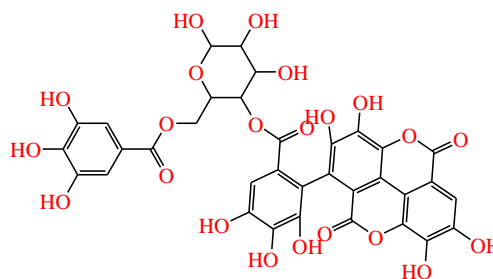
9- gallotannin- 1,2,3,6- tetra- O- galloyl- beta- D- glucose



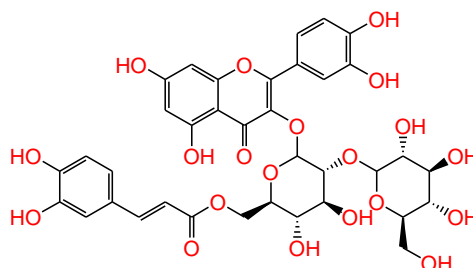
10- tellimagrandin I



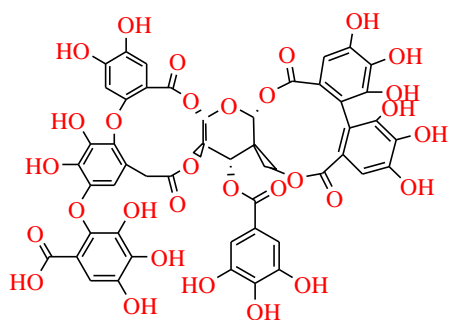
11- quercetin -3-gentiobioside -7-glucoside



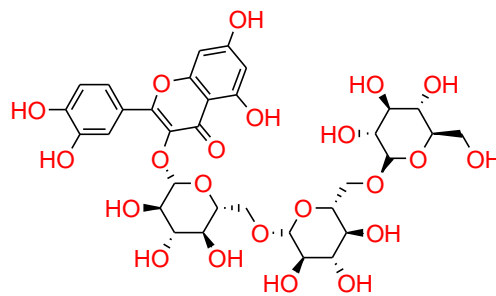
12- terflavin B



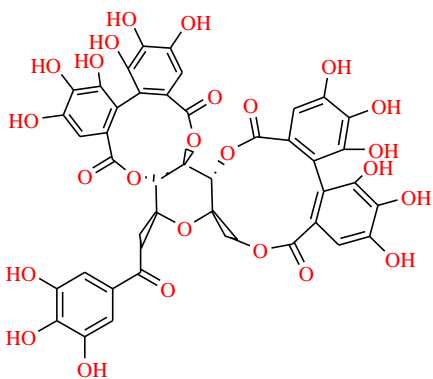
13- quercetin-3-O-(6'-cafféoyl)-sophoroside



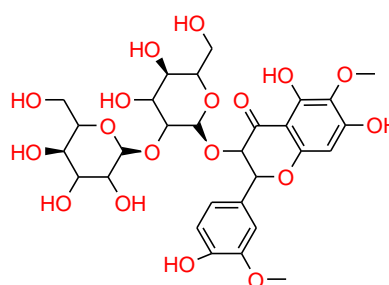
14- nilotinin M4



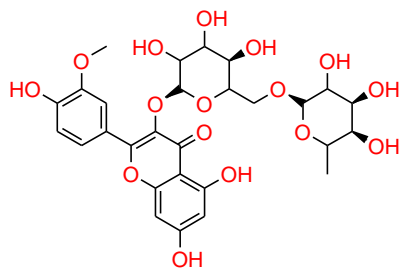
15- quercetin- 3 -gentiotrioside



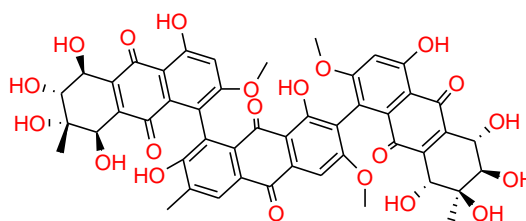
16- 2,3,4,6-bis-hexahydroxydiphenyl
-I-galloyl-beta-glucose



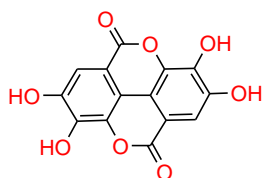
17- spinacetin-3-diglucoside



18- isorhamnetin-3-robinobioside



19- stemphyllanthranol B



21- acide éllagique

Figure 4.14 : Structures des vingt molécules obtenues

4.3.1 Analyse des résultats

D'après le tableau, on remarque que :

- L'énergie des interactions stériques de type Van Der Waals entre le ligand et la protéine est toujours une valeur inférieure par rapport à l'énergie de la liaison hydrogène, ce qui signifie que la contribution de la liaison stérique à la stabilité du complexe est supérieure à la contribution de la liaison hydrogène. Il en va de même pour les interactions ADN-ligand.
- L'énergie de la liaison stérique entre le ligand et la protéine dépasse l'énergie de la liaison stérique entre le ligand et l'ADN.
- L'énergie externe engendrée lors de l'interaction du ligand avec l'ADN renforce de façon remarquable la stabilité du complexe ternaire « Enzyme-ligand-ADN ».
- L'énergie stérique ADN-ligand est le premier facteur responsable de la cohésion du complexe ternaire, suivie par l'énergie stérique ligand-protéine, ensuite l'énergie de la liaison hydrogène de l'interaction ligand-ADN et enfin l'énergie de la liaison d'hydrogène de l'interaction ligand-protéine.
- Les interactions électrostatiques ne contribuent pas à la stabilité du complexe ternaire.
- Les valeurs d'énergie totale de molécules sélectionnées varient de -352.335 à -187.083 kcal/mol, tandis que celle de la molécule de référence « TTC » est de -224.996 Kcal/mol. Ainsi, l'énergie d'interaction ligand – protéine de ces poses est limitée entre -151.536 et -12.618 Kcal/mol, cependant l'énergie d'interaction protéine-TTC est estimée à -32.707 Kcal/mol.

On observe également que l'énergie de l'interaction Ligand – ADN varie dans un intervalle de -311.282 à -127.279 Kcal/mol, alors que l'énergie ADN-TTC est de -199.382 Kcal/mol.

Ces résultats suggèrent que ces composés peuvent avoir une meilleure affinité que le composé de référence et donc une meilleure stabilité au site actif.

Analyse visuelle des dix premières poses :

La molécule N°1 est l'acide 3'-O-méthyl-4-O-(n"-O-galloyl-beta-D-xylopyranosyl) ellagique, qui est bien centralisée dans le site actif de l'enzyme et classée dans la première pose selon l'énergie MolDock Score avec une valeur de -352,335 kcal/mol. La molécule forme six liaisons hydrogène avec les résidus de l'enzyme dont la première se trouve entre le (HO...Gly363 ; d= 3.10 Å), la deuxième entre (CO...Arg364 ; d= 2.77Å), la troisième entre

(CO...Arg364 ; d= 2.39 Å), la quatrième entre (CO...Asn722 ; d= 2.59 Å), la cinquième entre (CO...Asn722 ; d= 3.22 Å) et la sixième entre (H₃CO...Lys751 ; d= 3.30 Å) (Figure 4.15). Cette molécule présente également treize liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.16) et des interactions de type Van der Waals ont également été détectés entre le ligand et les résidus : Asn722, Lys751, Pro431, Leu721, Arg364 et Gly363.

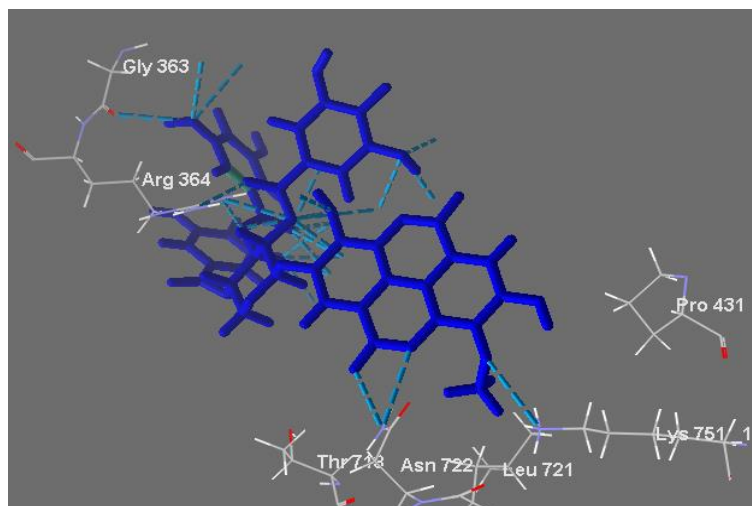


Figure 4.15: Interactions de la 3'-O-méthyl-4-O-(n'-O-galloyl-beta-D-xylopyranosyl) ellagique acid avec la Topo 1

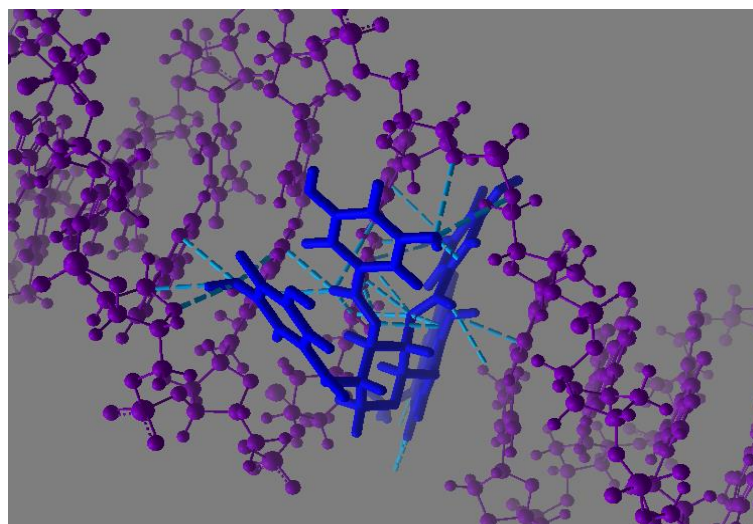


Figure 4.16: Interactions de l'acide 3'-O-méthyl-4-O-(n'-O-galloyl-beta-D-xylopyranosyl) ellagique avec l'ADN

La molécule 2, l'isorhamnetin-3-gentiobioside-7-glucoside, classée en seconde pose présente une énergie du complexe formé d'une valeur de -334.827 kcal/mol. Sur la Figure 4.17, la molécule forme cinq liaisons hydrogène dont la première se trouve entre le (HO...Asp533 ; d= 3.12 Å), la deuxième entre (HO...Arg364 ; d= 2.85 Å), la troisième entre (CO...Arg364 ; d= 2.51 Å), la quatrième entre (CO... Arg364 ; d= 3.52 Å) et la cinquième entre (HO...Asp533 ; d= 2.60 Å). En outre cette molécule présente dix huit liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.18) et des liaisons stériques avec les résidus : Asp533, Lys374, Arg364 et Glu418.

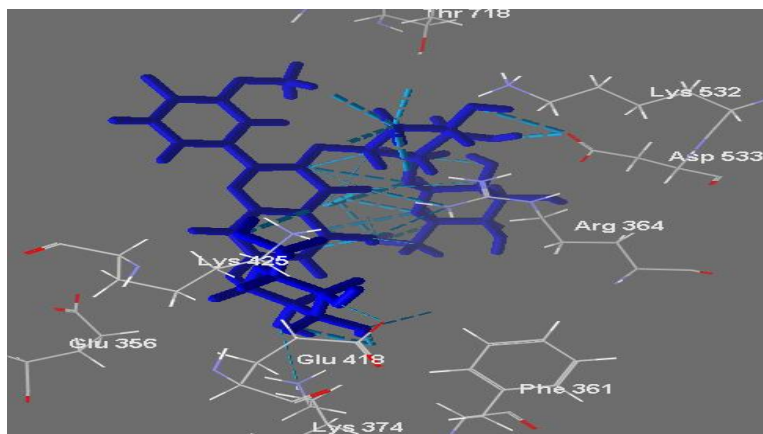


Figure 4.17 : Interactions de l'isorhamnetin-3-gentiobioside-7-glucoside avec la Topo 1

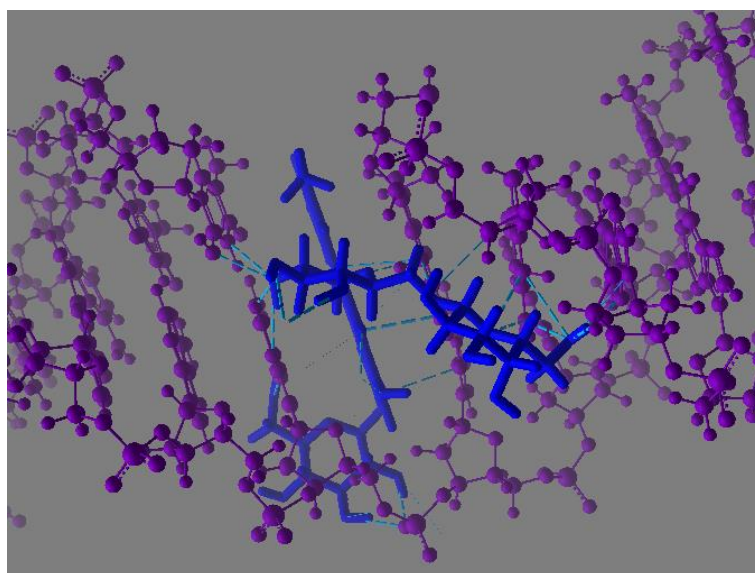


Figure 4.18 : Interactions de l'isorhamnetin-3-gentiobioside-7-glucoside avec l'ADN

La molécule 3 est la quercetine-3-rutinoside-7-glucoside. Elle est classée en troisième pose, et bien insérée dans la cavité de l'enzyme. Sur la figure 4.19, la molécule montre sept liaisons

hydrogène dont la première se trouve entre le (HO...Glu356 ; d= 3.10 Å), la deuxième entre (HO...Tyr426 ; d= 3.11 Å), la troisième entre (CO...Arg364 ; d= 3.27 Å), la quatrième entre (CO... Arg364 ; d= 3.49 Å), la cinquième entre (HO...Thr718 ; d= 3.45 Å), la sixième entre (HO... Asn722 ; d= 2.67 Å) et la septième entre (HO...Gly363 ; d= 3.19 Å). De plus cette molécule présente seize liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.20) et des liaisons stériques avec les résidus : Arg364 et Gly363.

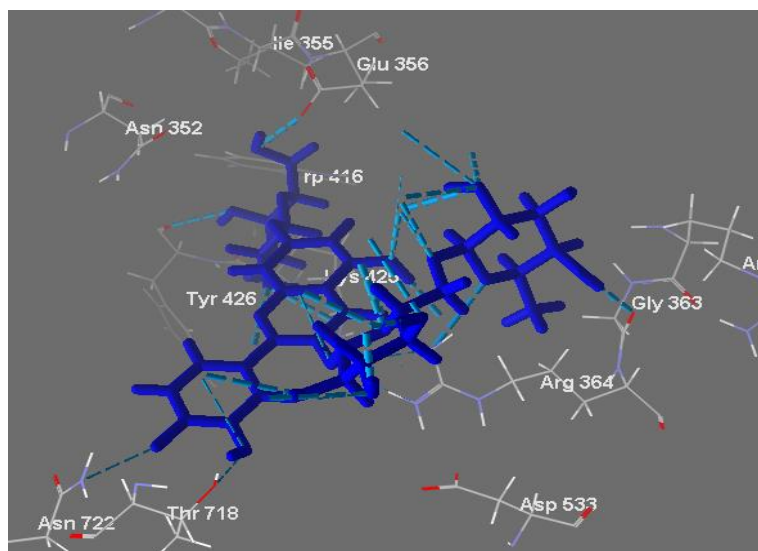


Figure 4.19: Interactions de la quercetine-3-rutinoside-7-glucoside avec la Topo 1

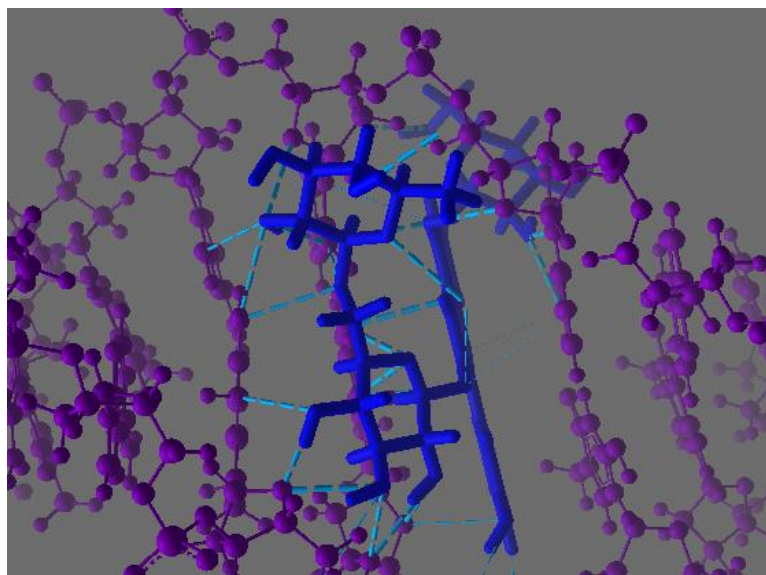


Figure 4.20: Interactions de la quercetine-3-rutinoside-7-glucoside avec l'ADN

La molécule 4, la 2'',2'''-di-O-beta-glucopyranosyl-vicenin II, est bien centralisée dans le site actif de l'enzyme avec une énergie MolDock Score de -322,133 kcal/mol. L'analyse visuelle du complexe nous révèle quatre liaisons hydrogène avec les résidus de l'enzyme dont la première se trouve entre le (HO...Asn722 ; d= 2.63 Å), la deuxième entre (HO...Lys425 ; d= 3.10Å), la troisième entre (HO...Tyr426 ; d= 3.09 Å) et la quatrième entre (HO...Tyr426 ; d= 3.07 Å) (Figure 4.21). Cette molécule présente aussi treize liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.22) et des interactions de type Van der Waals avec les résidus : Asn722, Lys425, Ala351 et Asn352.

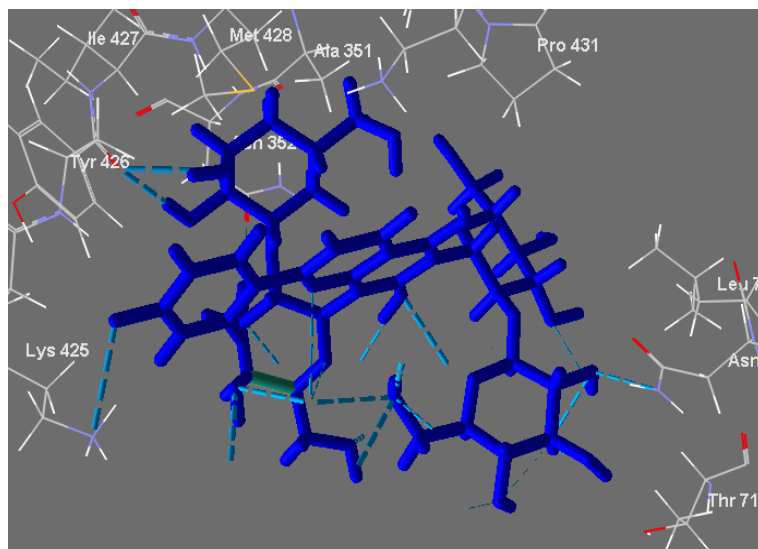


Figure 4.21: Interactions de la 2'',2'''-di-O-beta-glucopyranosyl-vicenin II avec la Topo 1

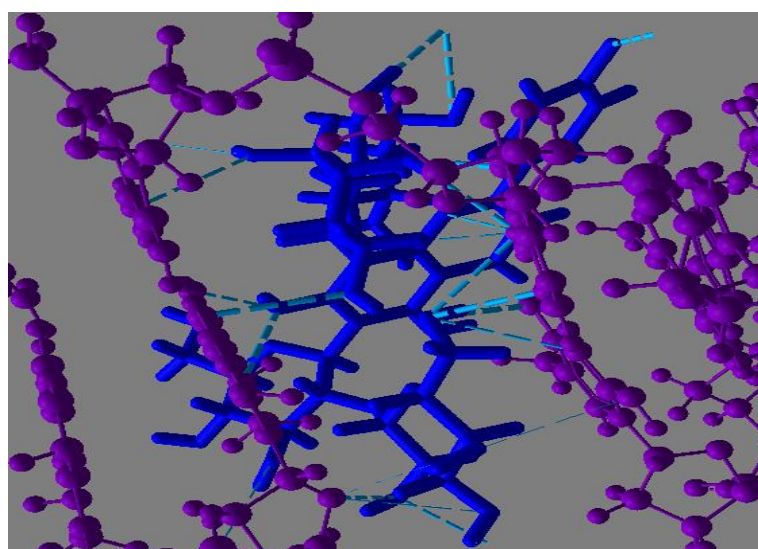


Figure 4.22: Interactions de la 2'',2'''-di-O-beta-glucopyranosyl-vicenin II avec l'ADN

La molécule 5 est l'acide 4-O-(3'',4''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique, elle est bien centrée dans la région du site actif de l'enzyme et elle présente sept liaisons hydrogène dont la première se trouve entre le (HO...Asp533 ; d= 3.01 Å), la deuxième entre (HO...Asp533 ; d= 2.62 Å), la troisième entre (CO...Arg364 ; d= 3.04 Å), la quatrième entre (CO... Arg364 ; d= 3.03 Å), la cinquième entre (CO...Arg364 ; d= 3.26 Å), la sixième entre (CO... Asn722 ; d= 3.10 Å) et la septième entre (HO...Lys425 ; d= 2.65 Å) (Figure 4.23). De plus cette molécule présente dix liaisons hydrogène avec l'ADN et des interactions stériques avec les résidus enzymatiques (Figure 4.24).

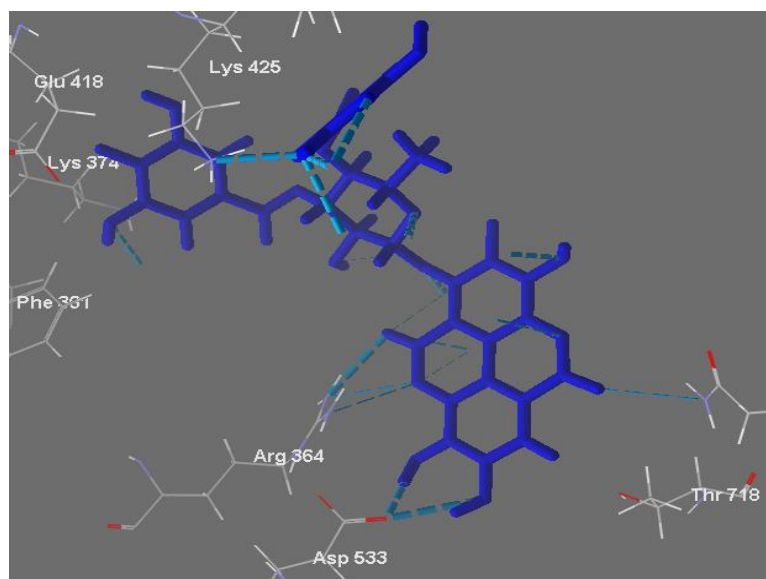


Figure 4.23: Interactions de l'acide 4-O-(3'',4''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique avec la Topo 1

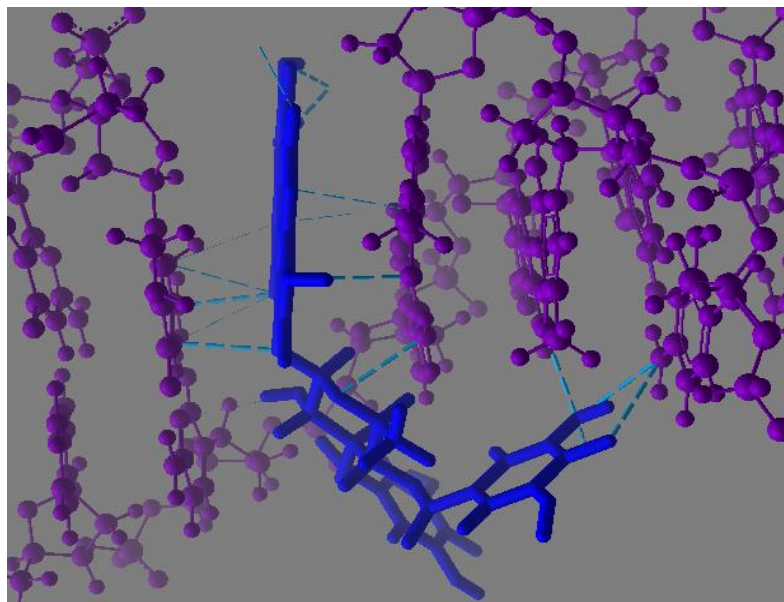


Figure 4.24: Interactions de l'acide 4-O-(3'',4''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique avec l'ADN

La molécule 6, la kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside est bien centralisée dans le site actif de l'enzyme. L'analyse visuelle du complexe nous montre six liaisons hydrogène avec les résidus de l'enzyme dont la première se trouve entre le (HO...Glu356 ; $d= 3.10 \text{ \AA}$), la deuxième entre (HO...Tyr426 ; $d= 2.98 \text{ \AA}$), la troisième entre (HO...Met428 ; $d= 3.31 \text{ \AA}$), la quatrième entre (HO...Thr718 ; $d= 2.6 \text{ \AA}$), la cinquième entre (CO...Arg364 ; $d= 3.35 \text{ \AA}$) et la sixième entre (CO... Arg364 ; $d= 3.55 \text{ \AA}$) (Figure 4.25). Cette molécule présente également dix liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.26) et des interactions de type Van der Waals avec les résidus : Asn352, Arg364, Glu356 et Asn352.

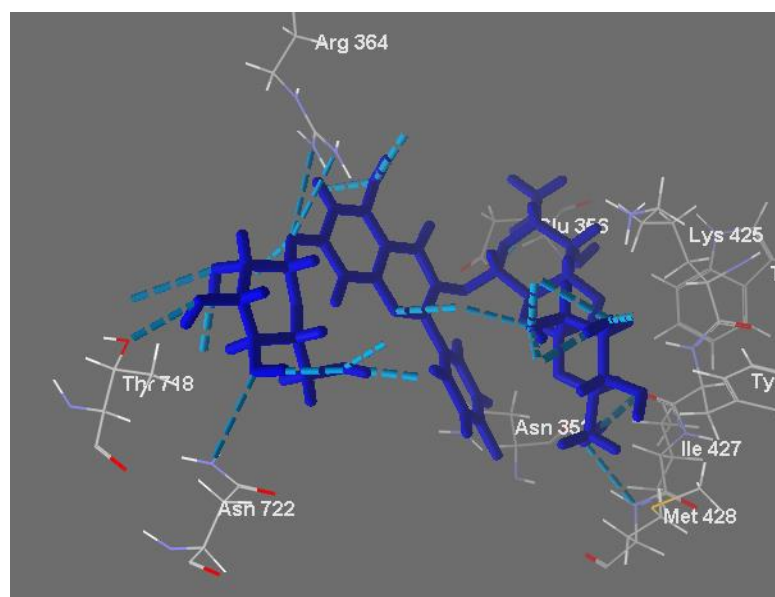


Figure 4.25: Interactions de la kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside avec la Topo 1

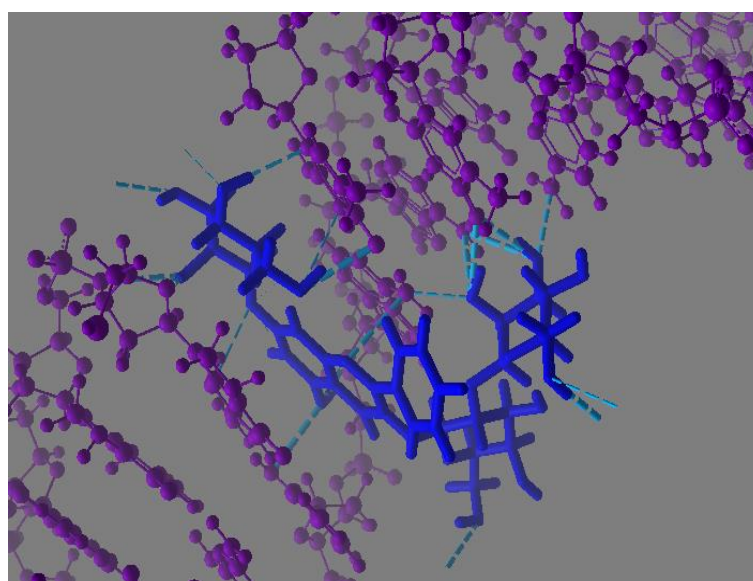


Figure 4.26: Interactions de la kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside avec l'ADN

La molécule 7 est l'acide 3'-O-méthyl-4-O-(3'',4''-di-O-galloyl- α -L-rhamnopyranosyl) ellagique qui est classée en septième pose, et bien insérée dans la cavité de l'enzyme. Sur la Figure 4.26, la molécule montre cinq liaisons hydrogène dont la première se trouve entre le (HO...Thr718 ; d= 3.17 Å), la deuxième entre (HO...Lys425 ; d= 2.63 Å), la troisième entre (CO...Arg364 ; d= 3.43 Å), la quatrième entre (CO... Arg364 ; d= 2.73 Å) et la cinquième

entre (CO...Arg364 ; d= 2.54 Å). Cette molécule présente également dix liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure4.27) et des liaisons stériques avec les résidus : Arg364,Lys425, Thr718 et Tyr426.

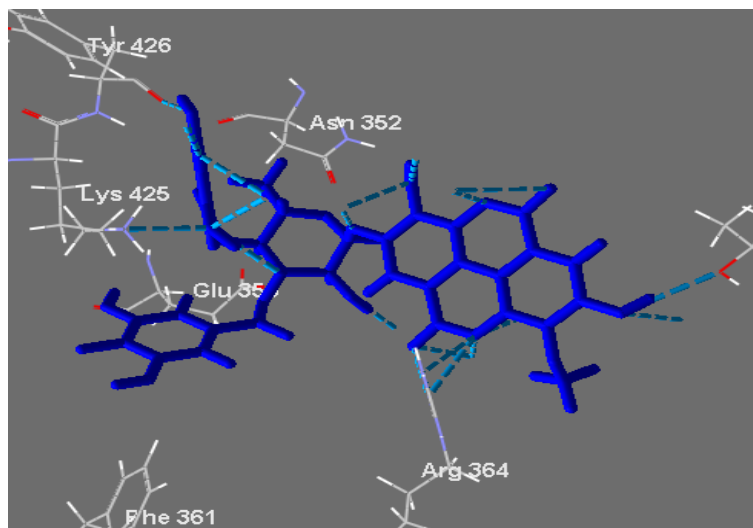


Figure 4.27: Interactions de l'acide 3'-O-méthyl-4-O-(3'',4''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique avec la Topo 1

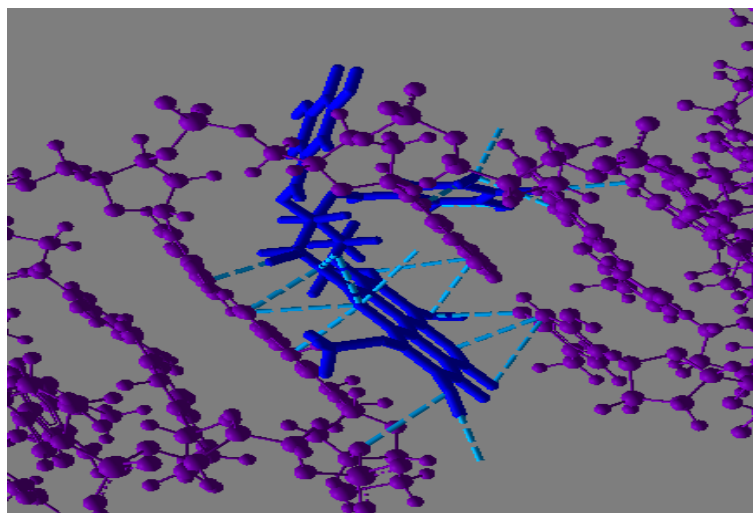


Figure 4.28: Interactions de l'acide 3'-O-méthyl-4-O-(3'',4''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique avec l'ADN

La molécule 8, la tellimagrandine II est bien centrée dans la région du site actif de l'enzyme et elle présente huit liaisons hydrogène dont la première se trouve entre le (CO...Asn352 ; d= 2.89 Å), la deuxième entre (HO...Lys436 ; d= 2.59 Å), la troisième entre (HO...Tyr426 ; d=

3.27 Å), la quatrième entre (HO...Tyr426 ; d= 3.10 Å), la cinquième entre (HO...Tyr426 ; d= 3.45 Å), la sixième entre (HO...Tyr426 ; d= 3.11 Å), la septième entre (HO...Asn722 ; d= 3.02 Å) et la huitième entre (HO...Lys425 ; d= 3.43 Å) (Figure 4.28). D'autre part, cette molécule présente onze liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.29) et des interactions stériques avec les résidus enzymatiques.

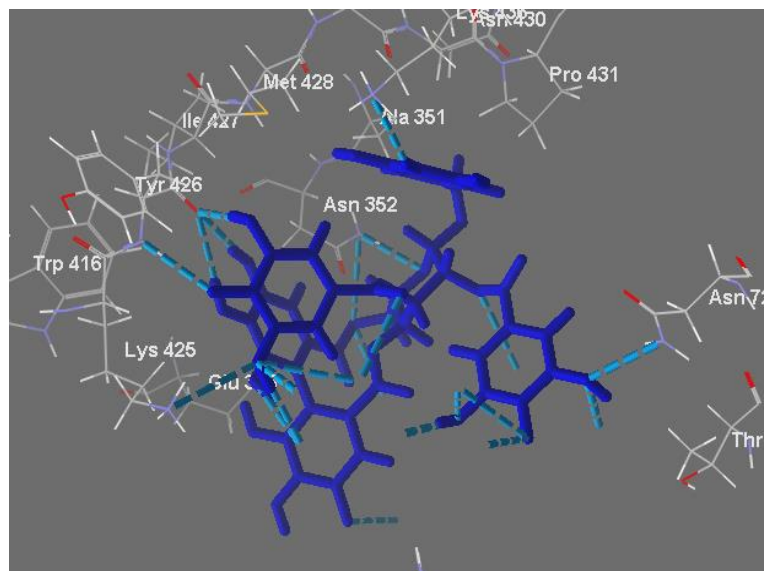


Figure 4.29: Interactions de la tellimagrandine II avec la Topo 1

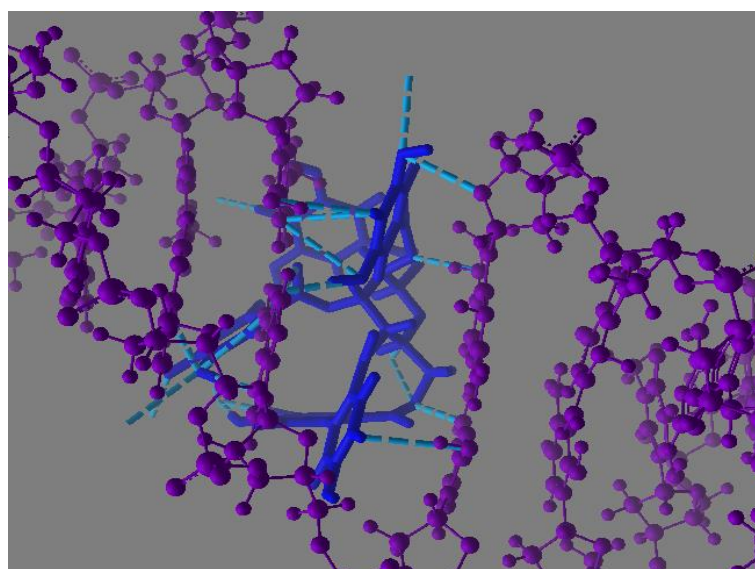


Figure 4.30: Interactions de la tellimagrandine II avec l'ADN

La molécule 9, la gallotannin 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose, est bien centralisée dans le site actif de l'enzyme. L'analyse visuelle du complexe nous montre six liaisons hydrogène avec les résidus de l'enzyme dont la première se trouve entre le (HO...Glu356 ; d= 2.98 Å), la deuxième entre (HO...Asn722 ; d= 2.62Å), la troisième entre (HO...Lys425 ; d= 2.93 Å), la quatrième entre (HO...Thr718 ; d= 3.27 Å), la cinquième entre (HO...Asn352 ; d= 2.87 Å) et la sixième entre (HO... Leu429 ; d= 3.10 Å) (Figure 4.30). Par ailleurs cette molécule présente onze liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.31) et des interactions de type Van der Waals avec les résidus : Asn722, Thr718, Glu356, Lys425 et Leu429.

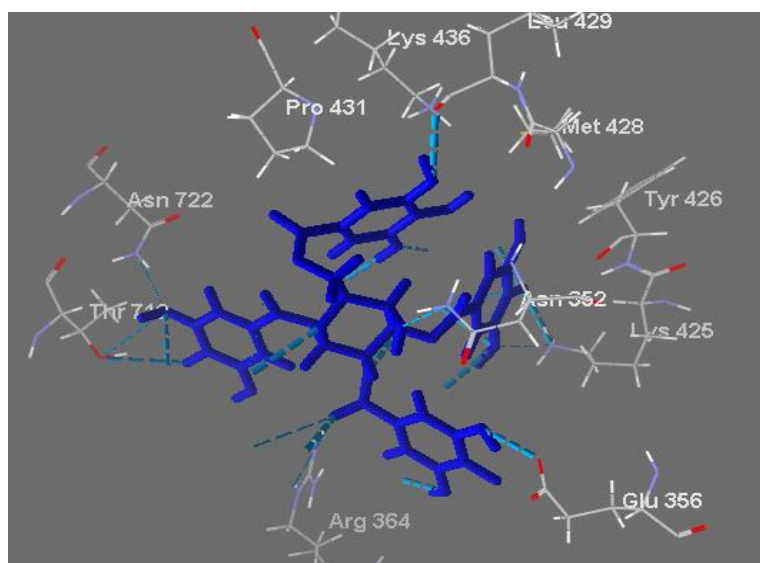


Figure 4.31: Interactions de la gallotannin 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose avec la Topo 1

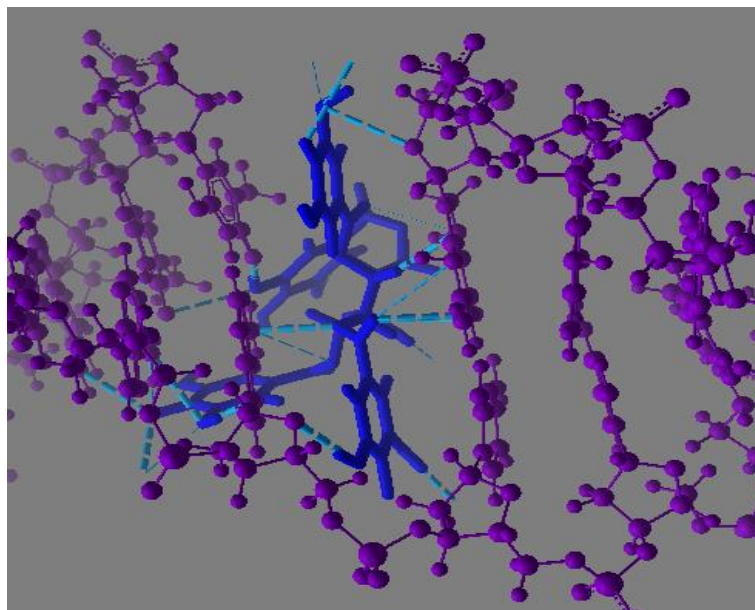


Figure 4.32: Interactions de la gallotannin 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose avec l'ADN

La molécule 10, la tellimagrandine I est classée en dixième pose, et bien insérée dans la cavité de l'enzyme. Sur la figure 4.32, la molécule montre quatre liaisons d'hydrogène dont la première se trouve entre le (HO... Asn722 ; $d= 3.35 \text{ \AA}$), la deuxième entre (HO...Tyr426 ; $d= 3.05 \text{ \AA}$), la troisième entre (CO...Arg364 ; $d= 3.10 \text{ \AA}$) et la quatrième entre (CO... Asn352 ; $d= 3.58 \text{ \AA}$). En outre cette molécule présente dix liaisons hydrogène avec l'ADN (Figure 4.33) et des liaisons stériques avec les résidus : Arg364, Tyr426, Asn352 et Asn722.

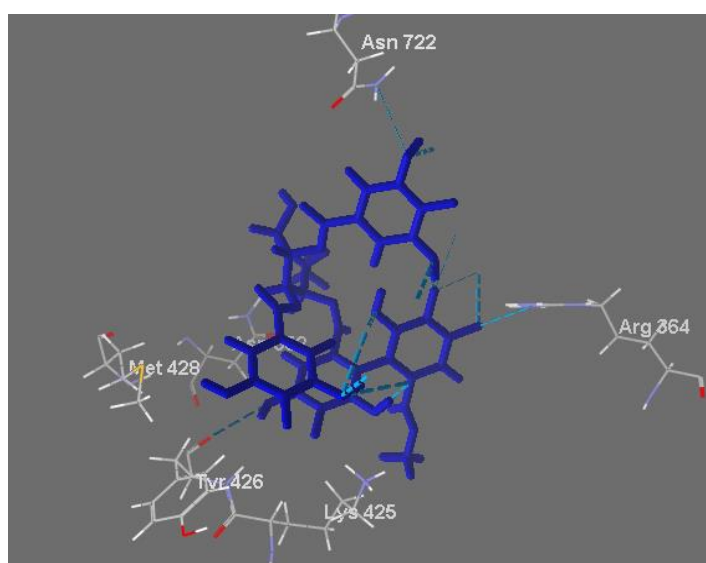


Figure 4.33: Interactions de la tellimagrandine I avec la Topo 1

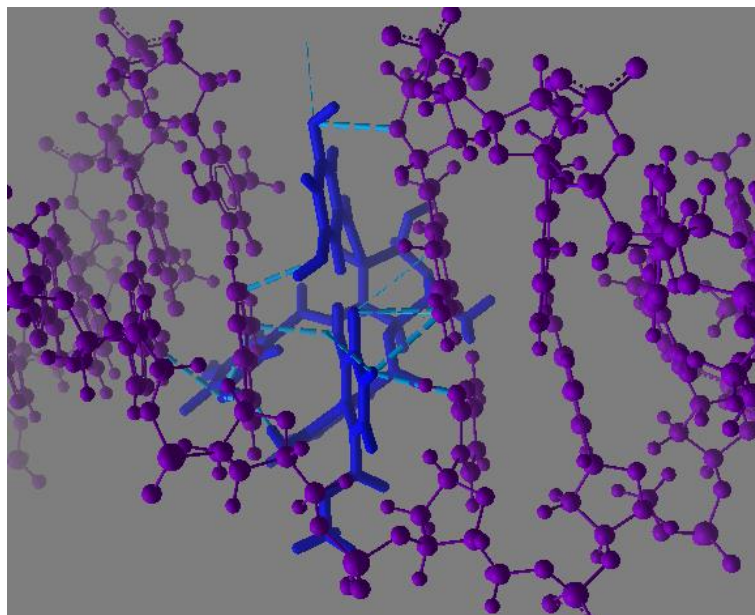


Figure 4.34: Interactions de la tellimagrandine I avec l'ADN

En conclusion, les résultats du docking moléculaire nous ont permis de sélectionner les dix-huit premiers composés qui peuvent être proposés comme meilleurs inhibiteurs pour notre cible thérapeutique. La grande affinité avec les résidus de la cavité principale de la top1 a été démontrée par les énergies basses ainsi que le mode d'interaction en comparaison avec la TTC, de plus nous avons effectué une recherche bibliographique qui a montré que ces molécules possédaient des activités biologiques diverses dont l'activité anticancéreuse lors de précédentes recherches (Tableau 4.7).

Tableau 4.7: Nom, espèce, origine et les activités biologiques des vingt meilleures molécules obtenues

N° composé	Nom du composé	Nom, espèce, origine	Activités biologiques
1	Acide 3'-O-méthyl-4-O-(n"-O-galloyl-beta-D-xylopyranosyl) ellagique	<i>Terminalia</i> : <i>T. horrida</i> , <i>T. bellerican</i> et <i>T. chebula</i> (Egypte) (B.Pfundstein, 2010).	Antidiabétiques, antimicrobiens, antioxydant, antimutagènes, antiprolifératifs, anti-inflammatoire, néphroprotecteur, antivirale, antifongique, immunomodulateur, hépatoprotecteur, antivirale, anti-cancérogènes, anti-anaphylactique, anti-ulcérogène, anti-arthritique, cyto-protectrices, Anti-Alzheimer, radio-protectrice et cardio-protectrice (S.Chanda,2013) ; (P.Singh, 2017) ; (Kolla, 2017).
2	isorhamnetin-3-gentiobioside-7-glucoside	<i>tribulus pentandrus</i> et <i>tribulus terrestris</i> (Egypte) (N.A.M.Saleh, 2000).	Antispasmodique, antibactérien, anthelminthique, diurétique, aphrodisiaque, antiurolithique, immunomodulateur, antihypertenseur, antihyperlipidémique, antidiabétique, hépatoprotecteur, anticancéreux, antibactérien, analgésique et anti-inflammatoire (W. Zhu, 2017) ; (B.Ivanka, 2019).
3	quercetin-3-rutinoside-7-glucoside	<i>tribulus pentandrus</i> et <i>tribulus terrestris</i> (Egypte)	Antispasmodique, antibactérien, anthelminthique, diurétique, aphrodisiaque, antiurolithique, immunomodulateur, antihypertenseur,

		(N.A.M.Saleh, 2000).	antihyperlipidémique, antidiabétique, hépatoprotecteur, anticancéreux, antibactérien, analgésique et anti-inflammatoire(W. Zhu, 2017) ; (B.Ivanka, 2019).
4	2",2"-di-O-beta-glucopyranosyl-vicenin II	<i>Ephedra aphylla</i> (Egypte) (S.A.M.Hussein, 1997).	Anticancéreux, antiprolifératif, anti-inflammatoire, antidiabétique, antihyperlipidémique, hépatoprotectrice, antiarthritique, antigrippal ; potentiel pro-apoptotique, cytotoxique, antimicrobiennes et antioxydantes(K. Elhadeb, 2020).
5	Acide 4-O-(3",4"-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique	<i>Terminalia</i> : <i>T. horrida</i> , <i>T.bellerican</i> et <i>T. chebula</i> (Egypte) (B.Pfundstein,2010).	Antidiabétiques, antimicrobiens, antioxydant, antimutagènes, antiprolifératifs, anti-inflammatoire, néphroprotecteur, antivirale, antifongique, immunomodulateur, hépatoprotecteur, antivirale, anti-cancérogènes anti-anaphylactique, anti-ulcérogène, anti-arthritique, cyto-protectrices, Anti-Alzheimer, radio-protectrice et cardio-protectrice (S.Chanda,2013) ; (P.Singh, 2017) ; (Kolla, 2017).
6	kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside	<i>Equisetum ramosissimum</i> (Egypte) (N.A.M.Saleh, 1980).	Activités pharmacologiques in vivo : activité sur le système nerveux central, activité dans l'hyperplasie bénigne de la prostate, activité cicatrisante, analgésique, anti-inflammatoire et antidiurétiques. Activité pharmacologique in vitro : anti-microbien, cytotoxique, anémie, vih, anti-hémorragique, anticancereux, anti-oxydant,

			hépatoprotecteur, effet sur le système immunitaire, effet sur le système urinaire, anti-lesishmanial, effet antidiabétique (M. Yusuf, 2020) ; (N. S. A.Savaya, 2020).
7	Acide 3'-O-methyl-4-O-(3'',4''-di-O-galloyl-alpha-L-rhamnopyranosyl) ellagique	<i>Terminalia</i> : <i>T. horrida</i> , <i>T.bellerican</i> et <i>T. chebula</i> (Egypte) (B.Pfundstein, 2010).	Antidiabétiques, antimicrobiens, antioxydant, antimutagènes, antiprolifératifs, anti-inflammatoire, néphroprotecteur, antivirale, antifongique, immunomodulateur, hépatoprotecteur, antivirale, anti-cancérogènes, anti-anaphylactique, anti-ulcérogène, anti-arthritique, cyto-protectrices, Anti-Alzheimer, radio-protectrice et cardio-protectrice (S.Chanda,2013) ; (P.Singh, 2017) ; (Kolla, 2017).
8	tellimagrandin II	<i>Tamarix nilotica</i> (Egypte) (M.A.A.Orabi, 2010) .	Antiseptique, antipyrétique,anti-inflammatoire, anti-microbienne, antioxydante, inhibitrice de l'uréase in vitro, antimitotique, anti-mutagène, hépatoprotectrices et cytotoxique(A. A. Mozzamil, 2019) ; (S. A. Shebl, 2019) ; (S. AbouZid, 2011); (R. O. Bakr, 2013).
9	gallotannin 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose	<i>Tamarix aphylla</i> (Egypte) (M.A.A.Orabi, 2015) .	Cytotoxicité in vitro, antiprolifératives contre certains types de cancer, antioxydante, anti-microbienne (N. Alhourani, 2018); (M. H. A. Suleiman, 2019).

10	tellimagrandin I	<i>Quercus coccifera et quercus suber</i> (Algérie) (I.Hideyuki, 2002).	Antioxydante, antibactérienne, cytotoxique, anticancéreuse, anti-inflammatoire, neuroprotectrice, hépatoprotecteur, antidiabétique, anticancéreux (M. Taib, 2020).
11	quercetin-3-gentiobioside-7-glucoside	<i>tribulus pentandrus et tribulus terrestris</i> (Egypte) (N.A.M.Saleh, 2000).	Antispasmodique, antibactérien, anthelminthique, diurétique, aphrodisiaque, antiurolithique, immunomodulateur, antihypertenseur, antihyperlipidémique, antidiabétique, hépatoprotecteur, anticancéreux, antibactérien, analgésique et anti-inflammatoire(W. Zhu, 2017) ; (B.Ivanka, 2019).
12	terflavin B	<i>Terminalia : T. horrida, T.bellerican et T. chebula</i> (Egypte) (B.Pfundstein,2010).	Antidiabétiques, antimicrobiens, antioxydant, antimutagènes, antiprolifératifs, anti-inflammatoire, néphroprotecteur, antivirale, antifongique, immunomodulateur, hépatoprotecteur, antivirale, anti-cancérogènes, anti-anaphylactique, anti-ulcérogène, anti-arthritique, cyto-protectrices, Anti-Alzheimer, radio-protectrice et cardio-protectrice (S.Chanda,2013) ; (P.Singh, 2017) ; (Kolla, 2017).
13	quercetin-3-O-(6"-caffeoyl)-sophoroside	<i>Bassia muricata</i> (Egypte) (M.S.Kamel, 2001).	Antioxydant, allélopathique, antimicrobien (A. Abd-ElGawad, 2020).

14	nilotin M4	<i>Tamarix nilotica</i> (Egypte) (M.A.A.Orabi, 2010) .	Antiseptique, antipyrétique, anti-inflammatoire, anti-microbienne, antioxydante, inhibitrice de l'uréase in vitro, antimototique, antimutagène, hépatoprotectrices et cytotoxique (A. A. Mozzamil, 2019) ; (S. A. Shebl, 2019) ; (S. AbouZid, 2011); (R. O. Bakr, 2013).
15	quercetin-3-gentiotrioside	<i>Tribulus pentandrus</i> et <i>tribulus terrestris</i> (Egypte) (N.A.M.Saleh, 2000).	Antispasmodique, antibactérien, anthelminthique, diurétique, aphrodisiaque, antiurolithique, immunomodulateur, antihypertenseur, antihyperlipidémique, antidiabétique, hépatoprotecteur, anticancéreux, antibactérien, analgésique et anti-inflammatoire (W. Zhu, 2017) ; (B.Ivanka, 2019).
16	2,3:4,6-bis-hexahydroxydiphényl-l-galloyl-beta-glucose	<i>Terminalia arjuna</i> (Egypte) (F.E.Kandil, 1997).	Cardiotonique, hypatoprotectrice, immunomodulatrice,, insecticide, antioxydant, antidysentérique, antidiabétique, antimicrobien, activité cytotoxique, propriétés antimutagènes, puissant anti-inflammatoire et antioxydant (S. Akhter, 2012) ; (A. Amalraj, 2017) ; (A.Alam, 2019).
17	spinacetin 3-diglucoside	<i>Anvillea radiata</i> (Algérie) (H.Dendougui, 2006).	Antioxydant, anti-inflammatoire, antihyperglycémiant, antihyperlipidémiant, anticholinestérasique, activité inhibitrice de la tyrosinase, antibactérienne, antifongique, activité cytotoxique (D.H.

			Saoud, 2019) ; (C.Kandouli, 2017).
18	isorhamnetin 3-robinobioside	<i>Herniaria fontanesii</i> (maroc) (A.N.Mbark, 1995).	Propriétés antioxydantes, antiproliférative, anti-inflammatoire in vitro et Inhibition de l'acétylcholinestérase (H. Tlili,2019).
20	stemphylnanthranol B	<i>Stemphylium globuliferum</i> (Egypte) (Y.Liu, 2014).	Anticancéreux, anti-inflammatoire, antidiabétique, antioxydant, antiviral et antimicrobien. (W.A.Elkhateeb, 2021); (S. K. Deshmukh, 2015).
21	Acide ellagique	<i>Terminalia</i> : <i>T. horrida</i> , <i>T.bellerican</i> et <i>T. chebula</i> (Egypte) (B.Pfundstein, 2010).	Antidiabétiques, antimicrobiens, antioxydant, antimutagènes, antiprolifératifs, anti-inflammatoire, néphroprotecteur, antivirale, antifongique, immunomodulateur, hépatoprotecteur, antivirale, anti-cancérogènes, anti-anaphylactique, anti-ulcérogène, anti-arthritique, cyto-protectrices, Anti-Alzheimer, radio-protectrice et cardio-protectrice (Chanda, 2013 ; Singh, 2017 ; Kolla, 2017).

4.4 Références Bibliographiques

Abouzid, S. and Sleem, A. (2011) "Hepatoprotective and antioxidant activities of *Tamarix nilotica* flowers ", *Pharmaceutical Biology*, 49(4), pp. 392–395.

Ahmed, M.A., Mohammed, A.K., Mohammed, S.O., Salih, S.A., Hamza, A.A. (2019) "Phytochemical Profiling and Biological Activity of *Tamarix Nilotica* Leaves Extract", *Sumerianz Journal of Biotechnology*, 2(7), pp. 55-60.

Akhter, S., Hossain, M.I., Haque, M.A., Shahriar, M., Bhuiyan, M.A. (2012) "Phytochemical screening, antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of the bark extract of *Terminalia Arjuna*", *European Journal of Scientific Research*, 86 (4), pp. 543-552.

Alhourani, N., Kasabri, V., Bustanji, Y., Abbassi, R. and Hudaib, M. (2018) "Potential antiproliferative activity and evaluation of essential oil composition of the aerial parts of *Tamarix aphylla* (L.) H.Karst.: A Wild Grown medicinal plant in Jordan", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1-8.

Amalraj, A., Gopi, S. (2017) "Medicinal properties of *Terminalia arjuna* (Roxb.) wight and arn", *A review ; Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, pp . 65-78.

Chanda, S., Menpara, D. and Desai, D. (2013) "Antimicrobial Activity of *Terminalia bellerica* Leaf and Stem Collected from Two Different Sites", *AJPCT American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(9), pp. 721-733.

Dendougui, H., Jay, M., Benayache, F., Benayache, S. (2006) "Flavonoids from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae) ", *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, pp.718-720.

Deshmukh, S.K., Verekar, S.A. and Bhave, S.V. (2015) "Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials", *Frontiers in Microbiology*, 7, 15(5).

Elgawad, A. A., Gendy, A.E.N., El-Amier, Y., Gaara, A., Omer, E., Al-Rowaily, S., Assaeed, A., Al-Rashed, S., Elshamy, A. (2020) "Essential oil of *Bassia muricata*: Chemical characterization, antioxidant activity, and allelopathic effect on the weed *Chenopodium murale*", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, pp. 1900–1906.

Elhadef, K., Smaoui, S., Fourati, M., Hlima, H.B., Mtibaa, A.C., Sellem, I., Ennouri, K. and Mellouli, L. (2020) "A Review on Worldwide *Ephedra* History and Story: From Fossils to Natural Products Mass Spectroscopy Characterization and Biopharmacotherapy Potential", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1-22.

Elkhateeb, W.A. and Daba, G.M. (2021) "*Stemphylium* and *Ulocladium* between Benefi t and Harmful", *J Biomed Res. Environ. Sci*, 20(11), pp. 1117-1120.

Emmanuel, D.H., Jelassi, A., Hlila, M.B., Goudjil, M.B., Ladjel, S., Ben Jannet , H. (2019) "Biological activities of extracts and metabolites isolated from *Anvillea radiata* Coss and Dur. (Asteraceae)", *South African Journal of Botany*, 121, pp. 386–393

Hussein, S.A.M., Barakat, H.H., Nawar, M.A.M. and Willuhni, G. (1997) "Flavonoids from *ephedra aphylla*", *Phytochemrsrry*, 45(7), pp. 1529 1532.

Ito, H., Yamaguchi, K., Kim, T.H., Khennouf, S., Gharzouli, K. and Yoshida, T. (2002) "Dimeric and Trimeric Hydrolyzable Tannins from *Quercus coccifera* and *Quercus suber* ", *J. Nat. Prod*, 65, pp. 339-345.

- Kamela, M.S., Mohameda, K.M., Hassaneana, H.A., K., Ohtanib, Kasaib, R., Yamasaki, K. (2001) "Acylated flavonoid glycosides from *Bassia muricata*", *Phytochemistry*, 57, pp. 1259–1262.
- Kanchan, A.A. and Emmanuel, I. (2019) "Contemporary medicinal uses of ethnomedicinally important plant: *Arjuna Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Arn", *Annals of Phytomedicine*, 8(1), pp. 63-69.
- Kandil, F.E. and Nassar, M. I. (1998) "Atannin anti-cancer promoter from *terminalia arjuna*", *Phytochemistry*, 47 (8), pp.1567- 1568.
- Kandouli, C., Cassien, M., Mercier, A., Delehedde, C., Ricquebourg, E., Stocker, P., Mekaouche, M., Leulmi, Z., Mechakra, A., Thétiot-Laurent, S. (2017) "Antidiabetic, antioxidant and anti inflammatory properties of water and n-butanol soluble extracts from Saharian *Anvillea radiata* in high-fat-diet fed mice", *Journal of Ethnopharmacology*, 207, pp. 251-267.
- Kolla, J.N., Kulkarni, N.M., Kura, R.R., Reddy Theepireddy, S.K. (2017) "*Terminalia chebula* Retz-an important medicinal plant", *Herba Pol*, 63(4), p. 45-56.
- Korb, O., Stütze, T., Exner, T.E. (2009) " Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with plants", *J. Chem. Inf. Model*, 49(1), pp. 84–96.
- Mbark, A.N., Guillaume, D., Cherrah, Y., Wieruszeki, J.M., Ricart, G. and Charrouf, Z. (1996) "An acylated isorhamnetin glycoside from *herniaria fontanesii*", *Phytochemistry*, 41 (3), pp. 989- 990.
- McDonald, I.K., Thornton, J.M. (1994) "Satisfying hydrogen bonding potential in proteins", *J. Mol. Biol*, 238(5), pp.777–793.
- Mohamed, H.A.S. (2019) "Ethnobotanical, Phytochemical, and Biological Study of *Tamarix aphylla* and *Aerva javanica* Medicinal Plants Growing in the Asir Region, Saudi Arabia", *Tropical Conservation Science*, 12, pp. 1–14.
- Nabiel A. M.Saleh and Mohamed F. Abdalla (1980) "The flavonoids of *Equisetum ramosissimum*", *Phytochemistry*, 19, p.987.
- Neelam, K., Girendra, G., Arun, K.G. (2019) "In silicoprotein-ligand docking studies on thiazolidinediones analogs as potential aldose reductase inhibitors", *Biol Forum*, 11(1), pp. 77–83.
- Orabi, M.A.A., Taniguchi, S., Yoshimura, M., Yoshida, T., Kishino, K., Sakagami, H., and Hatano, T. (2010) "Hydrolyzable Tannins of Tamaricaceous Plants. III.1 Hellinoyl- and Macrocyclic-Type Ellagitannins from *Tamarix nilotica*", *J. Nat. Prod*, 73, pp. 870–879.
- Orabi, M.A.A., Yoshimura, M., Amakura, Y., Hatano, T. (2015) " Ellagitannins, gallotannins, and gallo-ellagitannins from the galls of *Tamarix aphylla* ", *Fitoterapia*, 104, pp. 55–63.
- Pfundstein, B., El Desouky, S.K., Hull, W.E., Haubner, R., Erben, G., Owen, R.W. (2010) "Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities", *Phytochemistry*, 71, pp. 1132–1148.

- Puspaningtyas, A.R. (2014) “Docking studies of physalis peruviana ethanol extract using molegro virtual docker on insulin tyrosine kinase receptor as antidaibetic agent”, *Int. Curr. Pharm. J*, 3(5), pp. 265–269.
- R.O. Bakr, M.A.A. El Raey and R.S. Ashour (2013) “Phenolic content, radical scavenging activity and cytotoxicity of *Tamarix nilotica* (Ehrenb.) bunge growing in Egypt”, *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(1), pp. 12-20.
- Saleh, N.A.M., Ahmed, A.A. and Abdalla ,M.F. (1982) “Flavonoid glycosides of tribulus pentandrus and t. terrestris”, *Phytochemistry*, 21(8), pp. 1995-2000.
- Savaya, N.S.A., Issa, R.A., Talib, W.H. (2020) “In vitro evaluation of the antioxidant, anti-Propioni bacterium acne and antityrosinase effects of *Equisetum ramosissimum* (Jordanian horsetail)”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19 (10), pp. 2147-2152.
- Semerdjieva1, I.B. and Zheljzkov, V.D. (2019) “Chemical constituents, biological properties, and uses of *Tribulus terrestris* a review”, *Natural Product Communications*, 14(8), pp.1–26.
- Shebl, S.A., Tawab, F.M.A., Alsenosy, N.K., Abdou, H.S., Hassananae, M.M. and Darwish, H.R. (2019) “Cytological analysis of the anti-mutagenic effect of *tamarix nilotica* plant in mice bone marrow”, *Arab Univ. J. Agric. Sci*, 27(3), pp .1909-1917.
- Singh, P. and Malhotra, H. (2017) “terminalia chebula: a review pharmacognistic and phytochemical studies”, *International Journal of Recent Scientific Research*, 8(11), pp. 21496-21507.
- Taib, M., Rezzak, Y., Bouyazza, L., and Lyoussi, B. (2020) “Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Quercus* species”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp.1- 20.
- Tlili1,H., Hanen, N., Ben Arfa, A., Neffati, M., Boubakri, A., Buonocore, D., Dossena, M., Verri, M., Doria, E. (2019) “ Biochemical profile and *in vitro* biological activities of extracts from seven folk medicinal plants growing wild in southern Tunisia”, *PLOS ONE*,14(9)
- Wang, J., Kollman, P.A., Kuntz, I.D. (1999) “ Flexible ligand docking: a multistep strategy approach“, *Proteins. Struct. Funct. Bioinf*, 36(1), pp. 1–19.
- Yang, J.M., Chen, C.C. (2004) “GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking“, *Proteins. Struct. Funct. Bioinf* ,55(2), pp. 288–304.
- Yang, L., Wray, V., Abdel-Aziz, M.S., Wang, C.Y., Lai, D. and Proksch, P. (2014) “Trimeric anthracenes from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*”, *Journal of Natural Products*,77(7), pp. 1734-1738.
- Yusuf, M., Shrivastav, A., Porwal, M., khan, N.A. (2020) “A review on *equisetum ramosissimum*”, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 10(5), pp. 311-315.
- Zhu, W., Du, Y., Meng, H., Dong, Y. and Li, L. (2017) “A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry and pharmacological activities of *Tribulus terrestris*”, *Chemistry Central Journal*, 11(60), pp. 1-16.

Conclusion et Perspectives

L'objectif de ce travail était de développer *in silico* par docking moléculaire de nouvelles structures anticancéreuses agissant comme inhibiteurs puissants de la topo1 humaine, qui est une cible thérapeutique prometteuse pour la découverte de nouveaux médicaments contre le cancer. Afin d'atteindre cet objectif nous sommes passés par plusieurs étapes.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la reproductibilité des résultats expérimentaux par le logiciel Molegro Virtual Docker (MVD) à l'aide du protocole du redocking moléculaire. Pour cela nous avons fait appel aux deux tests : le premier est le test RMSD (root-mean-square deviation) sur six structures cristallines des protéines topo1 humaines-ADN téléchargées de la PDB qui sont complexés avec six inhibiteurs différents et qui ont présenté un RMSD inférieur à 2 Å. Le deuxième test est l'analyse visuelle, il montre une superposition maximale du ligand calculée par MVD et la conformation expérimentale du même ligand provenant de la PDB. Ces deux tests nous ont permis de conclure que le programme MVD est très fiable et qu'on peut l'utiliser en toute confiance pour modéliser les interactions de la topo1 humaine avec les divers inhibiteurs qui nous intéressent.

Dans un deuxième temps, nous avons pu élucider les interactions entre la topo1 humaine et 738 ligands similaires de la CPT tirés de la base de données ZINC. Les résultats ressortant du docking des dix meilleures poses montrent que tous les composés similaires se sont avérés avoir une affinité plus élevée que la CPT. La première molécule classée (21882279) a montré une énergie de score la plus élevée (-229,993 kcal/mol) et qu'elle se lie à la cavité par le résidu Arg364.

Dans un troisième temps, nous avons identifié de nouveaux inhibiteurs en prenant 5790 molécules extraites de plantes médicinales d'Afrique du Nord téléchargées d'un site web. Les résultats de docking moléculaire nous ont permis de proposer dix-huit composés comme des nouveaux inhibiteurs potentiels de la topo1 humaine.

Pour conclure, compte tenu des résultats obtenus dans ce travail qui consiste à l'élucidation de l'inhibition de la topo1 humaine par docking moléculaire, il semble que les composés proposés présentent une meilleure contribution à l'inhibition pour diminuer l'évolution du cancer.

Sur la base de ces résultats, nous envisageons d'approfondir l'étude de l'effet de ces nouveaux composés sur l'inhibition de la topo1 humaine, en faisant appel à d'autres programmes

de docking moléculaire. En termes de perspectives, ce travail pourra être complété et prolongé par une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* qui sont indispensables pour valider ces molécules en tant qu'inhibiteurs de la topo1 humaine

Annexe



A computational molecular docking study of camptothecin similars as inhibitors for topoisomerase 1

Atidel Boudjedir^{1,2} · Khaireddine Kraim^{1,2} · Youcef Saihi^{1,2} · Ouassila Attoui-Yahia¹ · Fouad Ferkous¹ · Abdelmalek Khorief Nacereddine²

Received: 12 March 2020 / Accepted: 3 September 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

DNA topoisomerase 1 (Top1) is a prime target of chemotherapy agents and a crucial enzyme that maintains DNA topology, during transcription, replication, repair, and recombination by relaxing DNA torsional strain through reversible DNA single-strand breaks process. Top1 is a selective target of camptothecin (CPT), a natural alkaloid compound and an important class of anti-cancer drugs, that reversibly bind the covalent DNA–Top1 complex, slowing down the religation of the cleaved DNA strand, thus inducing cell death. However, the use of CPTs was hampered by several drawbacks. In the present study, we have performed a receptor–ligand molecular docking analysis of a set of 738 camptothecin-like molecules in order to identify new potential derivative structures of camptothecin, a more potent anticancer agent with better efficacy, less toxicity, and side effects. MolDock score and hydrogen bonding interactions are the parameters used for docking studies. The inhibition phenomenon is mainly governed by various non-covalent interactions, including hydrogen bonds, steric interactions, and van der Waals interactions between the DNA basis and ligand. Among the top 10 ranked molecules, all the CPT similar ligands were found to have higher binding affinity in comparison with the CPT of the human DNA–Top1. The first ranked molecule (21882279) showed the highest docking score value (–229.993 kcal/mol) which it binds to the cavity by Arg364 residue. These results suggest that similar ligands may serve as a leading compound for the development of anticancer agents.

Keywords Topoisomerase 1 · Cancer · Camptothecin · Molecular docking

Introduction

Cancer is a pathological term commonly used in describing several diseases that can affect on various vital parts of the body through inducing abnormal cell proliferation in normal tissues. All the affected cells are resulted from the same clone, in which the initiator cancer cells receive some characteristics, making them able to divide indefinitely and to form

metastases [1]. Thus, today, the need to develop more potent and selective antitumor agents remains a major concern and a challenge for medicinal chemistry [2]. Pharmaceutical industry has always relied by natural substances or its synthetic derivatives in order to explore potential drugs. Natural or natural-derivative compounds, acting as topoisomerase (Top) inhibitors, were successfully used in chemotherapeutic cancer treatments [3]. Topoisomerases are an important group of enzymes in all living cells undergoing division, due to their crucial role in resolving topological issues generated during key nuclear processes like replication, transcription, recombination, repair, and mitosis [4,5]. Modulation of supercoiled DNA is a key function of Top1 [6], which cleaves the phosphodiester bond on a single DNA strand by nucleophilic attack on catalytic tyrosine 723 and form a cleavage complex in which 3' end of the broken DNA strand is covalently linked to the enzyme [7].

DNA–Top1 is a well-known target in tumor chemotherapy, as result top 1 inhibitors constitute an important class of anti-cancer drugs. Top1 inhibitors can be divided into two classes:

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11224-020-01633-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Abdelmalek Khorief Nacereddine
malek_khorief@yahoo.com

¹ Laboratory of Applied Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Badji-Mokhtar - Annaba, BP 12, 23000, Annaba, Algeria

² Department of Physics and Chemistry, Higher Normal School of Technological Education-Skikda, Azzaba, Skikda, Algeria

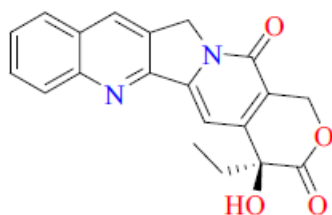


Fig. 1 Structure of camptothecin

suppressors and poisons. Suppressors do not stabilize the intermediate covalent DNA–Top1 complex. Their interaction with the free enzyme inhibits the binding of Top1 to the DNA cleavage site, thus preventing all subsequent stages of the catalytic cycle. On the other hand, the poisons act after the cleavage of DNA by the enzyme and inhibit religation. In this case, the drug can freeze the Topo1–DNA complex resulting in the apoptosis of the cancer cell [8]. The main group of Topo1 inhibitors is camptothecin (Fig. 1).

The CPT was identified as an anticancer natural product and an effective cytotoxic agent whose clinical activity has been well-documented in the years of 1970 [9]. However, its development was stopped due to problems with chemical stability of the hydroxylactone ring, low water solubility, and severe side effects [10–13]. The primary mechanism of CPT has given rise to new research insights on the induced toxic effects [14, 15]. *In vitro* studies showed that CPT is able to cause DNA strand breaks and thus preventing DNA replication [16]. In order to overcome CPT shortcomings, the modifications at selected sites have improved both pharmacologic and activity profile, successfully lead to the development of two water-soluble and FDA-approved drugs, topotecan (TTC) and irinotecan (CPT-11) (Fig. 2), which were used for colon and ovarian cancer treatment, respectively, and also to the design of other new CPT derivatives, that are currently in different stages of clinical trials [17–19].

In recent years, virtual screening is becoming a powerful tool for drug development; it reduces time and cost discovery and provides valuable structural and energetic informations over traditional drug developing methods [20–22].

Owing to their antitumor potential, camptothecin derivatives are still considered as a challenging research topic, in

Table 1 Redocking of references ligand against topoisomerase-1–DNA complexes

Complex PDB ID	Ligand ID	RMSD (Å)
1T81	<i>EHD</i>	0.673
1K4T	<i>TTC</i>	0.576
1RR8	<i>TTG</i>	0.831
1SC7	<i>M38</i>	1.513
1TL8	<i>AJ3</i>	1.232
1SEU	<i>SA3</i>	0.873

order to further improve their anticancer activity and reduce side effects, using computer-aided drug design like virtual screening and molecular docking [23–25].

In this paper, we have performed a molecular docking study using Molegro program, in order to determine the main factors that govern the interaction of camptothecin similars with Top 1–DNA complex [26–28]. The virtual screening accomplished using 738 camptothecin similars. The results allowed the ranking of the top poses using four descriptors that are HB DNA–ligand, HB Top1–ligand, steric effect DNA–ligand, and steric effect Top1–ligand [29, 30].

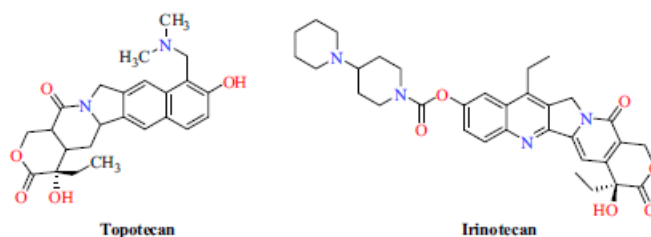
Computational software and methods

Molecular docking

Molecular docking was carried out using Molegro Virtual Docker 5.0 (MVD) software (<http://www.clebio.com>) along with Graphical User Interface (GUI); MVD tools was also used to create grid, calculate dock score, and evaluate conformers.

The active binding site region has a definite spherical region that encompasses all proteins within 15.0 Å of bound crystallographic ligand atom with selected coordinates of *X* (21.24 Å), *Y* (–3.97 Å), and *Z* (28.12 Å) axes, respectively. Default settings were used for all the calculations. Docking that was performed with a grid ruling of 0.3 Å contains 50 independent runs with maximum number of 4000 iterations

Fig. 2 Structure of topotecan (TTC) and irinotecan (CPT-11)



Struct Chem

Table 2 Classification of the ten first poses according to the Moldock score energy

Compound	ID/pose	Moldock score (kcal/mol)	H-bond score (kcal/mol)	No. of H-bonds	H-bond interacting residues
1 (Irinotecan)	1612996/00	-265.15	-2.53602	5	Arg364, Asp533, Thr718
2	21882279/00	-229.993	-5.44249	7	Arg364
3	96316309/00	-227.305	-2.07731	4	Asp533, Thr718
4	40407694/00	-227.077	-1.90299	10	Arg364
5	95911711/00	-225.539	-9.74742	13	Arg364, Asn352, Glu365, Tyr426
6	96399379/00	-224.825	-0.0358738	4	Arg364
7	72329717/00	-224.473	-0.562604	13	Arg364, Thr718
8	601814/00	-224.349	-1.92869	10	Arg364
9	27884431/00	-224.348	-2.2891	6	Asp533, Thr718
10	27981817/00	-224.298	-2.19251	8	Asp533, Thr718
Topotecan	1611274/00	-213.925	-2.4796	6	Arg364, Asp533, Thr718
Camptothecin	105309/00	-189.818	-2.10494	4	Asp533, Thr718

executed on single population of 100 individuals determined by genetic algorithm. The active binding site was considered as a rigid molecule, while the rotatable bonds of the ligands were set to be free [31–34].

Protein selection and preparation

Human DNA-topoisomerase I complexed with the poison topotecan (PDB ID: 1KT4) was used as the target protein. Its structure was retrieved from the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Its 3D crystal structure has a resolution of 2.10 Å, a structural weight of 84.97 kDa and amino acid length of 592 and contains only a single chain (Chain A). Before docking all non receptor heteroatoms

such as water and ions were removed because they were considered during the scoring and H-atoms, then they were added to correct ionization and tautomeric states of amino acid residues [35, 36].

Selection and preparation of ligands

A total of 738 ligand structures were extracted from the public free ZINC database (<http://zinc15.docking.org/>) with the extension ".sdf." After, we have adopted the Tanimoto coefficient as search parameters with 50% of similarity threshold. The collected molecules were saved as ".mol2" files using openbabel software and prepared using MVD module, where, proper bonds, bonds order, hybridization, and charges were assigned for further docking studies.

Table 3 Classification of the ten first poses according to the energy of hydrogen (H) bond in ligand–Top1 interaction

Compound	ID/pose	Moldock score (kcal/mol)	H-bond score (kcal/mol)	No. of H-bonds	H-bond interacting residues
1	95911711/00	-225.539	-9.74742	13	Arg364, Asn352, Tyr426, Glu365
2	9407486/00	-206.022	-7.4439	10	Arg364, Arg488, Asp533, Thr718
3	18968484/00	-209.558	-7.13621	11	Arg364, Arg488
4	13728929/00	-196.368	-5.85824	8	Arg364, Asn722, Lys532
5	80332264/00	-182.288	-5.77512	6	Arg364, Arg488
6	9405527/00	-194.408	-5.44791	9	Arg364, Asn722
7	21882279/00	-229.993	-5.44249	7	Arg364
8	12303514/00	-216.735	-5.41646	9	Arg488, Lys532, Thr718
9	33010359/00	-200.517	-5.22107	10	Arg364, Thr718, Lys532
10	270395407/00	-195.684	-5.15639	9	Arg364, Asn722, Thr718
Irinotecan	1612996/00	-265.15	-2.53602	5	Arg364, Asp533, Thr718
Topotecan	1611274/00	-213.925	-2.4796	6	Arg364, Asp533, Thr718
Camptothecin	105309/00	-189.818	-2.10494	4	Asp533, Thr718

Table 4 Classification of the ten first poses according to the energy of ligand-DNA interaction

Compound	ID/pose	Moldock score (kcal/mol)	H-bond score (kcal/mol)	No. of H-bonds	H-bond interacting residues
1 (Irinotecan)	1612996/00	-265.15	-2.53602	5	Arg364, Asp533, Thr718
2	36369738/00	-208.625	-2.5	4	Arg364
3	34922052/00	-199.681	-2.30543	6	Arg364
4	12789672/00	-220.626	-3.05723	10	Arg364
5	40407694/00	-227.077	-1.90299	10	Arg364
6	8603572/00	-212.594	-0.613847	4	Arg364
7	96399379/00	-224.825	-0.0358738	4	Arg364
8	58541838/00	-209.362	-1.51279	5	Asn722, Thr718
9	72329717/00	-224.473	-0.562604	13	Arg364, Thr718
10	13690303/00	-221.125	-3.60646	6	Arg364, Thr718
Topotecan	1611274/00	-213.925	-2.4796	6	Arg364, Asp533, Thr718
Camptothecin	105309/00	-189.818	-2.10494	4	Asp533, Thr718

Software method validation

To evaluate the accuracy of molecular docking, the cocrystallized ligand has been retrieved and redocked onto the active site. Root-mean-square deviation (RMSD) between the docked structure and the original conformation of the inhibitor in each complex was calculated [36].

The validation method was performed with MVD using six crystal structures of Human-Top1 Proteins downloaded from Protein Data Bank, in which the PDB Codes are 1T8I, 1K4T, 1RR8, 1SC7, 1TL8, and 1SEU that are complexed respectively with six different inhibitors, EHD, TTC, TTG, M38, AB, and SA3. The obtained results of the Redocking of references ligand against topoisomerase-1-DNA complexes are collected in Table 1. We notice from Table 1 that the RMSD of all atoms between two conformations is less than 2 Å for all proteins, indicating that the parameters for docking simulation

are good in reproducing X-ray crystal structures. In addition, the crystal structure (1K4T) has the smallest RMSD value; therefore, its cocrystallized ligand was selected and validated for further docking experiments.

Results and discussion

In order to improve the inhibitory activity of CPT, we used the method of virtual screening of a collection of chemical molecules to study its mode of inhibition against the protein; the database offers 738 similar of CPT. The docking simulation technique was performed by using Molegro Virtual Docker (MVD) with similar of CPT, and they were docked with human DNA-topoisomerase-1 as protein target. This program selected the best docked based on two criteria such as ligand binding position and fitness function score comparison. We

Table 5 Classification of the ten first poses according to the energy of ligand-protein interaction

Compound	ID/pose	Moldock score (kcal/mol)	H-bond score (kcal/mol)	No. of H-bonds	H-bond interacting residues
1	21868250/00	-206.689	-4.93215	5	Arg364
2	12325713/00	-199.374	-3.36031	5	Arg364, Lys374
3	22935752/00	-198.55	-3.22732	7	Arg364, Tyr426
4	18968484/00	-209.558	-7.13621	11	Arg364, Arg488
5	9407486/00	-206.022	-7.4439	10	Arg364, Arg488, Asp533, Thr718
6	12303514/00	-217.497	-4.30666	9	Arg488, Lys532, Thr718
7	8931715/00	-200.449	-2.35317	7	Arg364
8	33260536/00	-197.137	-0.726013	11	Arg364, Thr718, Lys532
9	13693741/00	-201.814	-4.37116	8	Arg364, Arg488, Lys532, Asn722
10	34912206/00	-195.247	0	1	No residues
Irinotecan	1612996/00	-265.15	-2.53602	5	Arg364, Asp533, Thr718
Topotecan	1611274/00	-213.925	-2.4796	6	Arg364, Asp533, Thr718
Camptothecin	105309/00	-189.818	-2.10494	4	Asp533, Thr718

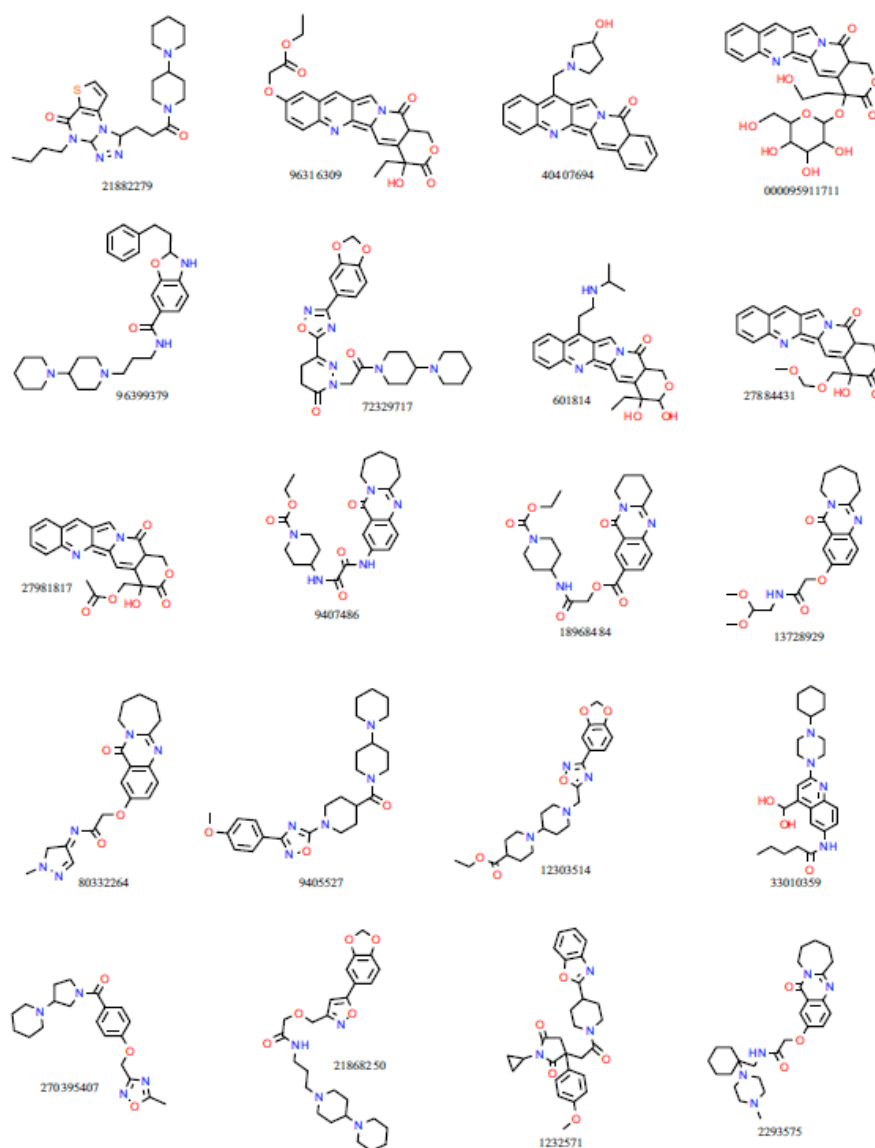


Fig. 3 The structures of the best 34 selected ligands based on the virtual screening against top 1-DNA complex

have obtained 506 top ranked poses, and the results have been collected in Table S1 in Supporting Information.

The poses were ranked according to their Moldock score, hydrogen bond, interaction protein-ligand, and interaction ligand-DNA. The top ten best poses together with their docking result in the active site of human DNA-

topoisomerase 1. The results according to the Moldock score energy are collected in Table 2, while according to hydrogen bond energy is given in Table 3, and according to the energy of ligand-DNA and the energy of ligand-protein interactions are summarized in Tables 4 and 5, respectively, as generated from these four descriptors. The structures of the best 34

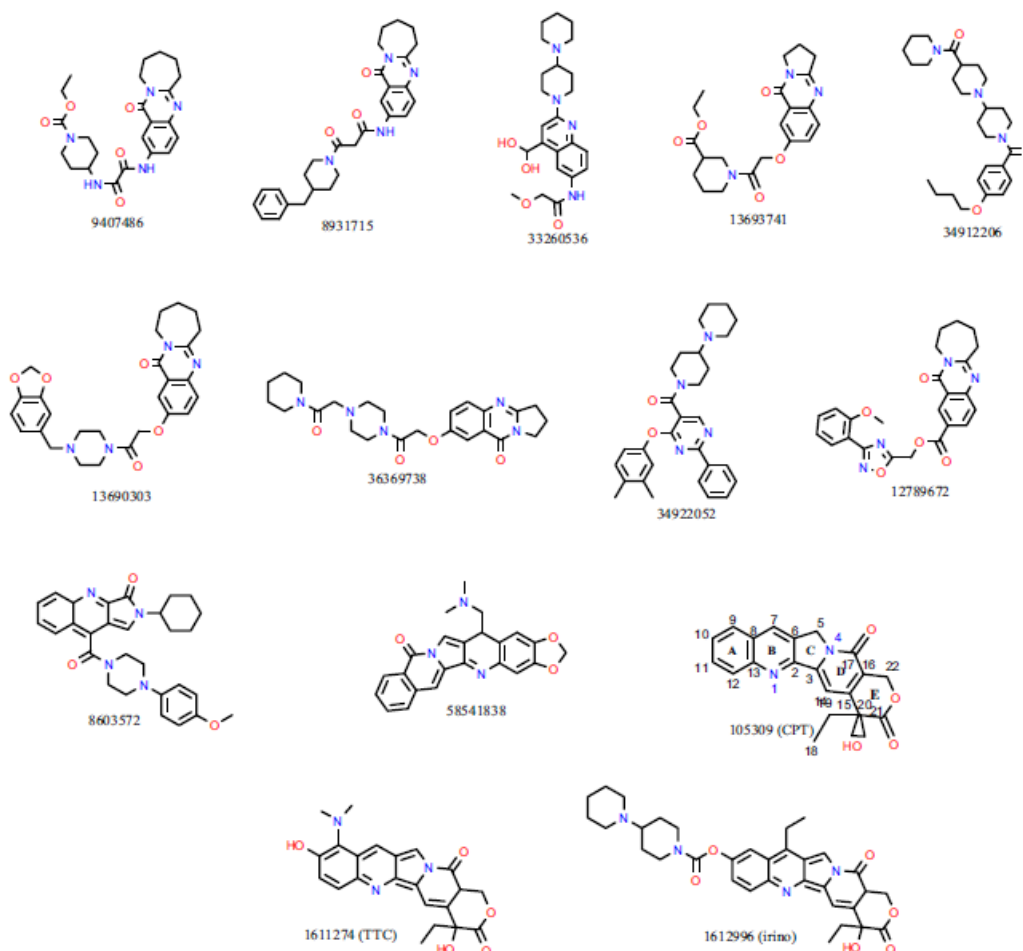


Fig. 3 (continued)

selected ligands based on the virtual screening against top 1–DNA complex are illustrated in Fig. 3.

The analysis of these results indicates that the top ten best poses present a similar structure of CPT according to the protein–ligand energy vector. On the other hand, we found 9 similar compounds with respect to hydrogen bond energy vector, 7 similar compounds with regard to ligand–DNA interaction vector, and 3 similar compounds according to the Moldock score energy vector. Moreover, the affinity score of all similar compounds is better than that of CPT with respect to all four vectors; the compounds 21882279, 96399379, 72329717, 9407486, 18968484, 21868250, and 12327513, for example, have energies values of -229.993 ,

-224.825 , -224.473 , -206.022 , -209.558 , -206.689 , and -199.374 kcal/mol, respectively, compared with the CPT which has an energy value of -189.818 kcal/mol.

Moreover, the compound 1612996 (irinotecan) is ranked first for the two vectors (DNA–ligand and Moldock score), which provides a highly stabilized enzyme–inhibitor complex, along with an energy of -265.15 kcal/mol. The molecule is well centered in the active binding site region and formed hydrogen bonding interactions. The first H-bond established with the nitrogen atom in the pyridine cycle (cycle B) and the nitrogen atom of Arg364 ($=N\dots H-N$ (Arg364)) with a length of 3.4880 Å, a second is developed between the hydroxyl group in position 20 and the carbonyl residue of Asp533 (O

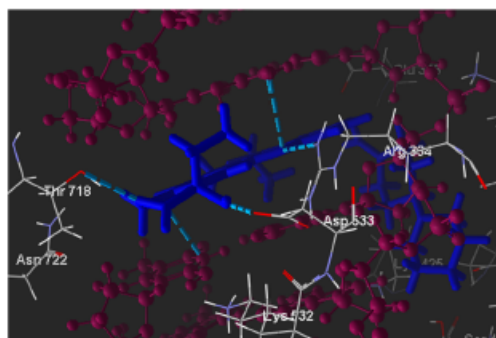


Fig. 4 Hydrogen bond interactions (sky blue dashes) between irinotecan and DNA-topoisomerase 1 complex

$\text{-H}\dots\text{O}=\text{C}$ (Asp533) with a length of 2.60496 Å, and a third occurred between the oxygen atom of pyranonic cycle (cycle E) and the hydroxyl group of residue Thr718 ($\text{O}\dots\text{H}-\text{O}$ (Thr718)). Furthermore, two hydrogen bonds are separately identified: one bond is between DNA and the carbonyl group of pyridine cycle (cycle D), and the other one is established between DNA and nitrogen atom of cycle B. Finally, irinotecan is stabilized by interactions Van Der Waals (see Fig. 4).

The compound 21882279 is molecule similar to CPT, well-centralized in the enzyme active site, and classified in the second pose according to the Moldock score vector with an energy value of -229.993 kcal/mol. Thereby, Arg364 seems to be the significant interacting residue in the active site, in which we have noticed that there is a formation of two hydrogen bonds between the amino acids and the nitrogen atoms of the triazole cycle ($=\text{N}\dots\text{H}-\text{N}$ (Arg364)). Their corresponding bond length is respectively 2.59 and 2.89 Å. Additionally, the stability of this compound is strengthened with four H-bond interactions displayed between the DNA basis and nitrogen

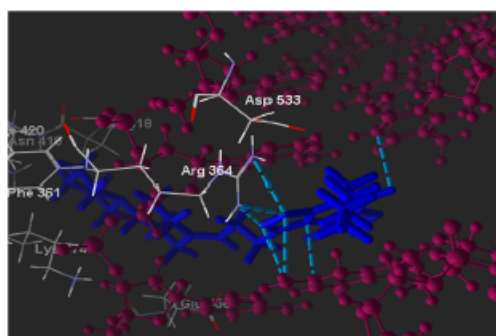


Fig. 5 Hydrogen bond interactions (sky blue dashes) between of compound 21882279 and DNA-topoisomerase 1 complex

atoms of the triazole cycle and the carbonyl group of the pyridazinone cycle (see Fig. 5). Therefore, the inhibition of compound 21882279 could be ascribed to the steric interactions that take place in the formed complex.

At the same manner, the derivatives of CPT, 96316309 (Fig. 6a), 40407694 (Fig. 6b), and 95911711 (Fig. 6c), are well centralized within the active binding site region; they exhibit H-bonds with the residue Asp533, Thr718, Arg364, Asn352, Glu365, and Tyr426, making these complexes more stabilized by the H-bonds and van der Waals interactions with DNA basis and enzyme residues.

On the other hand, the two compounds, 9407486 and 18968484, are molecules similar to CPT, classified, respectively in the second and third poses as predicted by the H-bond vector results. These molecules are well-centralized within the enzyme active site, showing six H-bonds with amino acid (Arg488, Thr718, Arg364, and Asp533) residues for the compound 9407486 (Fig. 6d) and four H-bonds with residues (Arg364, Arg488, and Thr718) for the compound 18968484 (Fig. 6e). Moreover, the two compounds exhibited H-bonds with DNA basis and steric interactions.

Besides, the two compounds, 21868250 and 12327513, are similar to CPT with score energies of -206.689 kcal/mol and -199.374 kcal/mol and are classified in first and second poses relative to the protein-ligand vector, respectively. These molecules are well centered in the active binding site of the enzyme; the compound 21868250 exhibited an H-bond with the residue Arg364 of length 2.96761 Å and four H-bonds with DNA (Fig. 6f). Compound 12327513 established one H-bond with residue Arg364 and a second H-bond with residue Lys374 and two H-bonds with DNA (Fig. 6g). In addition, these two molecules are stabilized by Van Der Waals interactions.

Likewise, the compounds 36369738 and 34922052 identified as similar to CPT, present score energy ranging between -208.62 kcal/mol and -199.68 kcal/mol. They are classified, respectively, in the second and the third poses as predicted by the DNA-ligand descriptor. Both molecules are well-inserted into the enzyme's cavity; compound 36369738 showed one H-bond with the Arg364 residue 2.86 Å in length and two bonds with DNA (Fig. 6h). Compound 34922052 established one H-bond with the Arg364 residue of length 2.73 Å and four H-bonds with DNA (Fig. 6i). In addition, these two molecules are also stabilized by DNA and the Arg364 residue by steric interactions.

From the obtained results, it is worth noting that CPT derivatives substituted in positions 7, 9, 10, and 20 are good inhibitors for Top I-DNA complex, compared with the derivatives substituted in positions 11 and 19. Moreover, due to the heterocyclic and conjugated molecular structures, a highly remarkable affinity for CPT similar compounds to active sites was noticed.

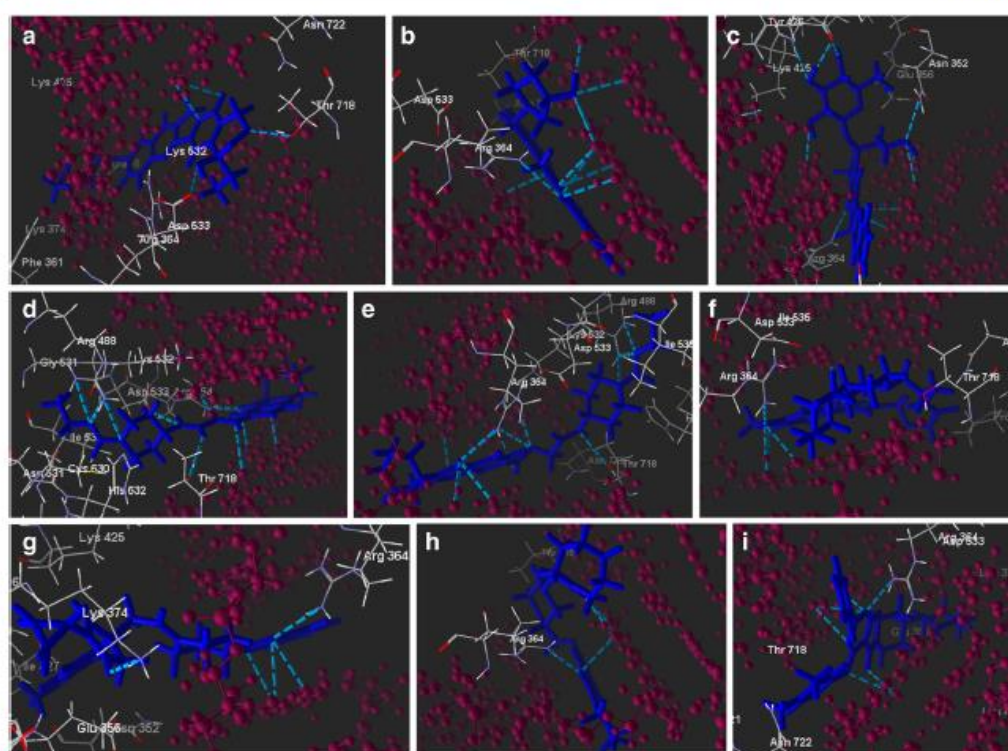


Fig. 6 **a** Hydrogen bond interactions between compound 96316309 and 1KT4. **b** Hydrogen bond interactions between compound 40407694 and 1KT4. **c** Hydrogen bond interactions between compound 95911711 and 1KT4. **d** Hydrogen bond interactions between compound 9407486 and 1KT4. **e** Hydrogen bond interactions between compound 18968484 and 1KT4. **f** Hydrogen bond interactions between compound 21868250 and 1KT4. **g** Hydrogen bond interactions between compound 12327513 and 1KT4. **h** Hydrogen bond interactions between compound 36369738 and 1KT4. **i** Hydrogen bond interactions between compound 34922052 and 1KT4

Conclusion

In this work, a molecular docking study has been performed in order to understand the binding interaction between a set of 738 camptothecin-like inhibitors and Top1–DNA complex. The following conclusions can be extracted from our findings:

- i. The top-ranked ligands have shown strong steric DNA–ligand interactions.
- ii. Irinotecan has the best ranked pose, on the basis of the two studied vectors of interactions Top 1–ligand and DNA–ligand.
- iii. Consistency between the molecular docking, and manual inspection of binding mode, confirmed that the inhibition process is governed by various non-covalent interactions including hydrogen bonds, steric interactions, and Van der Waals interactions between the DNA bases and ligand.

- iv. All the similar compounds were found to exhibit a potent inhibition activity compared with camptothecin, paving the way to the design and the synthesis of new molecules with improved inhibition potential.

Funding This work was supported by the General Direction for Scientific Research and Technological Development (DGRSDT) of the Ministry of Higher Education and Scientific Research of the Algerian Government.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Cattle RC, Radinsky BR (2004). *Toxicol Pathol* 32:116–121

2. Avendaño C, Menendez JC (2015) Medicinal chemistry of anticancer drugs 2nd edn. Elsevier, Amsterdam
3. Newman DJ, Cragg GM (2012). *J Nat Prod* 75:311–335
4. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C (2010). *Chem Biol* 17: 421–433
5. Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WGJ (1998). *Science* (80-) 279:1504–1513
6. Berger JM (1998). *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expr* 1400: 3–18
7. Tsao Y-P, Wu H-Y, Liu LF (1989). *Cell* 56:11–118
8. Champoux JJ (2001) *Annu. Rev. Biochem* 70:369–413
9. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sin GA (1966). *J Am Chem Soc* 88:3888–3890
10. Staker BL, Hjerrild K, Feese MD, Behnke CA, Burgin Jr AB, Stewart L (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15387–15392
11. Chrencik JE, Staker BL, Burgin AB, Pourquier P, Pommier Y, Stewart L, Redinbo MR (2004). *J Mol Biol* 339:773–784
12. Pommier Y (2006). *Nat Rev Cancer* 6:789
13. Wall ME, Wani MC (1995). *Cancer Res* 55:753–760
14. Gottlieb JA, Guarino AM, Call JB, Oliverio VT, Block JB (1970). *Cancer Chemother Rep* 54:461–470
15. Creaven PJ, Allen LM (1973). *Cancer Chemother Rep* 57:175–184
16. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985). *J Biol Chem* 260:14873–14878
17. Clements MK, Jones CB, Cumming M, Daoud SS (1999). *Cancer Chemother Pharmacol* 44:411–416
18. Romanelli S, Perego P, Pratesi G, Carenini N, Tortoreto M, Zunino F (1998). *Cancer Chemother Pharmacol* 41:385–390
19. Verma RP, Hansch C (2009). *Chem Rev* 109:213–235
20. Martino E, Della Volpe S, Terribile E, Benetti E, Sakaj M, Centamore A, Sala A, Collina S (2017). *Bioorg Med Chem Lett* 27:701–707
21. Drwal MN, Agama K, Wakelin LPG, Pommier Y, Griffith R (2011). *PLoS One* 6:e25150–e25150
22. Lauria A, Ippolito M, Almerico AM (2007). *J Mol Model* 13:393–400
23. Mulholland K, Wu C (2016). *J Chem Inf Model* 56:1872–1883
24. Arthur DE, Uzairu A (2018). *J Chin Chem Soc* 1–19
25. Pal S, Kumar V, Kundu B, Bhattacharya D, Preethy N, Reddy PM, Talukdar A (2019). *Comput Struct Biotechnol J* 17:291–310
26. Lao GS, Collins JR, Luke BT, Kroth H, Sayer JM, Jerina DM, Pommier Y (2002). *Biochemistry* 41:1428–1435
27. Yadav DK, Khan F (2013). *J Chemom* 27:21–33
28. Lao GS (2011). *PLoS One* 6:e24314–e24314
29. Khadka DB, Cho WJ (2013). *Expert Opin Ther Pat* 23:1033–1056
30. Song ZL, Wang MJ, Li L, Wu D, Wang YH, Yan LT, Morris-Natschke SL, Liu YQ, Zhao YL, Wang CY, Liu H, Goto M, Liu H, Zhu GX, Lee KH (2016). *Eur J Med Chem* 115:109–120
31. Puspaningtyas AR (2014). *Int Cur Pharm J* 3:265–269
32. Yang JM, Chen CC (2004). *Proteins Struct Funct Bioinf* 55:288–304
33. Korb O, Stützel T, Exner TE (2009). *J Chem Inf Model* 49:84–96
34. Wang J, Kollman PA, Kuntz ID (1999). *Proteins* 36:1–19
35. McDonald IK, Thomson JM (1994). *J Mol Biol* 238:777–793
36. Neelam K, Girendra G, Arun KG (2019). *Biol Forum* 11(1):77–83

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.