

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Djilali BOUNAAMA -KHEMIS MILIANA-



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Technologie

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes

Pour l'obtention de diplôme

Master

En

Génie des Procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Titre :

Simulation du pouvoir antioxydant de deux anticancéreux de la famille des antimétabolites

Présenté par :

Ghouthi Mohamed

Halbigue Hichem

Membres de jury :

Président de jury : Mr. Larbi Bouamrane Omar

Examineur : Mme. Hamad Taous

Encadreur : M^{elle} Boudergua Samia

Année Universitaire : 2018/2019.

Remerciements

Nous commençons par remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté pour pouvoir réaliser ce modeste travail.

Nous voudrions tout d'abord adresser toute nos reconnaissances à la directrice de ce mémoire, Mme BOUDERGUA SAMIA, merci de nous avoir proposés ce sujet.

Merci pour vos conseils.

Nous désirons encore remercier les enseignants de l'université de Khemis Miliana, qui ont fourni tous les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

À ceux et celles qui ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin à la réalisation de notre travail, nous disons **Merci** du fond du cœur.

Dédicaces

Au terme de ce modeste travail, fruits de mes efforts et de l'appui de beaucoup de ceux qui me sont chers, je tiens à le dédier :

A la mémoire de mon père

A mon plus grand de ma vie ma chère « Maman »

A mes adorables sœurs Naoual, Nacéra et Hassiba

A mes tantes, mes oncles sans exception.

A toute la famille Ghouti, Hatil et Bentasia.

A ma promotrice Mlle Samia Boudargua.

A tous mes enseignants et mes collègues de la deuxième année master génie des procédés pharmaceutiques 2018-

2019.

Ghouti Mohamed

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE

Merci d'être toujours derrière moi et de me soutenir tout
au long de ces années.

A MON TRÈS CHER PÈRE

Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai
demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta
fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant
te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit
et te protège de tout mal.

Mes frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des
exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Mes professeurs de l'université Khemis Miliana.

Halbigue hichem

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضادات الأوكسدة في الأدوية المضادة للسرطان. المشكلة إذن هي: هل هناك مضادات للسرطان مضادة للأوكسدة ؟

للإجابة على المشكلة ، أجرينا دراسة نظرية عن الفعالية ضد الأوكسدة تشمل استخدام عقارين من الأدوية المضادة للسرطان (الميثوتريكسيت وهيدروكسي يوريا) باستخدام برنامج الإرساء الجزيئي. حيث كانت فعاليتها مقارنة ل Resveratrol الذي يعتبر مرجعا للنشاط ضد التأكسد.

الكلمات الجوهرية : الإجهاد التأكسدي, مضادات الأوكسدة, الأدوية المضادة للسرطان, الإرساء الجزيئي .

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante dans les médicaments anticancéreux. La problématique est par conséquent la suivante : tout anticancéreux est-il antioxydant ?

Pour répondre à cette problématique, une simulation du pouvoir antioxydant est faite sur deux médicaments anticancéreux de la famille des antimétabolites (Méthotrexate et Hydroxyurée) en utilisant le docking moléculaire. Les résultats obtenus sont similaires à ceux de l'antioxydant de référence, le resveratrol.

Mots clé : stress oxydatif, antioxydants, médicaments anticancéreux, docking moléculaire.

Abstract

The objective of this study is to evaluate antioxidant activity in anticancer drugs. The problem is therefore: is any anticancer agent an antioxidant?

To answer to this problem, a simulation of the antioxidant activity is made for two anticancer drugs belonging to the antimetabolite class (Methotrexate and Hydroxyurea) using molecular docking. The results show a close activity to which of the resveratrol considered as a reference antioxidant.

Key words: oxidative stress, antioxidants, anticancer drugs, molecular docking.

Sommaire

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Chapitre I. Antioxydants

I.1.Introduction.....	02
-----------------------	----

I.2.Stress oxydatif.....	02
--------------------------	----

I.3.Excès de radicaux libre et stress oxydatif.....	03
---	----

I.4.Stress oxydatif et le cancer.....	04
---------------------------------------	----

I.5.Définition des antioxydants.....	06
--------------------------------------	----

I.6.Les antioxydants, haute efficacité contre les radicaux libres.....	06
--	----

I.7.Système de défense antioxydants.....	06
--	----

I.7.1.Les antioxydants enzymatique.....	06
---	----

I.7.2.Les antioxydants non enzymatiques.....	07
--	----

I.8.Antioxydant et prévention du cancer.....	08
--	----

I.9.Evaluation de l'activité antioxydante.....	08
--	----

I.9.1.Test au DPPH.....	09
-------------------------	----

I.9.2.Test TEAC.....	09
----------------------	----

I.9.3.Test ORAC.....	09
----------------------	----

I.9.4.Test FRAP.....	09
----------------------	----

I.9.5.Test TRAP.....	10
----------------------	----

I.9.6.Cyclovoltammétrie.....	10
------------------------------	----

I.9.7. Test à l'hémolyse des globules rouges.....	11
I.9.8. La résonance paramagnétique électronique (RPE).....	11
I.10. Conclusion.....	12
Chapitre II. Médicaments anticancéreux	
II.1. Introduction.....	13
II.2. Définition.....	13
II.3. Traitement médicament anticancéreux.....	13
II.4. Principe d'action des anticancéreux.....	14
II.4.1. Médicament cytotoxiques.....	14
II.4.1.1. Alkylants.....	14
II.4.1.2. Intercalants.....	14
II.4.1.3. Antimétabolites.....	15
II.4.1.4. Poisons du fuseau mitotique.....	15
II.4.2. thérapeutiques ciblées.....	17
II.4.3. Hormonothérapie	17
II.4.4. Immunomodulateurs.....	18
II.5. Chimiothérapie anticancéreuse.....	19
II.5.1. Comment fonctionne la chimiothérapie ?.....	19
II.6. Récepteurs des anticancéreux.....	19
II.7. Conclusion.....	20

Chapitre III. Docking

III.1.Introduction.....	21
III.2.Docking.....	21
III.2.1.Définition.....	21
III.2.2.Objectif de la réalisation d'une étude de docking.....	21
III.2.3. Eléments constitutifs d'une étude de docking moléculaire.....	21
III.2.3.1.Ligand.....	21
III.2.3.2.Récepteur.....	22
III.2.4. Serrure et clé (The Lock and Key Theory).....	22
III.2.5.Principes théoriques.....	23
III.2.6. Composantes de docking.....	24
III.2.7. Identification des interactions possibles au sein du site de liaison.....	26
III.2.7.1. Interactions électrostatique.....	26
III.2.7.2. Interactions Van der Waals.....	27
III.2.7.3.Ponts hydrogènes.....	27
III.3.Médicaments étudiés.....	28
III.3.1.Méthotrexate.....	28
III.3.1.1.Identification.....	28
III.3.1.2.Cas d'usage.....	29
III.3.2.Hydroxyurée.....	29

III.4. Enzymes utilisées.....	30
III.4.1. Tyrosine kinase.....	30
III.4.1.1. Mécanisme d'action.....	31
III.4.1.2. Exemples d'inhibiteurs TK.....	31
III.4.2. Peroxiredoxine 5.....	31
III.4.2.1. Mécanisme d'action.....	32
III.5. Conclusions.....	32

Chapitre IV. Résultats et Discussions

IV.1. Introduction.....	33
IV.2. Structure des deux enzymes.....	33
IV.2.1. Tyrosine Kinase.....	33
IV.2.2. Peroxiredoxine 5.....	34
IV.3. Interaction -Méthotrexate/ Enzyme-.....	35
IV.3.1. Propriétés moléculaire de méthotrexate.....	35
IV.3.2. Interaction de Méthotrexate avec la tyrosine kinase.....	36
IV.3.3. Interaction –Méthotrexate/ Peroxiredoxine 5-.....	37
IV.4. Interaction -Hydroxyurée/ Enzyme-.....	39
IV.4.1. Propriétés moléculaires de l'hydroxyurée.....	39
IV.4.2. Interaction -Hydroxyurée/Tyrosine kinase-.....	39
IV.4.3. Interaction de l'hydroxyurée avec la peroxyredoxine 5.....	40

IV.4. Interaction - (antioxydant de référence)/ Enzymes (Tyrosine kinase et peroxyredoxine 5)-.....	42
IV.4.1.Interaction -Resvétratol (antioxydant de référence 1)/ Enzymes (Tyrosine kinase et peroxyredoxine 5)-.....	42
IV.4.2. Interaction –Vitamine C (antioxydant de référence 2)/ Enzymes (Tyrosine kinase et peroxyredoxine 5)-.....	43
IV.5. Conclusion.....	45

Liste des abréviations

AAPH	Azobis AmidinoPropane Hydrochloride
ABTS	Acide 2, 2'-azino-bis (3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulphonique)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ala	Alanine
Arg	Arginine
ARN	Acide RiboNucléique
Asp	Aspartate
ATP	Phosphate De L'adénosine Triphosphate
BAP	Bis AmidinoPropane
DPPH	DiPhenyle Picryl Hydrazyl
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
Glu	Glucine
Gly	Glycine
Q10	Coenzyme
Leu	Leucine
Lys	Lysine

MTX	Méthotrexate
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PDB	Protein Data Bank
PH	Potentiel Hydrogène
PRDX5	Peroxirédoxine 5
RL	Radical Libre
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROO•	Radicaux Peroxyles
ROS	réactives de l'oxygène
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RTK	Récepteurs Tyrosine Kinase
SH	Thiols
SOD	SuperOxyde Dismutase
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TK	Tyrosine Kinase
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
UV	UltraViolet
Val	Valine

Liste des Figures

Figure I.1. Stress oxydatif.....	02
Figure I.2. formation des radicaux libres.....	03
Figure I.3. Radicaux libres et le stress oxydatif.....	04
Figure I.4. Stress oxydatif et le cancer.....	05
Figure I.5. Action des antioxydants sur les radicaux libres.....	06
Figure I.6. Système de défense des antioxydants.....	07
Figure II.1. Médicament anticancéreux.....	14
Figure II.2. Agents cytostatiques.....	16
Figure III.1. Serrure et clé.....	22
Figure III.2. Principe général d'un programme de docking.....	23
Figure III.3. Docking et scoring sous forme de processus en deux étapes.....	24
Figure III.4. Composantes de Docking.....	25
Figure III.5. Processus de docking.....	26
Figure III.6. Énergie de l'interaction de Van der Waals en fonction de la distance entre deux atomes.....	27
Figure III.7. Structure de méthotrexate.....	28
Figure III.8. Structure de l'hydroxyurée.....	30
Figure III.9. Fonction de tyrosine kinase.....	30

Figure IV.1. Structure secondaire de la tyrosine kinase.....	33
Figure IV.2. Détection des cavités dans la protéine tyrosine kinase.....	34
Figure IV.3. Structure secondaire de la peroxyredoxine 5.....	35
Figure IV.4. Détection des cavités dans la protéine peroxyredoxine 5...	35
Figure IV.5. Interaction -Tyrosine kinase/ Méthotrexate-.....	36
Figure IV.6. Acides aminés contribuant aux interactions (Tyrosine kinase/ Méthotrexate).....	36
Figure IV.7. Interaction de la peroxyredoxine 5 avec le méthotrexate...	37
Figure IV.8. Acides aminés intervenant dans les interactions entre la peroxyredoxine 5 et le méthotrexate.....	38
Figure IV.9. Interaction -Tyrosine kinase/Hydroxyurée-.....	39
Figure IV.10. Acides aminés intervenant dans l'interaction -Tyrosine kinase / Hydroxyurée-.....	39
Figure IV.11. Interaction -peroxyredoxine 5/ Hydroxyurée-.....	40
Figure IV.12. Acides aminés participant à l'interaction –peroxyredoxine 5 / Hydroxyurée-.....	41
Figure IV. 13. Structure chimique du resvératrol.....	42
Figure IV.14. Structure chimique de vitamine C.....	43

Liste des tableaux

Tableau II.1. Quelques médicaments cytotoxiques.....	15
Tableau II.2. Modulateurs de la réponse biologique (immunomodulateurs et Médicaments agissant sur une transmission hormonale).....	18
Tableau IV.1. Interaction -Tyrosine kinase/ Méthotrexate-.....	37
Tableau IV.2. Energies des interactions de la peroxyredoxine 5 avec le méthotrexate.....	38
Tableau IV.3. Interaction -Tyrosine kinase / Hydroxyurée-.....	40
Tableau IV.4. Estimation des valeurs des énergies et de longueurs de liaisons H pour le complexe -peroxyredoxine 5/ hydroxyurée-.....	41
Tableau IV.5. Propriétés des interactions H des complexes (Resvératrol / Enzyme).....	42
Tableau IV.6. Intervalles des valeurs d'énergie et de longueurs des liaisons H des complexes (Resvératrol/ Enzyme).....	43
Tableau IV.7. Interaction de la vitamine C avec les deux enzymes.....	44
Tableau IV.8. Ordre de grandeurs des énergies et de longueurs de liaisons H des complexes (Vitamine C/ Enzymes).....	44



Introduction générale

Introduction générale

Les maladies et les médicaments efficaces présentent un sujet de préoccupation pour toute l'humanité.

Le cancer est pour les chercheurs, un challenge à confronter car il est devenu généralisé en termes d'âge, de sexe, d'origine... Parmi les facteurs qui le cause, le stress oxydatif résultant de la production excessive des radicaux libres dans le corps humain, Il y a des molécules contre ces radicaux toxiques, appelé « les antioxydants », qui sont des substances très importantes et efficaces pour empêcher ou ralentir l'oxydation en neutralisant des radicaux libres dans l'organisme.

La plupart des recherches sur l'évaluation de l'activité antioxydante comptent sur les plantes.

Ce modeste travail a pour but d'évaluer le pouvoir antioxydant de quelques médicaments anticancéreux, pour pouvoir estimer la relation entre ces deux activités biologiques.

Pour répondre à ce problème, nous avons fait une simulation du pouvoir antioxydant de deux anticancéreux de la famille des anti-métabolites en utilisant un le Docking moléculaire.

Ce mémoire étudie en première partie les antioxydants, leur effet sur la santé et les divers tests qui détectent leur activité. Ainsi que les médicaments anticancéreux et leurs principales classes.

La deuxième partie concerne le docking et les interprétations des résultats obtenus.



Chapitre I. Antioxydants

Chapitre I : Antioxydants

I.1.Introduction

Notre système immunitaire a besoin des radicaux libres pour la lutte contre les bactéries qui tentent de nous infecter. Il faut alors satisfaire un équilibre entre la quantité des radicaux libres et la quantité d'antioxydants pour qu'ils se neutralisent. Lorsque cet équilibre est perturbé, un dysfonctionnement physiologique peut commencer à dégénérer. Lorsque les radicaux libres (pro-oxydants) dépassent les antioxydants, cela peut conduire à un état appelé stress oxydatif.

I.2.Stress oxydatif

Le stress oxydatif est créé à cause d'un déséquilibre quotidien et constant dans le corps entre les radicaux libres et les antioxydants [1]. Le stress oxydatif n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique [2].



Figure I.1.Stress oxydatif [1].

Un **radical libre (RL)** est un atome ou groupement qui se caractérise par la présence d'un **électron célibataire**, c'est-à-dire non apparié (Figure I.2.), ce qui le rend instable et donc agressif vis-à-vis les molécules voisines [3].



Figure I.2. Formation des radicaux libres [3].

Les radicaux libres sont des molécules synthétisées naturellement par l'organisme et jouent un rôle dans la défense immunitaire. Chaque fois que l'on respire, l'utilisation de l'oxygène par l'organisme entraîne la formation des radicaux libres. Néanmoins, certains facteurs extérieurs, peuvent les libérer en très grand nombre, les antioxydants sont chargés de freiner cette production [4].

I.3.Excès de radicaux libres et stress oxydatif

L'effet des radicaux libres peut être amplifié par différents facteurs de deux origines:

- **Facteur internes :** (inflammation, infection, déficit immunitaire, stress, vieillissement, Etc.)
- **Facteur externes :** (pollution, tabac, rayons UV, traumatismes, hygiène de vie déséquilibrée,.....etc.) [5] (Figure I.3).

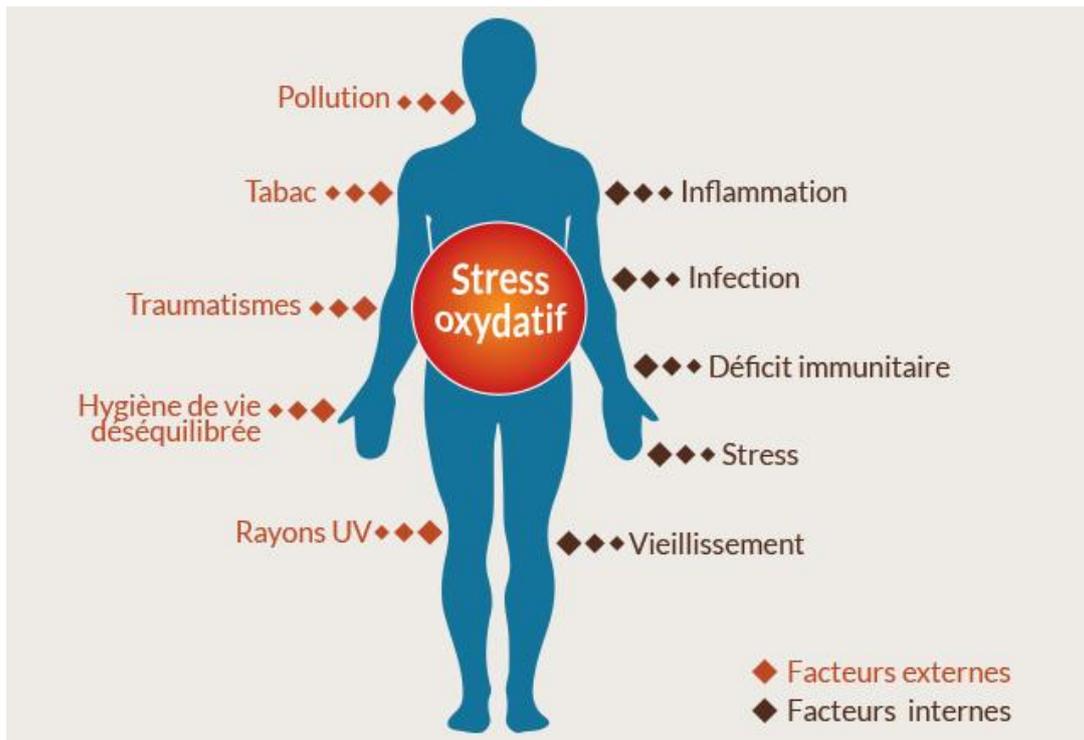


Figure I.3. Radicaux libres et stress oxydatif [6].

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des changements tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN et des lipides.

I.4. Stress oxydatif et le cancer

Le stress oxydatif affecte directement l'ADN de nos cellules. Il est connu que l'ADN est très sensible à l'attaque des radicaux libres ce qui peut entraîner sa rupture, et donc le vieillissement des cellules. Sur le long terme, ces ruptures peuvent provoquer le développement d'un cancer.

À l'intérieur du noyau de chaque cellule, il y a des corps microscopiques appelés « chromosomes » structurés par paires. Ils sont responsables de la fonction et de la reproduction de chaque cellule de l'organisme. L'être humain possède 46 chromosomes constitués de deux grosses molécules ou brins d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui constituent le code génétique.

L'ADN est formé de quatre acides nucléiques : l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine. La structure de ces acides dans l'ADN représente le code génétique qui détermine chaque caractéristique dans un individu, qu'il aura à la fin de sa croissance

et même sa vulnérabilité à certaines maladies. Les radicaux libres attaquent les composants de l'ADN et conduisent à son dysfonctionnement.

Lorsqu'une cellule se divise pour se reproduire, une copie exacte des chromosomes qui la composent est créée pour la nouvelle cellule. Si l'ADN du chromosome est endommagé, les instructions qui contrôlent la fonction de la cellule et sa reproduction le seront également. Si la cellule se reproduit au lieu de mourir, une nouvelle cellule mutée peut voir le jour. Dans de nombreux cancers, les instructions qui arrêtent la croissance de la cellule sont parfois altérées, si bien que les cellules se reproduisent indéfiniment. Le taux anormal des radicaux libres et leurs interactions avec l'ADN peuvent endommager les cellules de cette manière et induire des différentes maladies de cancer [7].

En outre, ces radicaux libres, en endommageant les cellules de l'organisme, peuvent être un précurseur dans l'apparition de plusieurs maladies cardiaques, maladie de parkinson, celle d'Alzheimer et d'autres...La solution se réside dans l'utilisation des antioxydants. Des études suggèrent qu'un régime alimentaire riche en antioxydants des fruits et légumes soit associé à un risque inférieur des maladies citées ci-dessus [8].

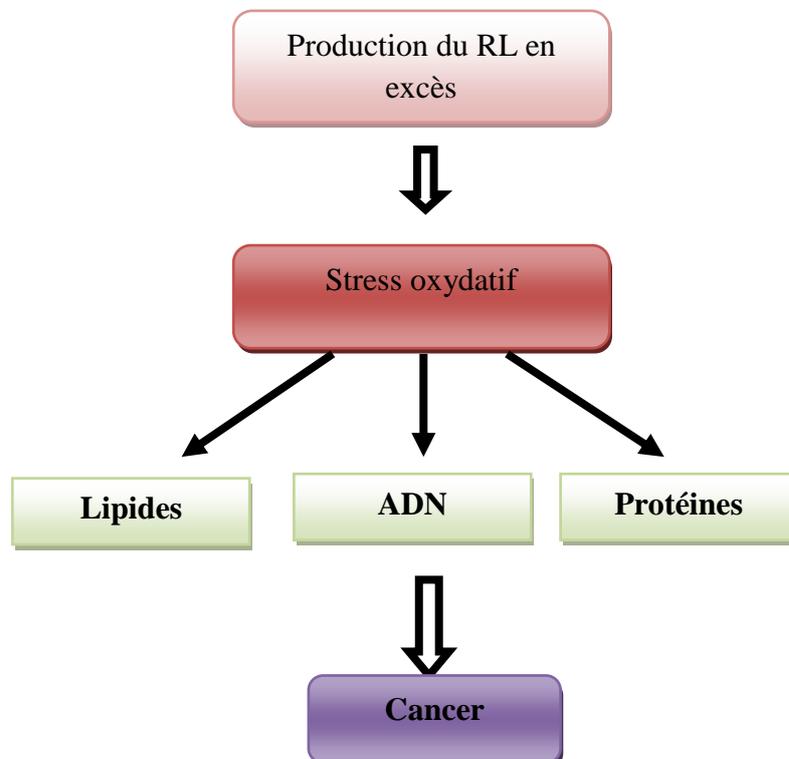


Figure I.4. Stress oxydatif et le cancer

I.5. Définition des antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute substance (molécule) présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable pour empêcher ou ralentir l'oxydation en neutralisant des radicaux libres dans l'organisme.

Quelques antioxydants sont synthétisés par le corps humain, et d'autres doivent être apportés par notre alimentation [9].

I.6. Antioxydants : haute efficacité contre les radicaux libres

Les antioxydants neutralisent les radicaux libres en leur donnant un électron et les transforment en molécules stables non nocives pour le corps [3].



Figure I.5. Action des antioxydants sur les radicaux libres [3].

I.7. Système de défense des antioxydants

Les antioxydants sont de deux types: sous forme enzymatique ou non enzymatique. Leur rôle est triple:

- ils empêchent la formation de radicaux libres,
- ils les éliminent quand ils sont en excès,
- et ils réparent les cellules endommagées [9].

I.7.1. Antioxydants enzymatique

Ils sont synthétisés par notre organisme il peut s'agir de facteur spécifique comme l'acide alpha – lipoïque , l'acide urique , la coenzyme Q10 , mais ce sont aussi des enzymes (catalase, glutathion, réductases, superoxyde dismutase) qui ont besoin

d'être mises en présence de minéraux issus des aliments pour être activées: fer pour la catalase, zinc et cuivre pour la superoxyde dismutase, sélénium pour le glutathion-peroxydases, ce qui favorise directement les antioxydants apportés par l'alimentation [4].

I.7.2. Les antioxydants non enzymatiques

Ils sont présents dans notre assiette, ce sont:

- ✓ **Certaines vitamines** : C, E, mais aussi B₂ (Riboflavine),
- ✓ **Des oligo-éléments** : zinc, cuivre, sélénium, fer, nécessaire pour activer des enzymes protecteurs,
- ✓ **Des composés de fruit et légumes** : caroténoïdes, polyphénols,
- ✓ **Des composés des épices et aromates** : terpènes [4].

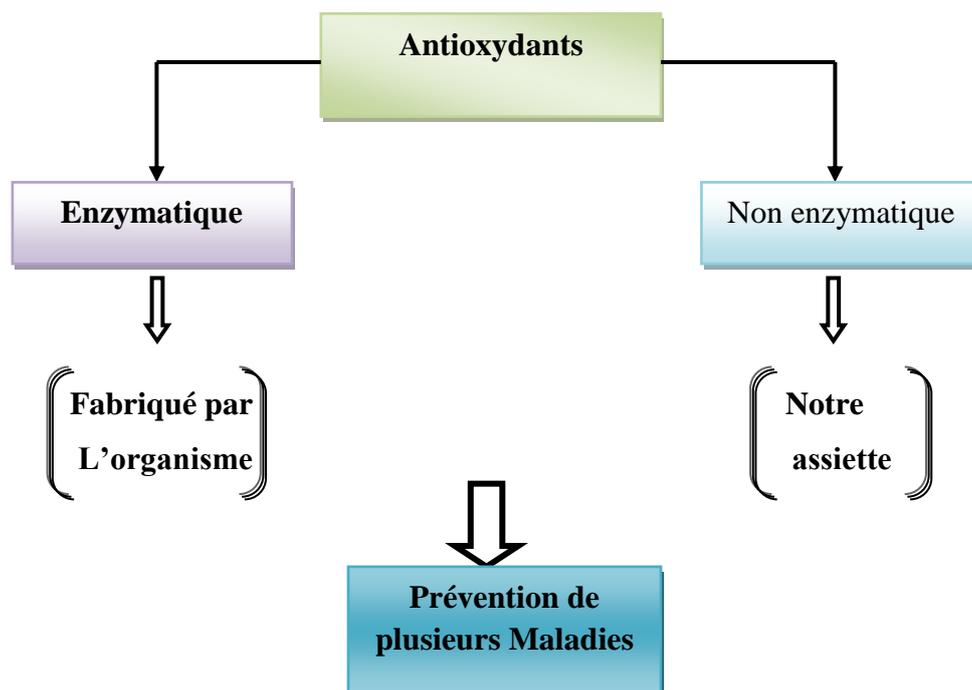


Figure I.6. Système de défense des antioxydants

I.8. Antioxydant et prévention du cancer

S'il est actuellement admis que la modification des comportements alimentaires participe à l'augmentation de l'incidence du cancer avec des taux importants et que la consommation de fruits et de légumes frais réduirait le risque de cancer de 30% à 40%, les composants anti- carcinogènes de l'alimentation restent à déterminer. Parmi les molécules les plus intéressantes, les antioxydants tels que : β -carotène (provitamine A), vitamine C, tocophérol (vitamine E), sélénium ...contenus en quantité dans les fruits et légumes et qui font l'objet de multiples travaux de recherche fondamentaux et épidémiologique.

En effet, les radicaux libre produits par la respiration cellulaire et augmentés lors du « stress oxydatif », sont à l'origine de phénomènes d'oxydation responsables de dommages cellulaires (lésions de l'ADN, des protéines et d'enzymes) pouvant conduire à une transformation cancéreuse de la cellule [10].

En dépit de quelques résultats apparemment contradictoires, des recherches considérables suggèrent que les antioxydants puissent aider à empêcher les dommages cellulaires provoqués par les radicaux libres qui sont associés au cancer, et que les antioxydants peuvent donc ralentir, et probablement même arrêter le développement du cancer. Les tests cliniques continuent à étudier les effets potentiels des antioxydants sur le cancer chez l'homme. Les antioxydants diététiques liés à la prévention du cancer incluent la catéchine et d'autre polyphénols trouvés dans le thé ; ils peuvent aider à empêcher les cancers du colon et de la peau. Le resveratrol, trouvé dans les raisins rouges, peut contribuer à empêcher les cancers de poumon, de sein, de colorectal, et de prostate. En outre, la forme immunise – amplification d'alpha – tocophérol de la vitamine E trouvée dans les huiles végétales, l'huile de germe de blé, et les graines peuvent diminuer le risque de cancer de poumon de plus de 50 %, selon des chercheurs au centre de cancer à l'université du Texas [5].

I.9. Evaluation de l'activité antioxydante

Depuis ces dernières décennies, l'activité antioxydante a pu attirer l'attention des chercheurs dans l'objectif d'étudier son importance pour la santé humaine et l'incorporation des molécules dotées de cette propriété dans les formulations pharmaceutiques et alimentaires. Pour ce fait, les tests d'activité antioxydante ont été

largement développés pour évaluer l'efficacité de nouveaux composés. De nombreuses méthodologies sont disponibles, permettant d'évaluer les différents aspects physico-chimiques du potentiel antioxydant dans différentes conditions [11].

I.9.1. Test au DPPH

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 Diphényl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune.

I.9.2. Test TEAC

La méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) permet d'évaluer le pouvoir d'un composé à piéger le radical cation ABTS•+ (obtenu à partir de sels d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La particularité de cette méthode est l'aspect compétitif puisque la mesure sera comparée à la capacité d'un antioxydant de référence le Trolox, où ce dernier est un analogue chimique de la vitamine E.

I.9.3. Test ORAC

Le test ORAC (ou Oxygen Radical Absorbance Capacity) est une méthode de mesure de la capacité antioxydante des échantillons biologiques in vitro. Cette méthode mesure la dégradation oxydative d'une molécule fluorescente après ajout d'un générateur de radicaux libres, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH). La dégradation thermique de cette molécule en présence d'oxygène va provoquer la génération de radicaux libres de façon régulière qui vont pouvoir attaquer la membrane des globules rouges.

I.9.4. Test FRAP

Le test FRAP (ou Ferric Reducing Ability of Plasma) est une méthode basée sur le changement de coloration lors de la réduction du fer après un transfert d'électrons, c'est un passage de l'ion ferrique (Fe^{3+}) à l'ion ferreux (Fe^{2+}). Cette réduction se fait grâce à la présence d'un antioxydant capable de céder des électrons. Le transfert d'atome d'hydrogène ne sera pas, donc, le mécanisme privilégié. L'absorbance est mesurée à 593 nm.

Ce test est peu coûteux, simple, reproductible et rapide. Toutefois il n'est pas capable d'évaluer l'activité antioxydante des thiols (SH), incluant donc les polypeptides et les protéines à groupement cystéine.

I.9.5. Test TRAP

Ce test TRAP (ou Telomeric Repeat Amplification Protocol) est spécifique de l'action des antioxydants sur les radicaux peroxydes $\text{ROO}\cdot$. Ces radicaux vont être produits par des générateurs de radicaux libres. Pour ce test, le BAP [2,2-azo-bis(2-amidinopropane) chlorhydrate] ou le AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane)] seront utilisés.

Cette méthode permet de quantifier les antioxydants non enzymatiques ainsi que de mesurer la capacité antioxydante du plasma et du sérum. En revanche, cette méthode se base sur le fait que chaque antioxydant possède un temps de latence avant son action. Ainsi la corrélation avec d'autres méthodes d'évaluation est particulièrement compliquée [12].

I.9.6. Cyclovoltammétrie

La cyclovoltammétrie ou voltammétrie cyclique est une méthode d'analyse physique capable de caractériser des composés oxydables et réductibles en solution. Elle consiste à mesurer un courant en fonction d'un potentiel appliqué. Le courant est directement lié aux changements d'état d'oxydoréduction du système étudié. Plus un système s'oxyde facilement, plus il est réducteur et donc son potentiel antioxydant est intéressant.

Le matériel nécessaire est constitué de 3 électrodes : une électrode de référence, une électrode de travail et une contre-électrode. Un électrolyte sera ajouté à la solution afin d'obtenir une conductivité suffisante.

Augmenté de façon linéaire jusqu'à un maximum E_{max} . Il sera ensuite diminué progressivement jusqu'à un minimum E_{min} . Enfin, le potentiel sera ramené progressivement au potentiel initial E_0 . De cette manière, plusieurs cycles seront mesurés. A partir de l'évolution de l'intensité en fonction du potentiel, les potentiels Redox d'un système peuvent être obtenus, mais également d'autres informations plus fondamentales telles les niveaux énergétiques des orbitales moléculaires de frontières, indicateurs importants du transfert électronique.

I.9.7. Test à l'hémolyse des globules rouges

Ce test consiste à prélever sur de l'EDTA (ou Éthylène Diamine Tétra-Acétique) du sang qui sera ensuite centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes afin d'extraire un culot de globules rouges. Ce culot sera lavé puis mis en contact avec le générateur de radicaux libre AAPH à 37°C.

Quand les antioxydants endogènes seront consommés, les radicaux libres agiront alors sur les parois des érythrocytes entraînant alors leur éclatement. L'hémoglobine sera alors reléguée dans le milieu. Ce phénomène d'hémolyse sera suivi par spectrophotométrie à 545nm. Si dans le milieu sont présents des composés à activité antioxydante, l'hémolyse sera logiquement retardée. Cette méthode nécessite un étalonnage en utilisant la vitamine C comme référence.

I.9.8. La résonance paramagnétique électronique (RPE)

Cette méthode est une technique très utilisée pour visualiser directement les radicaux libres que ce soit in vitro ou in vivo. Elle suit le même principe que la résonance magnétique nucléaire, à savoir l'absorption et la réémission d'énergie provenant d'un rayonnement électromagnétique extérieur.

Les radicaux libres se caractérisent par la présence d'un électron libre, qui par son mouvement de spin, va produire un champ magnétique. Si le radical se trouve dans un champ magnétique extérieur puissant et dirigé, il en résultera une absorption d'énergie qui pourra être visualisée sous la forme d'un spectre. Plus la quantité de radicaux libres présents dans le milieu sera importante, plus l'absorbance sera grande. Cette méthode est idéale pour évaluer les emballements de processus oxydatif. Par exemple, l'inhibition de la peroxydation lipidique par des antioxydants est aisément quantifiable. Un antioxydant enrayera rapidement la phase de propagation empêchant la formation de nouveaux radicaux. Un autre exemple est la quantification de production d'oxygène singlet dans le milieu. Pour la quantification du radical anion superoxyde, la méthode est fréquemment calibrée en utilisant l'efficacité de superoxyde dismutase (SOD) [11].

I.10. Conclusion

Un antioxydant est une substance capable de prévenir, réduire ou réparer des effets négatifs causés par les radicaux libres.

Il peut diminuer ou empêcher l'oxydation cellulaire. Il existe différents types d'antioxydants. Parmi eux on trouve les vitamines A, C, E qui luttent contre la production exagérée de radicaux libres et s'opposent aux phénomènes toxiques.

Une bonne santé résulte d'un bon équilibre entre la production inéluctable de radicaux libres et l'action des antioxydants.

Si un déséquilibre intervient, il aura des conséquences plus au moins graves sur la santé. Il faut, donc, veiller à enrichir nos plats par des aliments riches en antioxydants.



Chapitre II. Médicaments anticancéreux

Chapitre II. Médicaments anticancéreux

II.1.Introduction

Les cancers sont des proliférations anarchiques de cellules anormales, immortelles en l'absence de traitement, ayant la possibilité de se déplacer par voie sanguine ou lymphatique et de former de nouvelles colonies ou métastases sur d'autres sites de l'organisme. De nombreux facteurs génétiques, chimiques et / ou viraux peuvent être à l'origine d'une cancérogenèse.

L'objectif de traitement par des anticancéreux (antinéoplasiques ou cytostatiques) est d'entraver la prolifération cellulaire. Les anticancéreux sont divisés selon les diverses cibles à différents niveaux du cycle cellulaire (ADN et les métabolites entrant dans leur constitution, tubuline, oncogènes, enzymes intervenant au cours de la division cellulaire) [13].

II.2.Définition

Un médicament anticancéreux est destiné à lutter contre le cancer quel que soit le mécanisme. Il peut détruire les cellules malignes dont la croissance spontanée ne connaît pas de limites, ou arrêter cette croissance, ou encore aider l'organisme à les éliminer plus efficacement [14].

II.3.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 [15].

Les grands types de traitement médicamenteux anticancéreux sont les médicaments cytotoxiques, les thérapies ciblées, l'hormonothérapie et les immunomodulateurs.

Le traitement de la maladie cancéreuse met souvent en œuvre plusieurs types de médicaments, de manière successive ou concomitante.

II.4.Principe d'action des anticancéreux

La figure II.1 illustre les principales classes des médicaments anticancéreux.

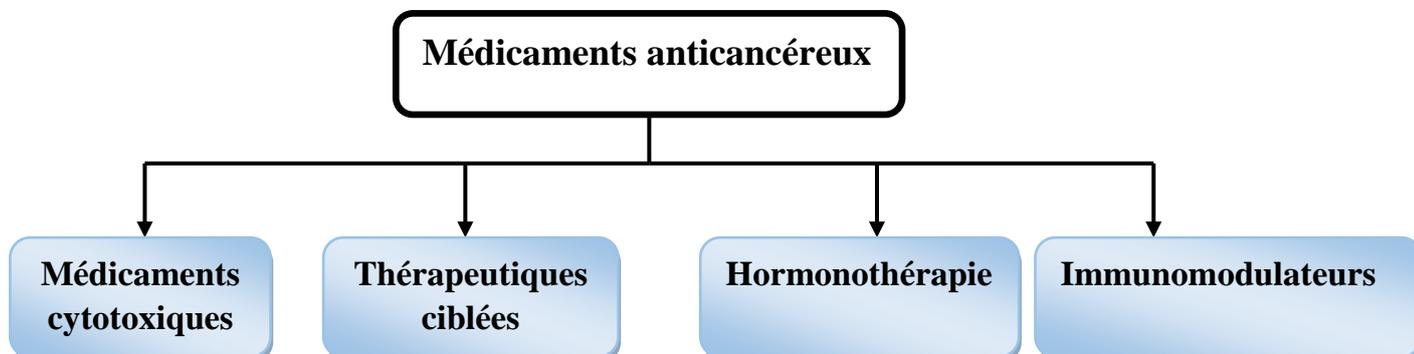


Figure II.1. Médicaments anticancéreux.

II.4.1.Médicament cytotoxiques

Les cytotoxiques ont pour but d'altérer le fonctionnement de la cellule cancéreuse soit en empêchant la cellule de se diviser, soit en provoquant des altérations métaboliques ou morphologiques conduisant à la mort cellulaire.

Ils sont classés en :

II.4.1.1.Alkylants

Médicaments induisant des modifications de l'ADN (liaisons covalentes intrabrin ou interbrins d'ADN):

- moutardes à l'azote;
- organoplatines;
- autres (nitroso-urées, triazenes...) [13].

II.4.1.2.Intercalants

Ils ont une action sur la structure de l'ADN; ils inhibent les topoisomérases intervenant dans les mécanismes de torsion de la double hélice. On distingue :

- les inhibiteurs de la topo-isomérase I.
- les inhibiteurs de la topo-isomérase II (anthracyclines, notamment).

II.4.1.3.Antimétabolites

Ils ont une action sur les bases ADN; ils inhibent la synthèse de l'ADN et des protéines.

Les 3 classes principales d'antimétabolites sont :

- les antagonistes pyrimidiques.
- les antagonistes foliques.

➤ les antagonistes puriques.

II.4.1.4. Poisons du fuseau mitotique

Ces poisons arrêtent le processus mitotique (alcaloïdes de la pervenche) et inhibent la dépolymérisation des microtubules (taxanes) [17].

Tableau II.1. Quelques médicaments cytotoxique [18].

Les alkylants	
Dénomination commune internationale	Nom de spécialité
Moutardes à l'azote	
busulphan	Busilvex®
Dérivés du platine	
cisplatine	Cisplatine® Cisplatyl®
Nitrosourées	
carmustine	Bicnu® Gliadel®
Autres	
mitomycine C	Amétycine®
Les intercalants	
Inhibiteurs de la topoisomérase I	
irinotécan	Campto®
Inhibiteurs de la topoisomérase II (Anthracyclines, épipodophyllotoxines)	
doxorubicine	Adriblastine®
Les antimétabolites	
Antipyrimidiniques	
Fluorouracile (5-FU)	Fluorouracile®
Antipuriques	
Clofarabine	Evoltra®
Anti-foliques	
Méthotrexate	Méthotrexate® Ledertrexate®
Les poisons du fuseau mitotique	
Les alcaloïdes de la Pervenche	
vinblastine	Velbé®
Les alcaloïdes de l'If (taxanes)	
paclitaxel	Taxol®

La figure II.2 récapitule les types des médicaments cytotoxiques et leurs principes d'action.

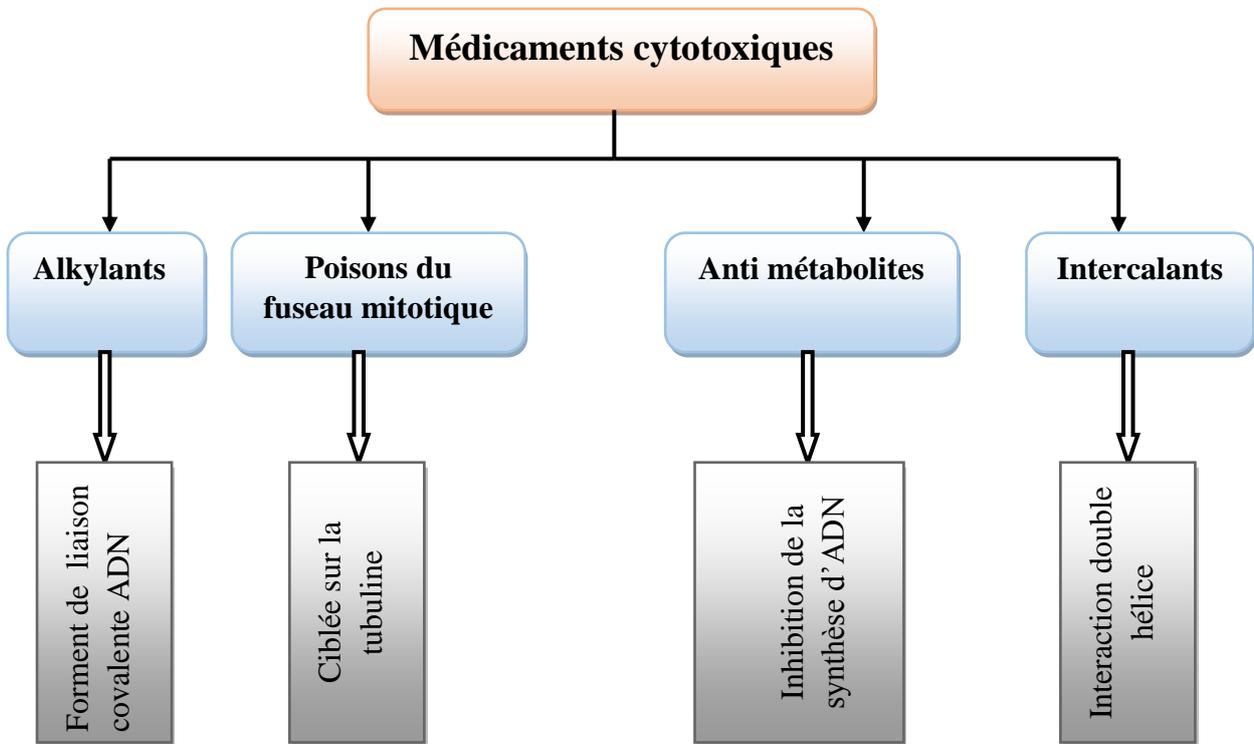


Figure II.2. Agents cytostatiques.

II.4.2. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées désignent des thérapies dirigées contre des cibles moléculaires présentes sur la cellule cancéreuse et supposées jouer un rôle dans sa transformation ou sa prolifération néoplasique.

Les cibles moléculaires concernées peuvent être des anomalies moléculaires responsables de la transformation néoplasiques ou des anomalies moléculaires contribuant à la progression tumorale.

Ces thérapies ciblées n'ont pas d'impact sur les cellules saines ne présentant pas les anomalies moléculaires.

Une cellule devient cancéreuse suite à l'accumulation d'altération génétique (d'origine héréditaire ou environnementale). Ces altérations concernent des gènes codant des protéines de régulation de la croissance cellulaire. Ces gènes sont :

- soit des oncogènes, ce qui aboutit à une protéine hyperactive ou surexprimé.
- soit des gènes suppresseurs, ce qui aboutit à une protéine inactive ou absente.

Au niveau cellulaire, les protéines de régulation se fixent à des récepteurs membranaires aux niveaux de la membrane cytoplasmique : récepteur de tyrosines kinases. Cette liaison entraîne l'activation de seconds messagers puis la transduction du signal au niveau de cytoplasme et la repense au niveau du noyau.

Les inhibiteurs des récepteur de tyrosines kinases, en bloquant l'activité de ces récepteurs spécifiques aux cellules tumorales, bloquent la transduction du signale et donc la croissance tumorale [19].

II.4.3.Hormonothérapie

Elle a pour but de supprimer ou de réduire le taux et l'action des hormones susceptible de favoriser la croissance tumorales. Les cancers qui présentent une sensibilité aux traitements hormonaux sont les cancers de sein, de la prostate, de la thyroïde, de l'endomètre, et également, mais a un moindre degré, du testicule, de l'ovaire et des reins.

Ce sont :

- les agonistes de la LH-RH ou les antiandrogènes dans le cancer de la prostate.
- les antioestrogènes dans le cancer du sein [19].

II.4.4.Immunomodulateurs

L'utilisation de ces médicaments repose sur le postulat selon lequel l'organisme est capable de détecter la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses et de les éliminer. L'utilisation d'immunomodulateurs a pour objectif de stimuler le système immunitaire afin d'accroître l'élimination des cellules cancéreuses.

Les immunomodulateurs constituent toute une famille de drogues qui vont (interleukine, interféron) aux inhibiteurs des tyrosines kinases, en passant par les anticorps monoclonaux et l'hormonothérapie [19].

Tableau II.2. Modulateurs de la réponse biologique (immunomodulateurs et Médicaments agissant sur une transmission hormonale) [18].

Immunomodulateurs et hormonothérapie	
Dénomination commune internationale	Nom de spécialité
Modulateurs de la réponse de l'hôte	
BCG thérapie	Immucyst®
Antagonistes hormonaux et inhibiteurs de l'aromatase	
Dirigés « contre » les oestrogènes	
Antagonistes du récepteur des oestrogènes	
fulvestrant	Faslodex®
Inhibiteurs de l'aromatase	
exemestane	Aromastine®
Dirigés « contre » la testostérone	
Antagoniste de la Gn-RH	
dégarélix	Firmagon®
Antagonistes de la testostérone	
cyprotérone	Androcur®
Agonistes hormonaux	
Agonistes de la LH-RH	
leuproréline	Enantone®
Oestrogènes	
diéthylstilbestrol	Distilbène®
Progestatifs	
médroxyprogestérone	Dépo-Prodason® Farlutal®
Analogues de la somatostatine	
lanréotide	Somatuline®

II.5.Chimiothérapie anticancéreuse

Il s'agit de traitement appliqué dans la circulation générale par perfusion généralement, baignant ainsi tout les organes, pour neutraliser d'éventuelle cellule cancéreuse ou quelle soit. La chimiothérapie est donc destinée aux cellules qui n'ont été traitées ni par la chirurgie ni par la radiothérapie [20].

Elle a pour but d'inhiber la croissance tumorale à l'aide des médicaments interférant dans la synthèse protéique ou bloquant la division cellulaire [21].

II.5.1.Comment fonctionne la chimiothérapie ?

Il existe de nombreux médicaments de chimiothérapie. Ils sont le plus souvent associés entre eux. Ils détruisent directement les cellules cancéreuses ou les empêchent de se multiplier. Le choix des médicaments est adapté en fonction de chaque situation : chaque cancer est particulier et nécessite un traitement approprié [22].

II.6.Récepteurs des anticancéreux

Les récepteurs des anticancéreux se divisent en :

- **Inhibiteurs de topo-isomérases** : Les topo-isomérases sont des enzymes entraînant un dénouement de l'ADN
 - La topo-isomérase I coupe un seul des 2 brins d'ADN.
 - La topo-isomérase II coupe les 2 brins de la molécule d'ADN. Les inhibiteurs Topo I ou II entraînent un blocage de ce dénouement
- **Inhibiteurs de tyrosine kinase**
- **Anti-aromatases** : Ils permettent d'inhiber la synthèse des estrogènes d'origine extra-ovarienne.
- **Anti-estrogènes** : Les molécules anticancéreuses se fixent sur le récepteur des estrogènes et l'inhibent, elles empêchent les hormones naturelles d'agir.
- **Anti-androgènes non stéroïdiens** : On les appelle les X-lutamides.

Ils inhibent la capture des androgènes surrénaliens par la prostate, et inhibent leurs effets au niveau des récepteurs nucléaires [23].

II.7. 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.



Chapitre III. Docking

Chapitre III. Docking

III.1.Introduction

Le docking moléculaire principalement utilisé dans le développement de médicaments fournit une gamme d'outils précieux pour leurs conceptions et analyse. La visualisation simple de molécules et l'accès facile aux bases de données structurales sont devenus des composants essentiels sur le bureau du chimiste médical. L'application la plus importante de docking moléculaire est le criblage virtuel. Divers programmes d'amarrage ont été développés pour visualiser la structure tridimensionnelle de la molécule et le score docking peut également être analysé à l'aide de différentes méthodes de calcul [24].

III.2.Docking

III.2.1.Définition

Le docking est une méthode qui prédit l'orientation d'une molécule par rapport à une autre pour avoir le complexe (médicament-récepteur) le plus stable.

Il est fréquemment utilisé sur l'étude de la cible moléculaire des Médicaments et réduire les essais expérimentaux.

La désignation des complexes est basée sur deux approches

- la complémentarité des surfaces,
- le calcul de l'énergie du complexe [25].

III.2.2.Objectif de la réalisation d'une étude de docking

Le docking moléculaire a pour but de maîtriser les interactions faites entre un ligand et un récepteur afin de former un complexe à partir de deux ou plusieurs molécules, en balayant les orientations dans l'espace et les conformations favorables pour cette fixation ligand - récepteur [26].

III.2.3. Eléments constitutifs d'une étude de docking moléculaire

Le docking est devenu actuellement un outil indispensable en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique (protéine).

III.2.3.1.Ligand

Un ligand est un atome, un ion ou une molécule portant des fonctions chimiques lui permettant de se lier à un ou plusieurs atomes ou ions centraux. Le terme de ligand

est le plus souvent utilisé en chimie de coordination et en chimie organométallique (branches de la chimie inorganique).

En biologie, un ligand (du latin ligandum, liant) est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal. Ce terme, très utilisé pour l'étude de protéines, désigne les molécules qui interagissent avec la protéine de manière non-covalente et spécifique et qui jouent un rôle dans ses fonctions [27].

III.2.3.2. Récepteur

Les structures 3D des protéines et ADN/ARN sont rassemblées dans la banque de donnée PDB. Ces données structurales sont obtenues par cristallographie aux rayons X et par spectroscopie RMN.

En plus des structures, on y retrouve aussi des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée [28].

III.2.4. La théorie de la serrure et la clé (The Lock and Key Theory)

Emil Fischer avait proposé un modèle appelé "modèle du Serrure et clé" dès 1890 (Figure III.1), qui explique le fonctionnement des systèmes biologiques. Un substrat s'intègre dans le site actif d'une macromolécule, tout comme une clé s'intègre dans une serrure. Les serrures biologiques ont des caractéristiques stéréochimiques uniques nécessaires à leur fonction [24].

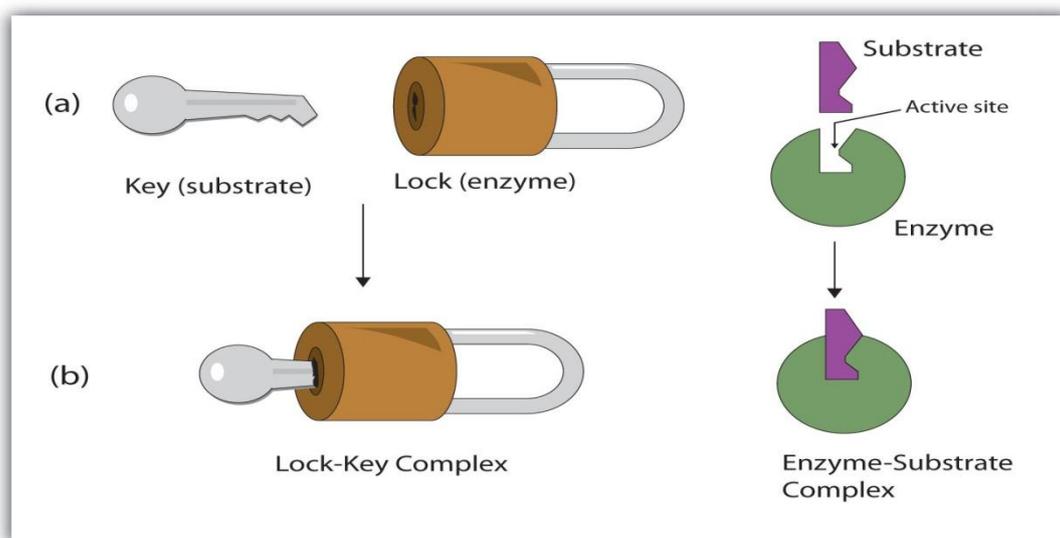


Figure III.1. Serrure et clé [29].

III.2.5.Principes théoriques

Le docking (ou arrimage) consiste à :

- ✓ chercher la position optimale pour le ligand dans le site de liaison d'un récepteur,
- ✓ optimiser les interactions avec un récepteur,
- ✓ évaluer les interactions ligand-récepteur,
- ✓ prédire la structure tridimensionnelle intermoléculaire du complexe formé par deux molécules (ligand-récepteur),
- ✓ calculer l'énergie de liaison (ligand-récepteur).
- ✓ aider à décider quel ligand candidat interagira le mieux avec un récepteur protéine cible.

Le docking se divise en deux étapes distinctes. La première section consiste en algorithmes de recherche, ces algorithmes sont capables de générer un grand nombre de structures possibles et de déterminer le mode de liaison. La deuxième section est consacrée au scoring, qui sont des méthodes mathématiques, utilisées pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison entre deux molécules après avoir été passées par l'étape de docking. Le meilleur résultat pour le docking et le complexe protéine-ligand avec la plus faible énergie [30].

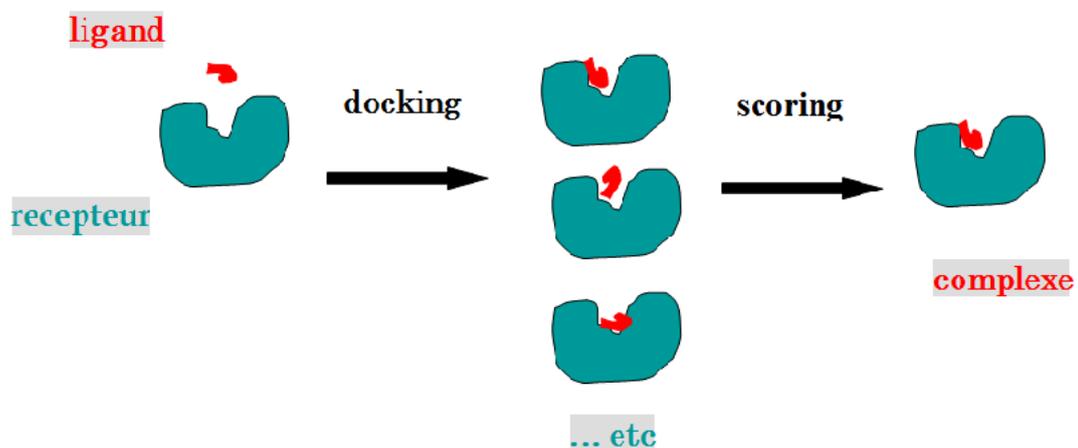


Figure III.2.Principe général d'un programme de docking [31].

La figure III.3 montre encore une explication des notions de docking/scoring.

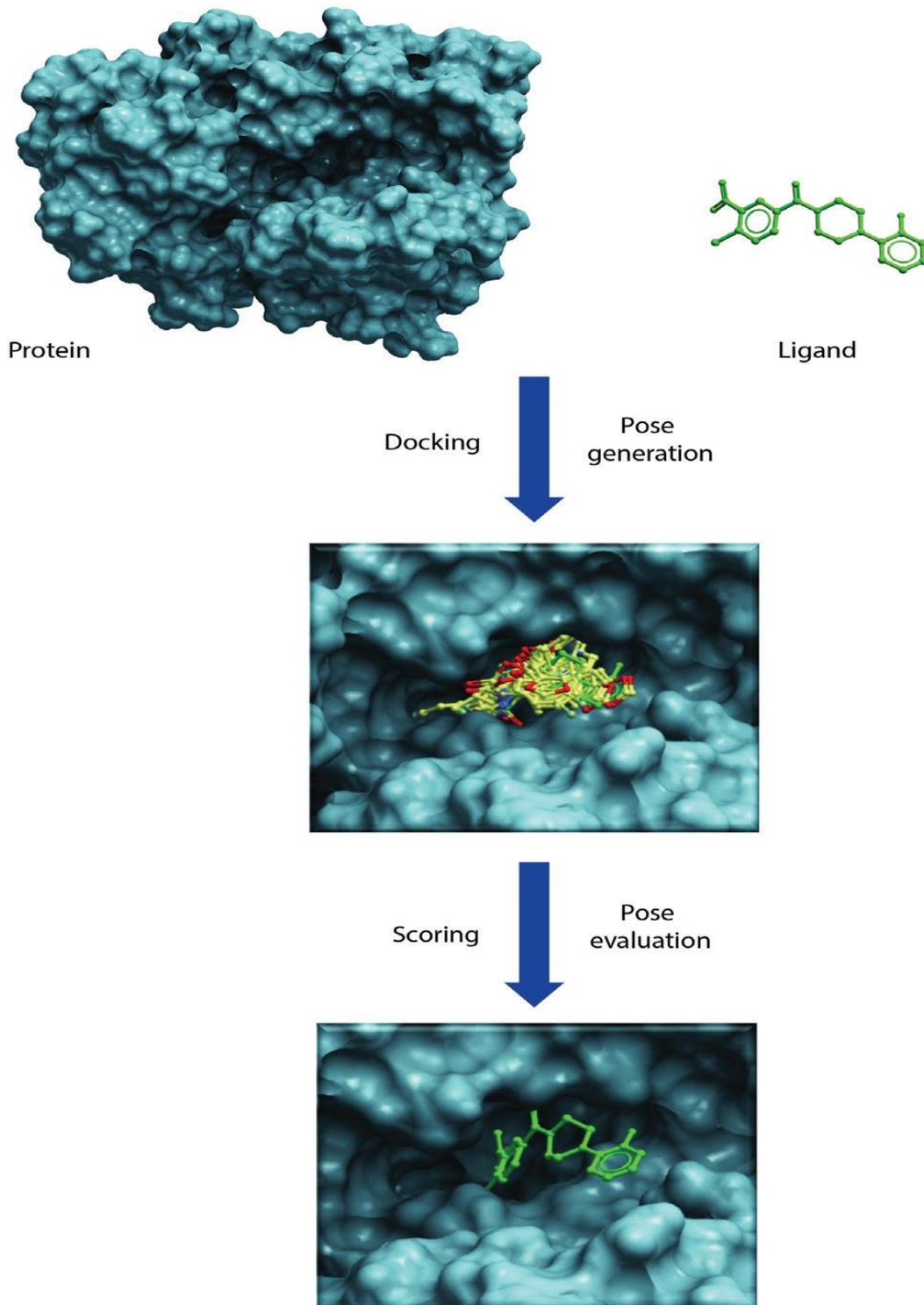


Figure III.3. Docking et scoring sous forme de processus en deux étapes [32].

III.2.6. Composantes de docking

D'après les informations acquises, on peut résumer le docking sous la forme montré ci-parès :

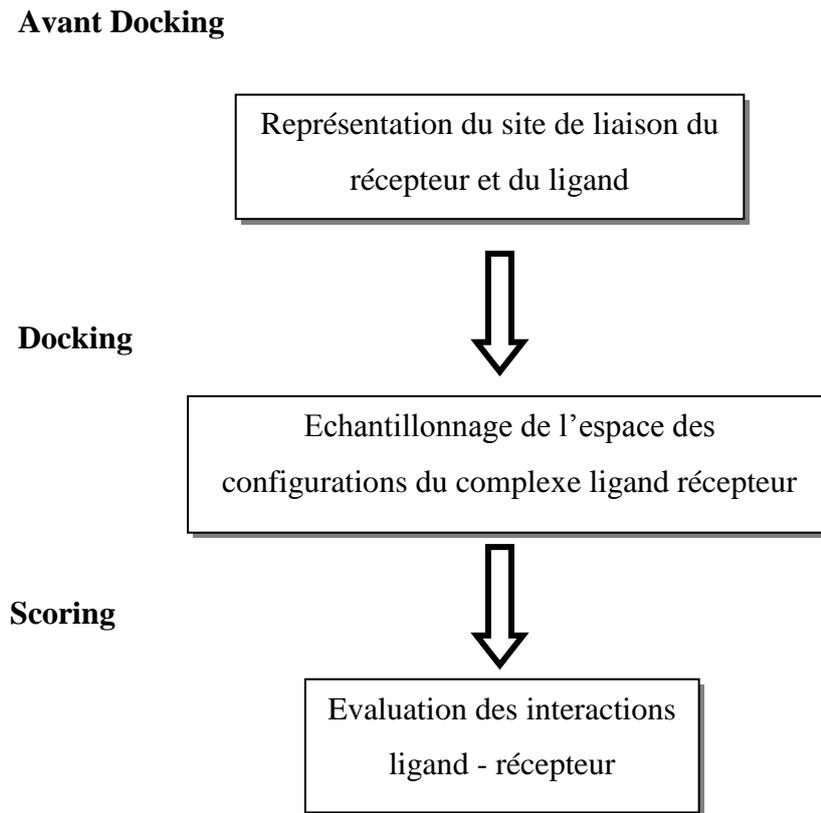


Figure III.4. Composantes de Docking.

Le processus de docking commence par la préparation de la base des données des protéines et des ligands vers l'obtention des résultats et leurs interprétations (Figure III.5). Ces interprétations nécessitent de larges connaissances dans les domaines de chimie, biologie, pharmacie...

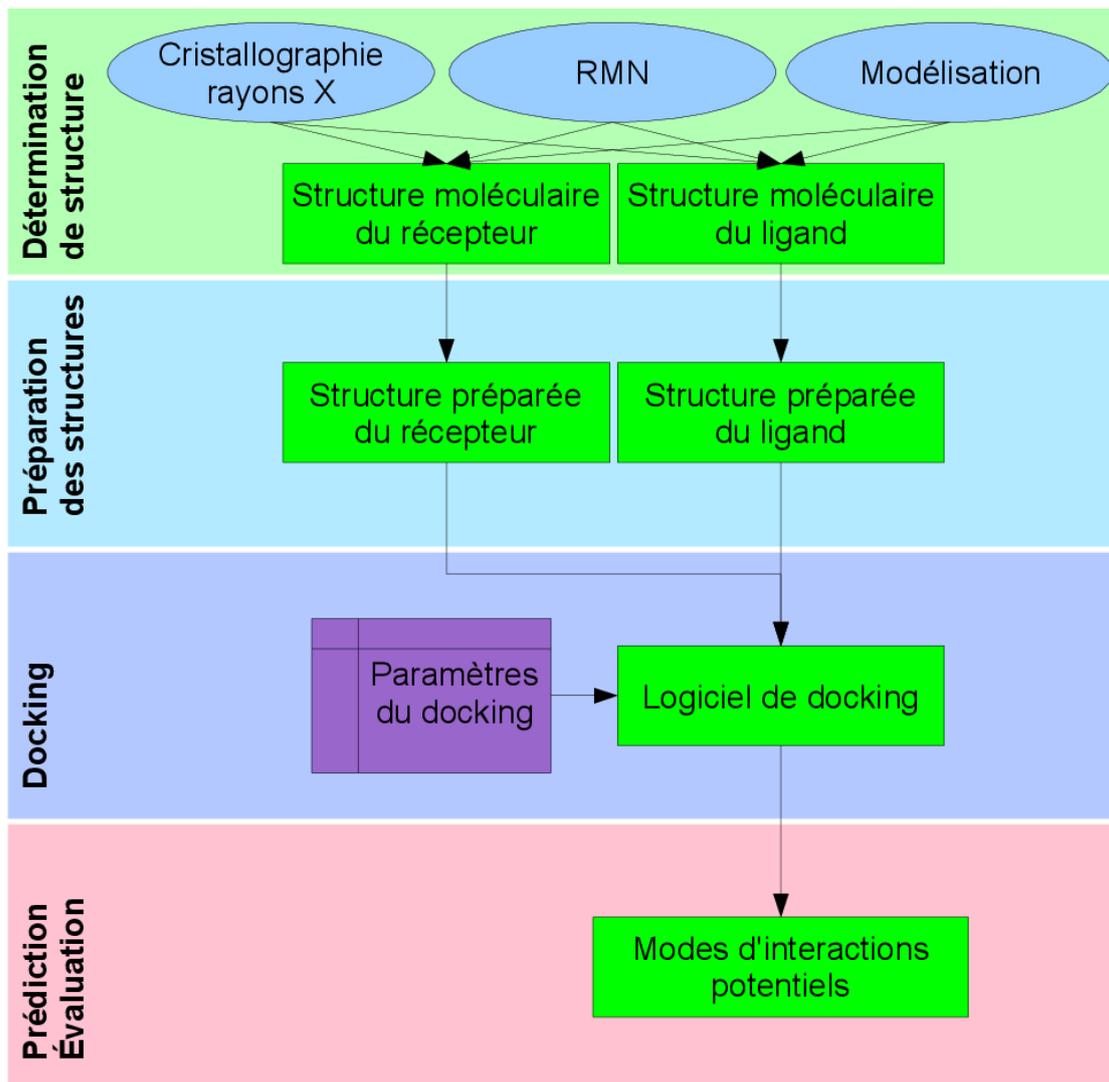


Figure III.5. Processus de docking [33].

III.2.7. Identification des interactions possibles au sein du site de liaison

L'assemblage des structures secondaires et la disposition partielle arrangée des chaînes latérale déterminent la conformation native de la protéine et donc le site actif /le site de liaison. Ce site est stabilisé par des interactions moléculaires (faibles), électrostatiques, Van der Waals, liaisons hydrogènes [34].

III.2.7.1. Interactions électrostatique

La force d'une interaction électrostatique est donnée par la loi de Coulomb:

$$F = k (q_1 q_2) / D^2$$

F: force exercée entre les deux charges.

q1 et q2: deux charges.

D: distance entre les deux charges

k : constante électrique, $9 \cdot 10^9 \text{ N m}^2 / \text{C}$

Une interaction électrostatique est plus forte dans le vide (où $D=1$) et plus faible dans l'eau (où $D=80$).

Un substrat chargé négativement peut former un lien électrostatique avec la chaîne latérale des résidus Lys, Arg et His, ainsi qu'avec l'amine terminale d'une chaîne polypeptidique si, dû à leurs constantes d'acidité, ces groupements sont chargés positivement au pH du milieu.

Un substrat chargé positivement peut interagir avec les résidus Asp et Glu, ainsi qu'avec un carboxylate terminal.

III.2.7.2. Interactions Van der Waals

L'interaction de Van der Waals est due à une force attractive non-spécifique entre deux atomes qui sont séparés par 3 à 4 Å.

L'énergie de liaison pour une paire d'atomes est de l'ordre de 1 kcal/mol (interaction faible).

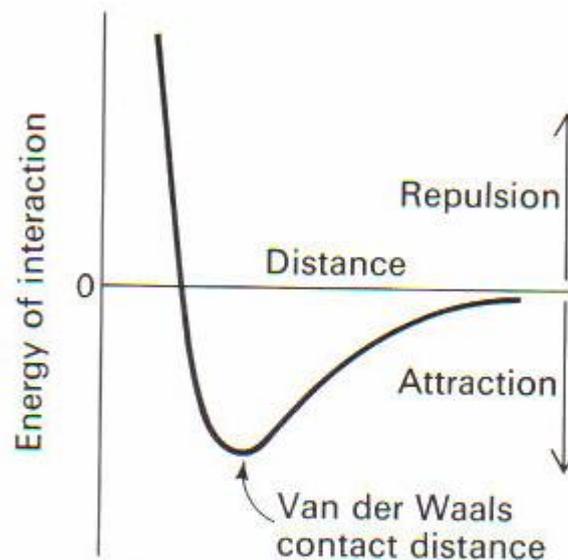


Figure III.6. Énergie de l'interaction de Van der Waals en fonction de la distance entre deux atomes [35].

Une interaction efficace de type Van der Waals entre un substrat et une enzyme peut seulement avoir lieu si leurs formes sont complémentaires du point de vue stérique.

III.2.7.3. Ponts hydrogènes

Les ponts hydrogène dans des systèmes biologiques sont entre des hydrogènes liés à des oxygènes ou azotes et des atomes d'oxygène ou d'azote.

- distances des ponts hydrogène: 2.63 à 3.10 Å, Energies de liaison: 3 à 7 kcal/mol
- Les acides aminés peuvent former une variété de ponts hydrogène; 11 des 20 acides aminés peuvent former des ponts hydrogène à travers leurs chaînes latérales (donneurs ou accepteurs d'hydrogène).
- Une caractéristique importante d'un pont hydrogène est son sens directionnel.
- La spécificité des interactions enzyme substrat résulte des ponts hydrogène qui sont hautement directionnels et de la forme du site actif qui exclut les molécules n'ayant pas une forme complémentaire [35].

III.3.Médicaments étudiés

III.3.1.Méthotrexate

Le méthotrexate (**MTX**) (acide 4-amino-10-méthylfolique), médicament anticancéreux introduit en 1948 aux Etats-Unis. C'est un produit très puissant utilisé à l'origine pour traiter les formes de psoriasis graves et disséminées qui ne répondent pas aux autres formes de traitement. Très efficace contre le cancer de l'adulte et de l'enfant, le produit agit en interférant avec l'utilisation normale de l'acide folique au cours de la reproduction cellulaire, ralentissant ainsi la croissance anormalement rapide des tissus, caractéristique du cancer et du psoriasis [36].

III.3.1.1.Identification

➤ **Formule:** C₂₀H₂₂N₈O₅

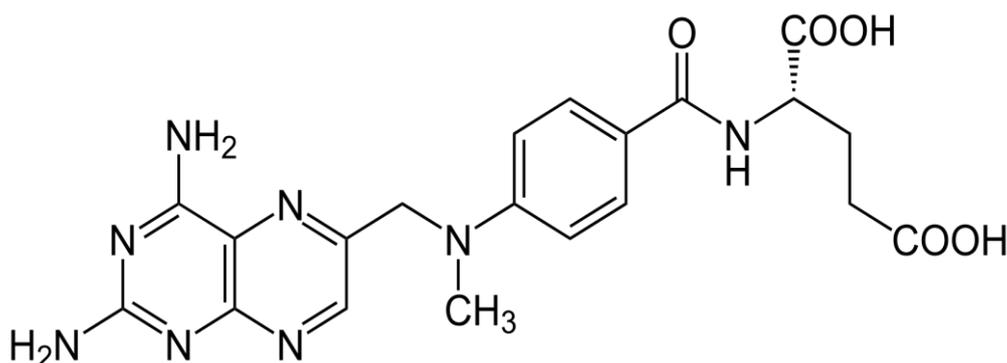


Figure III.7. Structure de méthotrexate [37].

- **Masse Molaire:** 454.44 g/mol
- **Apparence :** solide

- **T°fusion** : 195 °C [37].

III.3.1.2.Cas d'usage

Le méthotrexate est utilisé dans la prise en charge de :

- cancers bronchopulmonaires à petites cellules,
- cancers de l'ovaire,
- cancers de la vessie,
- cancers du sein,
- cancers otorhinolaryngologiques,
- choriocarcinomes placentaires,
- leucémies aiguës lymphoblastiques,
- lymphomes malins non hodgkiniens,
- maladies de Crohn,
- polyarthrites chroniques juvéniles,
- polyarthrites rhumatoïdes,
- psoriasis étendus et sévères,
- rhumatismes psoriasiques,
- sarcomes des os [38].

III.3.2.Hydroxyurée

L'hydroxyurée appartient au groupe de médicaments conçus pour lutter contre le cancer qui sont connus sous le nom d'antineoplasiques et plus particulièrement au groupe d'antineoplasiques appelés antimétabolites. L'hydroxyurée aide à lutter contre le cancer en empêchant la croissance des cellules cancéreuses, ce qui mène à leur destruction. Elle s'utilise habituellement dans le traitement de certains types de cancers siégeant sur la peau qui recouvre la tête et le cou (à l'exclusion des lèvres) et appelés carcinomes des cellules squameuses. Dans le traitement de ces types de cancers, l'utilisation de l'hydroxyurée est généralement accompagnée de radiothérapie, car ces deux traitements simultanés contribuent à détruire plus efficacement les cellules cancéreuses.

Elle s'utilise aussi pour traiter les cancers de la peau appelés mélanomes et certains types de cancers du sang dénommé leucémie myélocitaire chronique [39].

- **Formule:** CH₄N₂O,

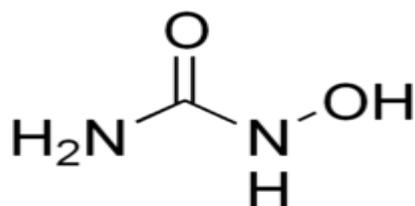


Figure III.8. Structure de l'hydroxyurée [40].

- **Masse Molaire:** 76,0547 g/mol,
- **Apparence :** solide,
- **T°fusion :** 141 °C [40].

III.4.Enzymes utilisées

III.4.1.Tyrosine kinase

Les kinases sont les enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe phosphate de l'ATP à un substrat. Lorsque le substrat est un ou plusieurs résidus tyrosine d'une protéine, les enzymes sont appelées protéine tyrosine kinases ou plus simplement tyrosine kinases.

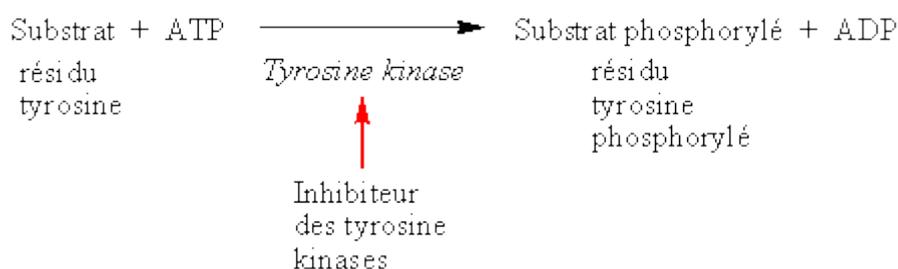


Figure III.9.Fonction de tyrosine kinase [41].

L'activité tyrosine kinase est localisée soit au niveau de la partie intracellulaire du récepteur qui s'auto phosphoryle lors de l'activation par le ligand (récepteurs à tyrosine kinase intrinsèque) soit à l'intérieur du cytoplasme (récepteurs à tyrosine kinase associée).

Les protéines kinase sont nombreuses et présentent des différences structurales si bien qu'il est possible d'inhiber spécifiquement celles qui sont liées à tel ou tel facteur de croissance, par exemple.

Les tyrosines kinases jouent un rôle essentiel dans la transduction intracellulaire des signaux, ou cascade de signalisation, conduisant notamment à la multiplication et à la différenciation cellulaire.

III.4.1.1.Mécanisme d'action

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des protéines transmembranaires impliquées dans la transduction intracytoplasmique du signal émanant du niveau extracellulaire. Au sein du milieu intracellulaire, d'autres protéines TK jouent également un rôle majeur dans la transduction du signal. L'activation de ces protéines ou récepteurs permet d'induire la prolifération, la croissance cellulaire tumorale, de réprimer l'apoptose, ainsi que de promouvoir l'angiogenèse et la diffusion métastatique.

L'auto-activation des TK liées à l'acquisition d'anomalies génétiques au cours de l'oncogenèse est un phénomène fréquemment observé. Ces éléments justifient le fait que le développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase fasse l'objet d'efforts intenses en pharmacologie anticancéreuse. Les inhibiteurs de TK se fixent de manière compétitive sur les sites de liaisons de l'ATP, ce qui permet donc le blocage de l'activation des sites TK. La signalisation cellulaire, impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, est alors interrompue. Les cellules cancéreuses sont alors impactées négativement et sont éliminées. Ce blocage peut de même conduire au blocage de l'angiogenèse qui est essentiel à la croissance et propagation des tumeurs [41].

III.4.1.2.Exemples d'inhibiteurs TK

Les inhibiteurs des tyrosines kinases ont, pour la plupart, une dénomination commune internationale se terminant par le suffixe -tinib. Ce sont :

- Imatinib, Glivec*,
- Gefitinib, Iressa* (ATU en France), indication cancer du poumon non à petites cellules, inhibiteur des tyrosines kinases liées au facteur de croissance épidermique ou EGF
- Erlotinib, Tarceva*
- Sunitinib, Sutent*
- Lapatinib, Tykerb*
- Dasatinib, Sprycel*, indication leucémie myéloïde chronique
- Nilotinib, Tassigna*[42].

III.4.2.Peroxiredoxine 5

Les peroxiredoxines définissent une famille émergente de peroxydases capables de réduire le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes d'alkyle en utilisant des

équivalents réducteurs dérivés de molécules donneuses contenant un thiol telles que la thiorédoxine, le glutathion et le trypanothione. Des peroxiredoxines ont été identifiées chez les procaryotes ainsi que chez les eucaryotes. La peroxirédoxine 5 (PRDX5) est un nouveau type de thiorédoxine peroxydase de mammifère largement exprimée dans les tissus et localisée au niveau de la mitochondrie, des peroxisomes et du cytosol. Sur le plan fonctionnel, PRDX5 a été impliqué dans les mécanismes de protection des antioxydants ainsi que dans la transduction du signal dans les cellules [43].

III.4.2.1.Mécanisme d'action

Les protéines de type PRX5 appartiennent à la famille des peroxirédoxines (PRX). PRX5 est une thiorédoxine homodimère (TRX) -peroxydase largement exprimée dans les tissus et présente de manière cellulaire dans les mitochondries, les peroxisomes et le cytosol. La localisation cellulaire de PRX5 suggère qu'il pourrait jouer un rôle antioxydant important dans les organites qui sont des sources importantes d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi que dans le contrôle de la transduction du signal. (PRDX5) participant directement à l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et à la neutralisation d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) [44].

III.5.Conclusion

Le processus de docking est un sujet essentiel pour progresser dans la compréhension des mécanismes d'interactions moléculaires et pour le développement d'outils prédictifs dans le domaine de médecine. C'est un outil virtuel puissant pour la prédiction des interactions médicament-récepteur.



Chapitre IV. Résultats et Discussions

Chapitre IV. Résultats et Discussions

IV.1.Introduction

Dans ce chapitre, on porte à l'étude de docking moléculaire entre deux enzymes (Tyrosine Kinase / Peroxiredoxine 5) et deux médicaments anticancéreux appartenant à la famille des antimétabolites (Méthotrexate / Hydroxyurée).

On prend en considération pour cette étude les valeurs d'énergies et de longueurs de liaisons de chaque interaction de type Hydrogène pour chaque liaison (enzyme (**protein**)- médicament (**ligand**)).

Afin de mieux définir le pouvoir antioxydant de ces deux médicaments, une comparaison est réalisée avec le Resvératrol et la vitamine C considérés comme des antioxydants puissants de référence.

L'étude est faite par les logiciels Portable Hyperchem et Molegro Virtuel Docking 6.

IV.2. Structure des deux enzymes

Le choix des deux enzymes a été fait d'après le travail de Singh et al. (2015) [45].

IV.2.1.Tyrosine Kinase

La structure secondaire d'une protéine est créée par la rotation des atomes de la chaîne peptidique les uns par rapport aux autres.

La structure secondaire la plus fréquente est l'hélice α qui fait tourner la chaîne carbonée par rapport à elle-même d'un tour tous les 4 acides aminés environ. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogènes [46].

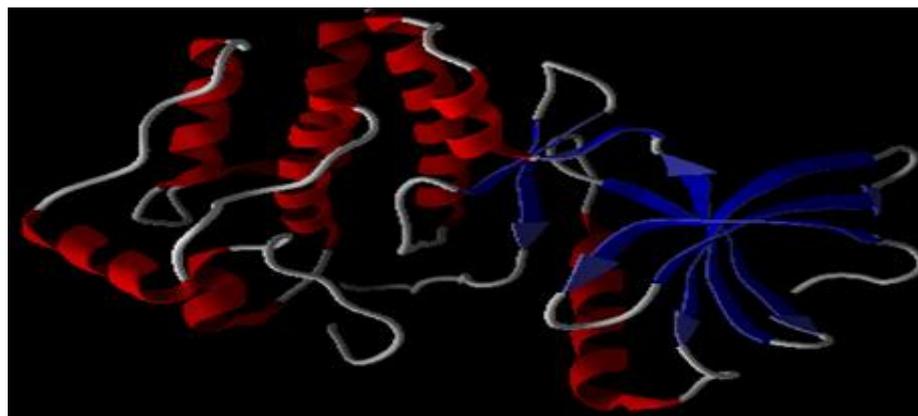


Figure IV.1. Structure secondaire de la tyrosine kinase.

On détecte trois cavités dans la structure de tyrosine kinase où chacune est caractérisée par un volume. La cavité la plus grande est choisie pour mener cette étude parce qu'elle offre plusieurs positions de l'emplacement de médicament.

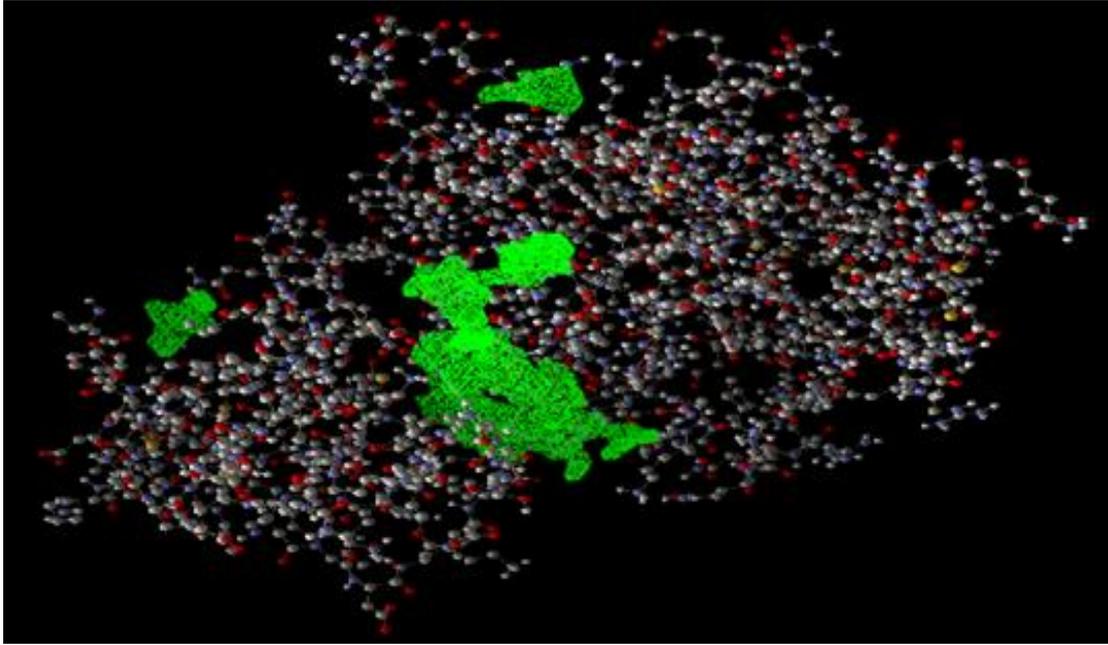


Figure IV.2. Détection des cavités dans la protéine tyrosine kinase.

IV.2.2. Peroxiredoxine 5

La figure IV.3 représente la structure en hélice α de l'enzyme peroxyredoxine 5, où se construisent des liaisons H entre les groupements (C=O) et (N-H) [47].

Les interactions H s'effectuent entre les acides aminés numérotés (i) et (i+4) afin de stabiliser la forme secondaire des protéines.

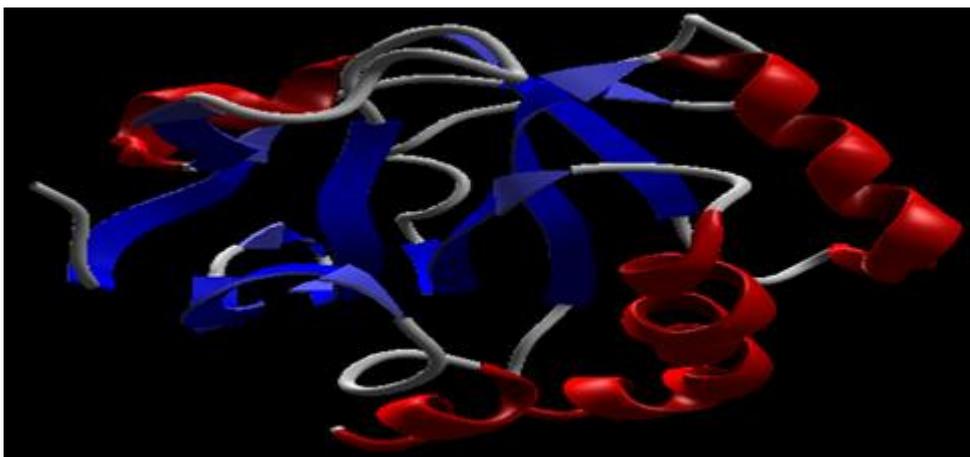


Figure IV.3. Structure secondaire de la peroxyredoxine 5.

La détection des cavités a révélé une seule cavité pour la protéine de peroxyredoxine 5 (Figure IV.4).

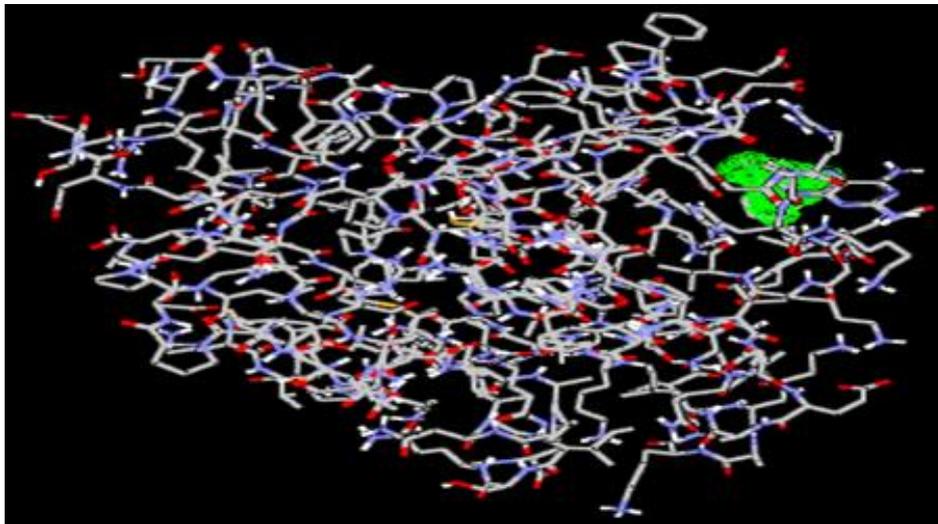


Figure IV.4. Détection des cavités dans la protéine peroxyredoxine 5.

IV.3. Interaction -Méthotrexate/ Enzyme-

IV.3.1. Propriétés moléculaire de méthotrexate

La molécule de méthotrexate est de masse de 454 g/mol, son volume est 1222.9 A³. Cette masse vérifie la règle de Lipinski [48] pour les médicaments pris par voie orale; elle permet la mobilité et la diffusion convenables de la molécule.

Le nombre de liaisons rotatives est égal à 9 [49]. Ces liaisons sont définies comme des liaisons simples, hors un anneau, liées à un atome lourd non terminal (c'est-à-dire non-hydrogène). Ils mesurent la flexibilité moléculaire [50].

IV.3.2. Interaction de Méthotrexate avec la tyrosine kinase

La figure IV.5 indique les positions des interactions H sur le MTX. Les atomes contribuant à ces liaisons sont N et O.

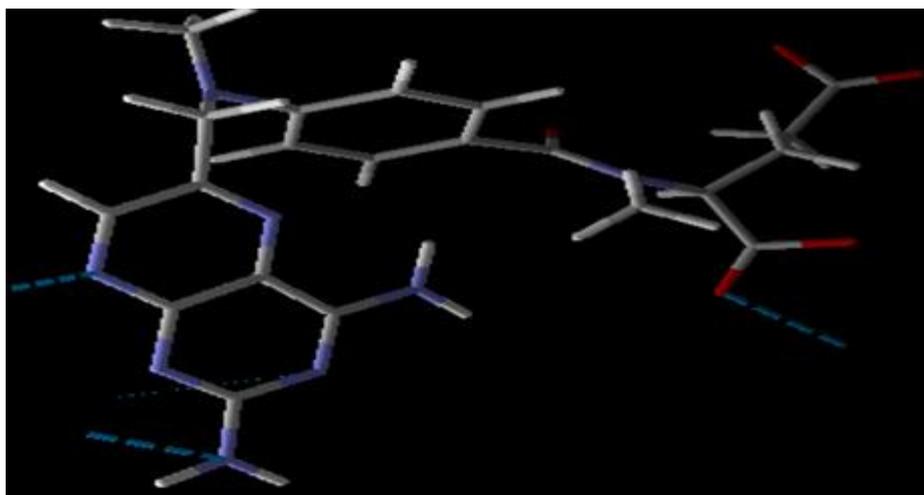


Figure IV.5. Interaction -Tyrosine kinase/ Méthotrexate-

Pour mieux définir ces interactions, on fait appel à **ligand map** qui permet de déterminer les acides aminés intervenant. On remarque la participation de Lysine (Lys), Glucine (Glu) et Alanine (Ala).

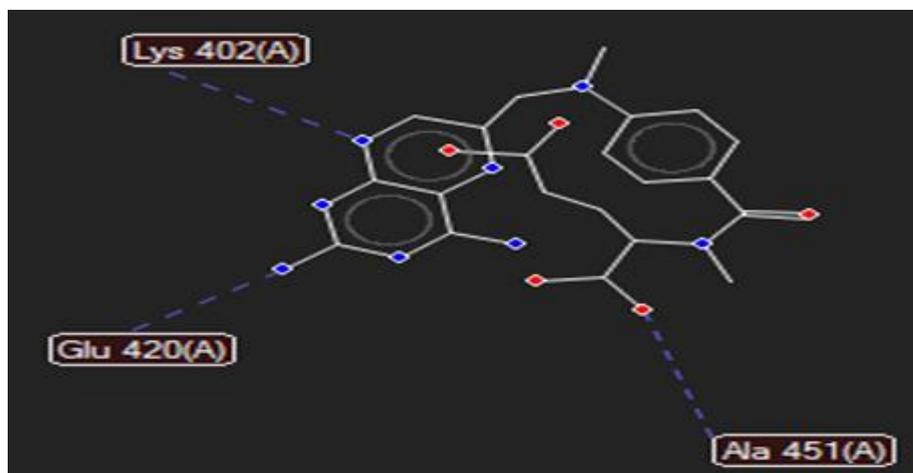


Figure IV.6. Acides aminés contribuant aux interactions (Tyrosine kinase/ Méthotrexate).

Le tableau IV.1 récapitule les valeurs des énergies et des longueurs des liaisons H qui sont des liaisons non covalentes. Elles satisfont les valeurs standards de cette liaison:

-Longueur ≈ 0.3 nm.

-|Energie| ≈ 1.4 kcal/mol.

Tableau IV.1. Interaction -Tyrosine kinase/ Méthotrexate-

IV.3.3. Interaction –Méthotrexate/ Peroxiredoxine 5-

Résidu	Interaction	Distance (Å)	Energie (kcal/mol)
Lys 402	N-H	2.934	-2.5
Glu 420	N-H	3.13134	-2.34329
Ala 451	O-H	2.8703	-2.5

Le MTX peut former plus d'interactions avec la peroxyredoxine 5 par rapport à la tyrosine kinase. Il fait cinq liaisons avec : Arg 86, Ala 90, Gly 92, Lys 93 et deux liaisons N-H avec Glu 91. Les figures IV.7 et IV.8 représentent respectivement la configuration de méthotrexate en 3D ainsi que les sites des ponts d'hydrogène et les acides aminés formant cette liaison.

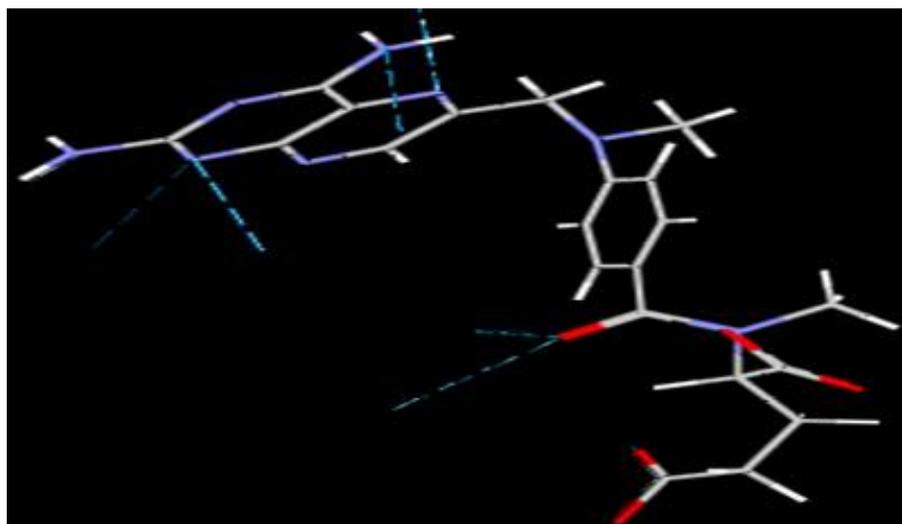


Figure IV.7. Interaction de la peroxyredoxine 5 avec le méthotrexate.

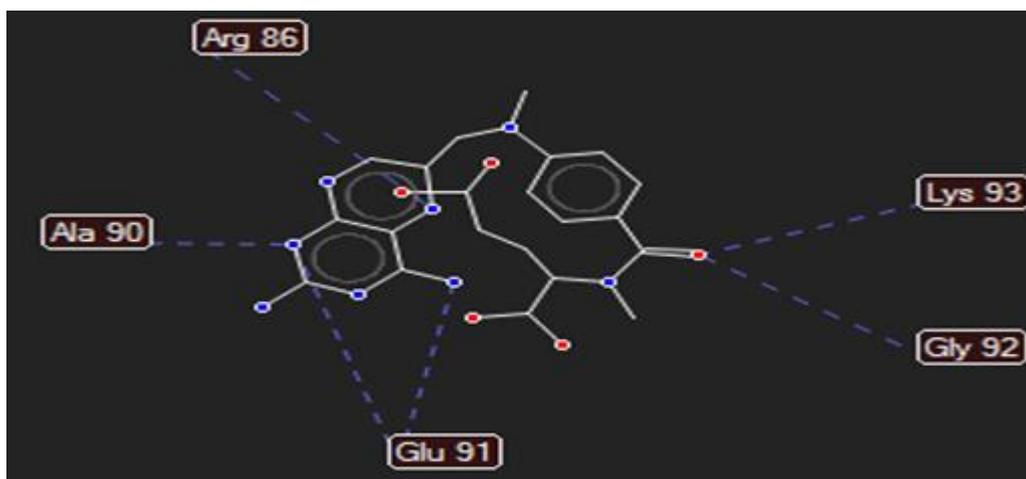


Figure IV.8. Acides aminés intervenant dans les interactions entre la peroxyredoxine 5 et le méthotrexate.

Après la simulation d'interaction entre peroxyredoxine 5 avec le méthotrexate, le choix de meilleur score donne les résultats montrés sur le tableau IV.2.

Le MTX fait six liaisons avec la peroxyredoxine 5, alors qu'il forme seulement trois ponts H avec la tyrosine kinase. On remarque la contribution des mêmes acides aminés pour les deux cas (Ala, Glu, Lys). Cela peut être dû à une plus grande affinité envers ces aminoacides.

Les valeurs d'énergie sont relativement faibles ; elles ne dépassent pas -2 kcal/mol.

Tableau IV.2. Energies des interactions de la peroxyredoxine 5 avec le méthotrexate.

Résidu	Interaction	Distance (Å)	Energie (kcal/mol)
Arg 86	N-H	3.23189	-1.4831
Ala 90	N-H	3.0549	-0.655053
Glu 91	N-H	3.39694	-1.0153
	N-H	2.82644	-1.99558
Gly 92	O-H	3.27569	-0.666165
Lys 93	O-H	2.52017	-1.09064

IV.4. Interaction -Hydroxyurée/ Enzyme-

IV.4.1. Propriétés moléculaires de l'hydroxyurée

L'hydroxyurée est une petite molécule d'une masse de 76.05 g/mol, son volume est encore relativement faible et est égal à 267.63 Å³. Ces paramètres leur offre la facilité de diffusion dans l'organisme.

Sa structure plane peut aider à la formation des interactions Hydrogène avec les aminoacides qui engendrent la cavité.

IV.4.2. Interaction -Hydroxyurée/Tyrosine kinase-

Les liaisons H que forme l'hydroxyurée avec la tyrosine kinase sont indiquées sur les figures IV.9 et IV.10.

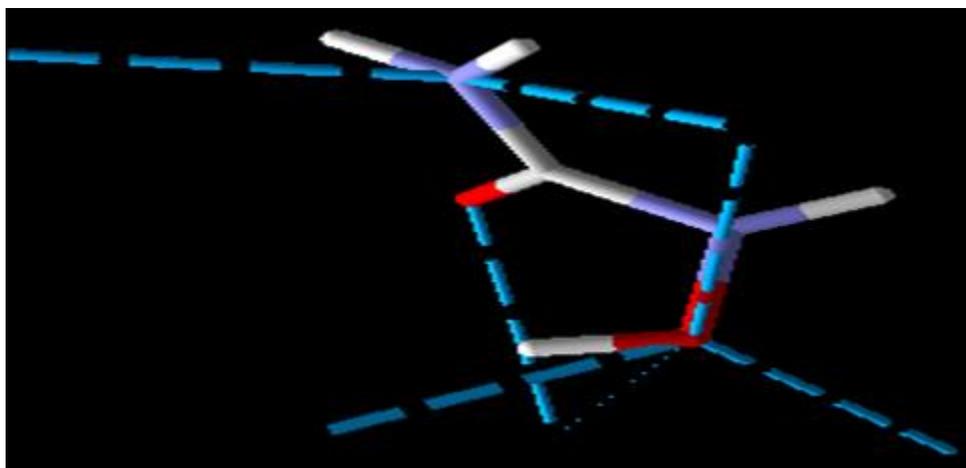


Figure IV.9. Interaction -Tyrosine kinase/Hydroxyurée-

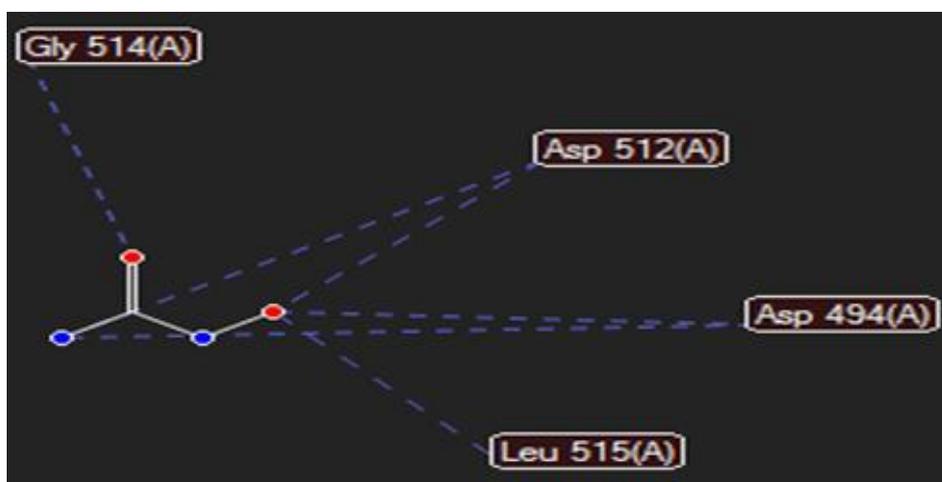


Figure IV.10. Acides aminés intervenant dans l'interaction -Tyrosine kinase / Hydroxyurée-

Quatre acides aminés sont détectés pour l'interaction de la tyrosine kinase avec l'hydroxyurée : Gly 514, Asp 512, Asp 494 et Leu 515. Leurs valeurs d'énergie et de longueur des liaisons H sont récapitulées dans le tableau IV.4.

Tableau IV.3. Interaction -Tyrosine kinase / Hydroxyurée-

Résidu	Interaction	Distance (Å°)	Energie (kcal/mol)
Gly 514	O-H	3.10127	-1.79748
Asp 512	N-H	2.96933	-2.5
	O-H	2.59992	-2.4993
Asp 494	N-H	3.09669	-2.5
	O-H	3.27359	-1.63203
Leu 515	O-H	3.04049	-1.89937

IV.4.3. Interaction de l'hydroxyurée avec la peroxyredoxine 5

Après avoir effectué le docking, les résultats de scoring révèlent des interactions H de peroxyredoxine 5 avec l'hydroxyurée au niveau de quatre sites grâce aux atomes d'azote et d'oxygène. Les liaisons sont faites les acides aminés Val 94, Gly 92, Ala 90, et Lys 93 (Figures IV. 11 et IV. 12).

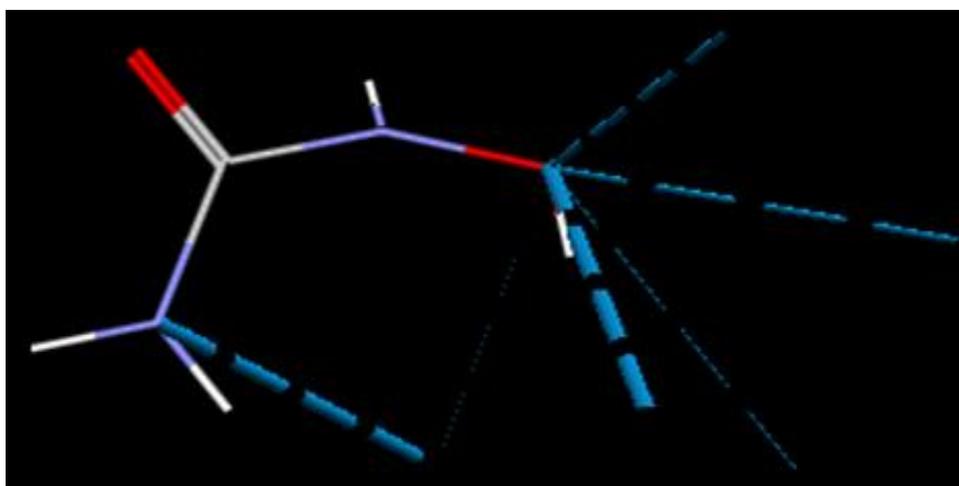


Figure IV.11. Interaction -peroxyredoxine 5/ Hydroxyurée-

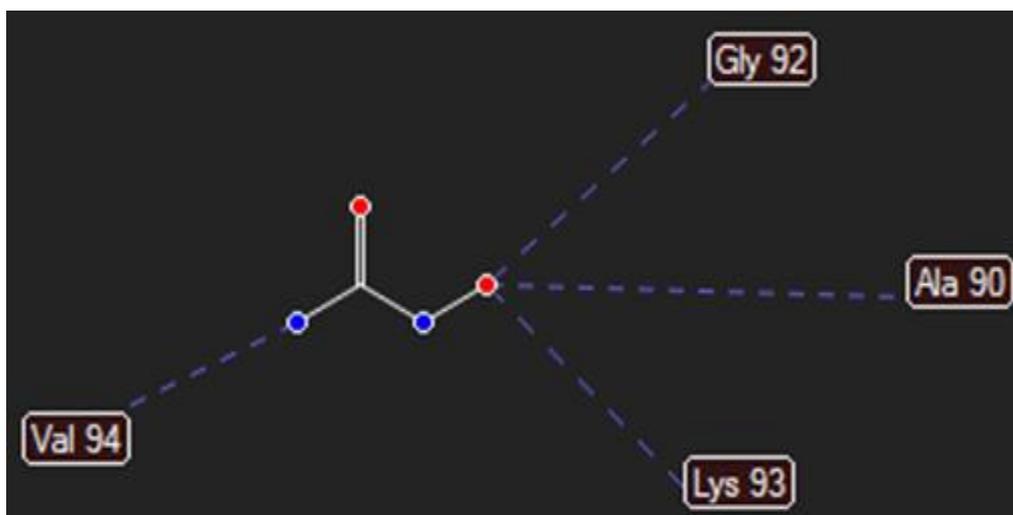


Figure IV.12. Acides aminés participant à l'interaction –péroxiredoxine 5 / Hydroxyurée-

Le tableau IV.4 illustre les valeurs des énergies et des longueurs des liaisons formées entre l'hydroxyurée et la protéine.

Les valeurs des longueurs de liaisons H sont comprises entre 2.6 et 3.2 Å. Une simple comparaison avec les longueurs des liaisons covalentes de ligand comprises entre 1.02 et 1.4 Å, permet de montrer que les liaisons H sont clairement plus longues et donc, moins énergétiques.

Tableau IV.4. Estimation des valeurs des énergies et de longueurs de liaisons H pour le complexe -péroxiredoxine 5/ hydroxyurée-

Résidu	Interaction	Distance (Å°)	Energie (kcal/mol)
Val 94	N-H	2.75	-2.41
Gly 92	O-H	2.60	-1.23
Ala 90	O-H	3.18	-1.18
Lys 93	O-H	2.74	-2.5

IV.4.Interaction - (antioxydant de référence)/ Enzymes (Tyrosine kinase et peroxyredoxine 5)-

IV.4.1.Interaction -Resvératrol (antioxydant de référence 1)/ Enzymes (Tyrosine kinase et peroxyredoxine 5)-

Afin de bien estimer le pouvoir antioxydant des deux médicaments anticancéreux (méthotrexate et hydroxyurée), une étude comparative est menée in silico avec le resvératrol connu par son pouvoir antioxydant fort grâce à la présence de trois groupements hydroxyle.

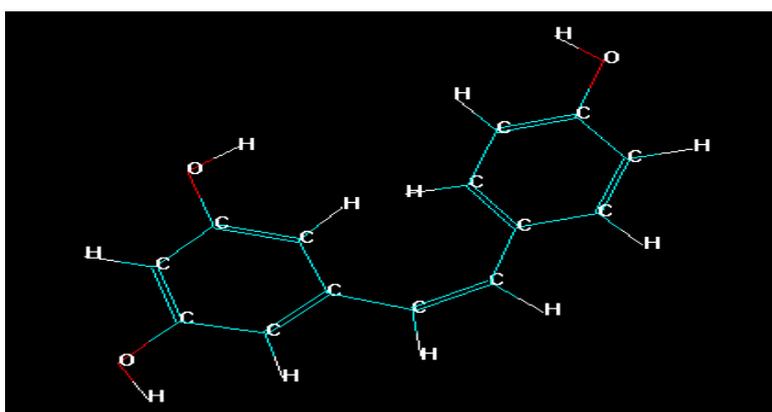


Figure IV. 13. Structure chimique du resvératrol.

Le docking permet de quantifier les interactions de resvératrol avec les deux enzymes, comme le montre le tableau IV.5.

Tableau IV.5. Propriétés des interactions H des complexes (Resvératrol / Enzyme).

Interaction de Resvératrol avec Tyrosine kinase				Interaction de Resvératrol avec Peroxyredoxine 5			
Résidu	Interaction	Distance (Å)	Energie (kcal/mol)	Résidu	Interaction	Distance (Å)	Energie (kcal/mol)
Asp 512	O-H	3.15	-2.22	Glu 91	O-H	3.01	-2.5
	O-H	3.18	-1.33	Ala 90	O-H	2.57	-0.81
Asp 494	O-H	2.71	-2.5	Glu 16	O-H	3.09	-2.5
Lys 402	O-H	2.99	-2.5	Lys 93	O-H	2.69	-2.5
Leu 515	O-H	3.26	-1.68	Val 94	O-H	2.85	-2.5
Leu 413	O-H	3.40	-0.96	Gly 92	O-H	3.15	-1.30

En général, les énergies appartiennent aux intervalles connus des liaisons H (Tableau IV.6). Elles sont équivalentes à celles obtenues pour les deux anticancéreux, ce qui permet de proposer que ces médicaments utilisés comme antimétabolites pour bloquer le développement des cellules cancéreuses peuvent avoir encore une activité antioxydantes.

Tableau IV.6. Intervalles des valeurs d'énergie et de longueurs des liaisons H des complexes (Resvératrol/ Enzyme).

	Interaction	Distance (Å)	Energie (kcal/mol)
Resvératrol/ Tyrosine kinase	O-H	[2.71 ; 3.40]	[-2.22 ; -0.96]
Resvératrol/ péroxiredoxine 5	O-H	[2.57 ; 3.15]	[-2.5 ; -0.81]

Pour le méthotrexate, une étude expérimentale réalisée par Ramprasad et Prabhu en 2017 [51] a prouvé ce pouvoir. Donc, on peut estimer une concordance des résultats obtenus in vitro et in silico.

IV.4.2. Interaction – Vitamine C (antioxydant de référence 2)/ Enzymes (Tyrosine kinase et péroxiredoxine 5)-

De la même manière, une étude comparative est faite encore avec la vitamine C (Figure IV.14), pour évaluer les activités antioxydantes des deux antimétabolites par une simulation in silico.

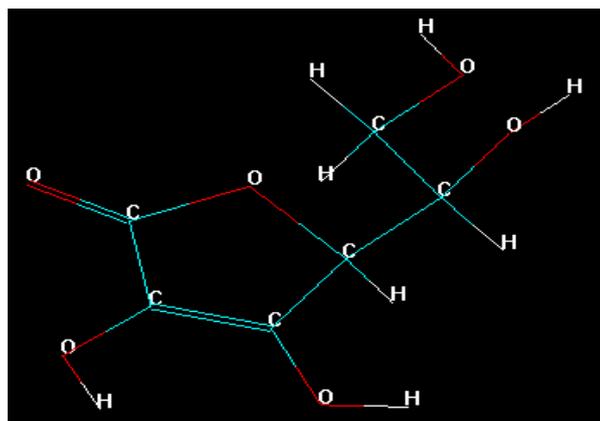


Figure IV.14. Structure chimique de vitamine C.

Chapitre IV. Résultats et Discussions

La vitamine C ou encore nommée l'acide ascorbique peut faire des liaisons H de types OH avec les récepteurs étudiés grâce à la présence de six atomes d'oxygène. Les liaisons sont formées avec les acides aminés communs : Leu, Lys et Glu...

L'ordre de grandeurs des énergies et des longueurs de liaisons (Tableaux IV.7 et IV.8) est similaire aux ligands étudiés ci-dessus, ce qui nous amène à dire que les médicaments anticancéreux peuvent être encore des antioxydants vu leurs interactions avec la tyrosine kinase et la peroxydase 5. Afin de confirmer cette hypothèse, il est demandé d'évaluer des tests expérimentaux tels que le test de DPPH pour quantifier ce pouvoir. Cette confirmation en plus d'autres études permettent d'expliquer mieux la relation entre le stress oxydatif et les différentes maladies surtout le cancer.

Tableau IV.7. Interaction de la vitamine C avec les deux enzymes.

Interaction de la vitamine C avec la tyrosine kinase				Interaction de la vitamine C avec la peroxydase 5			
Résidu	Interaction	Distance (Å)	Energie (kcal/mol)	Résidu	Interaction	Distance (Å)	Energie (kcal/mol)
Lys 402	O-H	3.10	-2.49	Val 94	O-H	3.10	-2.48
Glu 416	O-H	2.91	-2.5	Glu 16	O-H	2.73	-2.5
Glu 420	O-H	2.78	-2.5	Arg 86	O-H	2.86	-1.42
Leu 413	O-H	2.60	-2.5	Leu 96	O-H	2.6	-2.49
					O-H	3.1	-2.5

Tableau IV.8. Ordre de grandeurs des énergies et de longueurs de liaisons H des complexes (Vitamine C/ Enzymes).

	Interaction	Distance (Å)	Energie (kcal/mol)
Vitamine C avec la tyrosine kinase	O-H	[2.60 ; 3.10]	[-2.5 ; -2.49]
Vitamine C avec la peroxydase 5	O-H	[2.59 ; 3.10]	[-2.5 ; -1.42]

IV.5.Conclusion

Cette étude est une phase d'apprentissage de docking en utilisant Molegro software ; les résultats obtenus in silico doivent être confirmés par des études expérimentales afin de quantifier précisément le pouvoir antioxydant des médicaments antimétabolites.

On entend souvent de couplages (antioxydant/anticancéreux), (antioxydant/anti-age), (antioxydant/antiparkinsonien)... Cette étude n'est qu'une initiation pour la maîtrise de ces relations, elle demande un appui expérimental et théorique pour l'améliorer.



Conclusion Générale

Conclusion Générale

Ce mémoire avait pour objectif de simuler l'activité antioxydante de deux anticancéreux (**méthotrexate et hydroxyurée**) de la famille des antimétabolites.

Il a fallu dans un premier temps définir la notion de stress oxydatif, antioxydants, médicament anticancéreux et docking moléculaire.

Par le logiciel de docking moléculaire, nous avons pu étudier séparément les interactions des deux médicaments avec les deux enzymes (**Tyrosine Kinase et Peroxiredoxin 5**). Pour chaque interaction, on a suivi les valeurs de longueurs de liaisons ainsi que leurs énergies. On a utilisé le resveratrol et la vitamine C comme antioxydants puissants de référence pour faire la comparaison des activités.

Selon les résultats obtenus (longueurs des interactions H au voisinage de 2 Å, et énergies de liaison situées dans l'intervalle [-2.5 ; -0.65] kcal/mol), nous concluons que les deux médicaments anticancéreux étudiés appartenant à la famille des antimétabolites ont un pouvoir antioxydant, ils peuvent lutter contre le stress oxydatif et réduire les radicaux libres dans le corps humain.

Le docking moléculaire est une simulation très précieuse pour évaluer les activités biologiques, néanmoins, il faut confirmer ces résultats par des tests expérimentaux.

Ce travail est une initiation au docking moléculaire, ce n'est qu'une étape d'apprentissage de cette technique primordiale dans la conception et l'évaluation des activités des molécules chimiques. Donc, pour répondre à la question « quelles est la relation entre le pouvoir antioxydant et anticancéreux ? », il faut des recherches théoriques et expérimentales profondes.



Bibliographie

Bibliographie

1. G. Charrade, **Le stress oxydatif: un assassin silencieux**, France, (2016).
2. D. Mercan, **Les antioxydants, A.R.L**, Lausanne, Unilabs, (2010).
3. Lettre d'un laboratoire, **Fruits et légumes, des aliments riches en antioxydants**. Laboratoire Nutergia, (2018).
<https://lymecombat.wordpress.com/2018/12/09/fruits-et-legumes-des-aliments-riches-en-antioxydants/>
4. R. Claudine, **Alimentation santé Alimentation plaisir une question d'équilibre: Alimentation plaisir une question d'équilibre**, Fernand Lanore, France, (2014).
5. J. Guy, **Antioxydants et vieillissement**, John Libbey Eurotext, France, (1994).
6. M. Millet, **Les antioxydants: élixir de jeunesse ?**, Vuibert, 2009.
7. Teachnuclear,canadian nuclear association,**effects of ionizing radiation on DNA**,2019 .
8. Recettes saines, **Cœur sain : Antioxydants, Antiinflammatoires riches d'Omega 3**, France, (2011).
9. C. Causse, **Les secrets de santé des antioxydants: plus jeune, plus Long temps avec les Antioxydants**, Edition Alpen s.a.m, France, (2004).
10. M. Boiron, **Euro Cancer 2008**, John Libbey Eurotext, France, (2008).
11. T. Desmier, **Les antioxydants de nos jours : définition et applications**, Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de limoges, (2016).
12. M. Edeas, **Les secrets de santé du thé : C'est naturel, c'est ma santé**, Alpen Editions s.a.m, France, (2005).
13. S. Kirkiacharian, **Guide de chimie médicinale et médicaments**, Lavoisier, France , (2010).

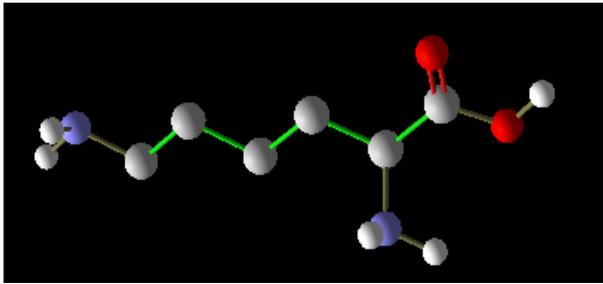
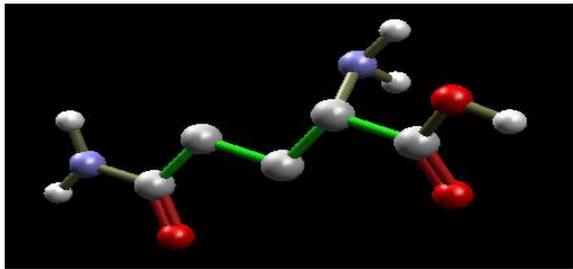
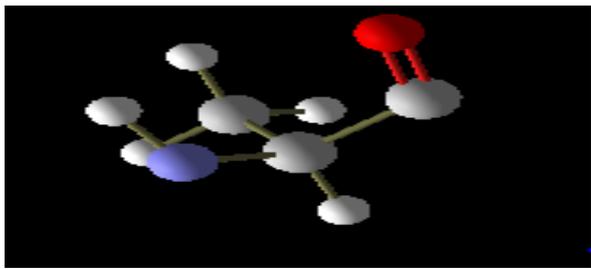
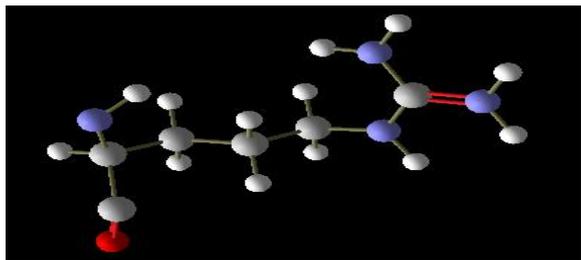
14. D. Cazivassilio, **Anticancéreux**, Lettre de Santé Assistance, Paris, (2008).
15. R. Lacave, C. J. Larsen et J. Rober, **Cancérologie fondamentale L'innovation thérapeutique en cancérologie**, John Libbey Eurotext, France, (2005).
16. D. Charléty, **Pharmacologie des médicaments anticancéreux**, Cours d'Institut de Formation en Soins Infirmiers – 3ème Année Pharmacie-, CHU Grenoble, (2015).
17. R. Desmaris, **Cytotoxiques**, Formation ISFI, Institut Gustave Roussy, France, (2008).
18. L. Monassier, **Les anticancéreux**, Cours de pharmacologie, Université de Strasbourg, (2012).
19. M. Talbert, G. Willoquet et R. Gervais, **Pharmaco Clinique**, Le moniteur des pharmacies, Wolters Kluwer, France, (2017).
20. P. Mallecourt, **Mieux comprendre le cancer du sein: du dépistage à la guérison**, Fernand Lanore, France, (2008).
21. J. Chauvergne et B. Hoerni, **Chimiothérapie anticancéreuse**, Masson, France, (2001).
22. Guide Cancer info, **Accélérons les progrès face aux cancers**, Institut nationale de cancer, France, (2011).
23. N. Albin, **Les mécanismes d'action de la chimiothérapie anticancéreuse**, ANSM, France, (2010).
24. T. Supriya, M. Shankar, S. Kavya, J. Lalitha, M. Dastgiri et N. Babu, **An overview on molecular docking**, American Journal of Biological and Pharmaceutical Research, 3, (2016), 83-89.
25. K. Mezhoud, **Doking : principes et méthodes**, CNSTN, Hex server, (2010).
26. Chapitre 4, **Modélisation moléculaire**, Unspf, (2011).
27. R. Andrew, **Molecular modeling: Principles and application**, Pearson Education Canada, (2001), 582, 6-10.
28. E. H. Mokrani, **Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique**, Thèse de magister, Technologie des explorations biochimiques, Université Mentouri, Constantine, (2012).
29. <https://rock-cafe.info/suggest/enzyme-induced-fit-vs-lock-and-key-56e7a796d65.html>

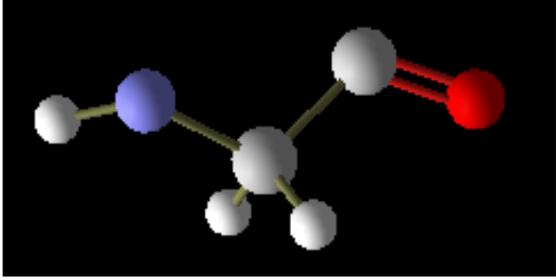
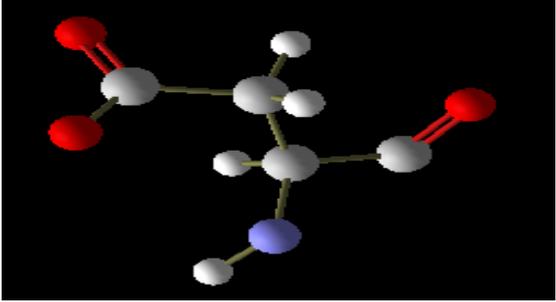
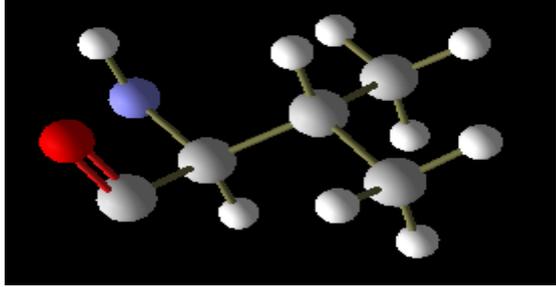
30. F. Louacheni, **Docking protéine-ligand avec AutoDock**, Mémoire de Master, Département d'informatique, Francophone Institute for computer sciences, Hanoi, (2014).
31. M. Lafond, **Docking et Scoring**, (2014).
<https://slideplayer.fr/slide/1562297/>
32. T. Ashutosh et V. A Bankaitis, **Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock**, Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications, (2017), 2575-3005, 106.
33. A. Grosdidier, **Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives**, Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Grenoble, France, (2007).
34. Cours universitaires, **Drug Design**, Polytech Nice Sophia, France.
35. D. J. Holme et H. Peck, **Analytical biochemistry**, Prentice Hall, Etats Unis, (1998)
36. B N. Cronsteino, J R. Bertin, Methotrexate, Springer Science & Business Media, 2000.
37. I. Lim, **How I prescribe Methotrexate step by step**, BJC Health, (2013).
38. Vidal, Méthotrexate, consulté en 2019 :
<https://www.vidal.fr/substances/2347/methotrexate/>
39. P G. Wang, T. BillCai, N. Taniguchi, Nitric Oxide Donors: For Pharmaceutical and Biological Application, John Wiley & Sons, 2005.
40. Raphael E. Pollock, Holland Frei Cancer Medicine, PMPH-USA, 2010.
41. P. Allain, Connaissance des médicaments: Tyrosine kinase, Pharmacorama, 2007.
42. P. Allain, **Connaissance des médicaments: Inhibiteurs des tyrosines kinases, ITK, les tinibs**, Pharmacorama, 2007.
43. J.P. Declercq, C. Evrard et B. Knoops, **Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution**, Journal of molecular biology, (2001), 4853.
44. Protein sequence analysis & classification : Peroxidoxin-5, InterPro.
<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR037944>

45. P. Singh, R. Kumar, S. Tiwari, Ranjana, S. Khanna, A. K. Tewari¹ et H.D. Khanna, **Docking, Synthesis and Evaluation of Antioxidant Activity of 2,4,5-Triaryl Imidazole**, Clin Med Biochem., 1, (2015), 1-4.
46. A. Raisonnier, **Biochimie métabolique et Régulations**, Cours universitaires, Faculté de médecine, Université Paris-VI, (2002-2003).
47. H. Darbon, **La structure des protéines**, Cours universitaires, Université de Aix-Marseille, (2016).
48. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy et P. J. Feeney, **Experimental and computational approaches to estimate solubility and development settings**. Adv. Drug Deliv. Rev., 3, (1997), 23.
49. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
50. F. D. Veber, S. R. Johnson, H.Y. Cheng, R. Brian, W. Ward, and K. D. Kopple, **Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates**, Journal de Medicinal Chemistry, 45, (2002), 2615-2623.
51. K. Ramprasad et A. Prabhu, **Effect of Disease Modifying Agent on Oxidant and Antioxidant Status in Rheumatoid Arthritis**, ACCLM, 3, (2017), 11-15.

Annexe

Tableau : Liste de structure des acides aminé qui détecte dans les interactions

Abréviation	Nom complète	Structure
Lys	Lysine	 <p>A ball-and-stick model of the amino acid Lysine. The central alpha carbon (grey) is bonded to a hydrogen atom (white), an amino group (blue nitrogen with two white hydrogens), a carboxyl group (grey carbon double-bonded to one red oxygen and single-bonded to another red oxygen with a white hydrogen), and a long epsilon-amino side chain consisting of four methylene groups (grey carbons with white hydrogens) and a terminal primary amino group (blue nitrogen with two white hydrogens).</p>
Glu	Glutamine	 <p>A ball-and-stick model of the amino acid Glutamine. It features a central alpha carbon (grey) bonded to a hydrogen atom (white), an amino group (blue nitrogen with two white hydrogens), a carboxyl group (grey carbon double-bonded to one red oxygen and single-bonded to another red oxygen with a white hydrogen), and a side chain consisting of two methylene groups (grey carbons with white hydrogens) and a terminal primary amide group (grey carbon double-bonded to one red oxygen and single-bonded to a blue nitrogen with two white hydrogens).</p>
Ala	Alanine	 <p>A ball-and-stick model of the amino acid Alanine. The central alpha carbon (grey) is bonded to a hydrogen atom (white), an amino group (blue nitrogen with two white hydrogens), a carboxyl group (grey carbon double-bonded to one red oxygen and single-bonded to another red oxygen with a white hydrogen), and a methyl side chain (grey carbon with three white hydrogens).</p>
Arg	Arginine	 <p>A ball-and-stick model of the amino acid Arginine. It has a central alpha carbon (grey) bonded to a hydrogen atom (white), an amino group (blue nitrogen with two white hydrogens), a carboxyl group (grey carbon double-bonded to one red oxygen and single-bonded to another red oxygen with a white hydrogen), and a long side chain consisting of three methylene groups (grey carbons with white hydrogens) and a terminal guanidinium group (a central grey carbon double-bonded to two blue nitrogens, each with one white hydrogen, and single-bonded to a third blue nitrogen with two white hydrogens).</p>

Gly	Glycine	
Asp	Aspartate	
Val	Valine	

- Oxygène
- Azote
- Carbone