

## Faculté de Pharmacie

Année 2021

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 11 juin 2021

Par Chrysanthi PACHOULIDE

Née le 26 novembre 1995 à Chypre

**Les méthodes in silico dans la recherche pharmaceutique. Exemple d'application pour l'étude pharmacocinétique post-autorisation de mise sur le marché des  $\beta$ -bloquants utilisés pour le traitement du glaucome.**

Thèse dirigée par Patrick TROUILLAS

Examineurs :

M. Patrick Trouillas, Professeur des Universités

Président

M. Jean-Baptiste Woillard, Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

Juge

M. Maxime Jouaud, PhD

Juge

Mme. Christelle Pouget, Maître de Conférences des Universités

Juge

Mme. Marylène Viana, Professeur des Universités

Juge





## Faculté de Pharmacie

Année 2021

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 11 juin 2021

Par Chrysanthi PACHOULIDE

Née le 26 novembre 1995 à Chypre

**Les méthodes in silico dans la recherche pharmaceutique. Exemple d'application pour l'étude pharmacocinétique post-autorisation de mise sur le marché des  $\beta$ -bloquants utilisés pour le traitement du glaucome.**

Thèse dirigée par Patrick TROUILLAS

Examineurs :

M. Patrick Trouillas, Professeur des Universités

M. Jean-Baptiste Woillard, Maître de Conférences des Universités

M. Maxime Jouaud, PhD

Mme. Christelle Pouget, Maître de Conférences des Universités

Mme. Marylène Viana, Professeur des Universités

Président

Juge

Juge

Juge

Juge

## Liste des enseignants

---

Le 1<sup>er</sup> octobre 2020

### DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur Bertrand **COURTIOUX**

### VICE-DOYEN :

Monsieur David **LEGER**, Maître de conférences

### ASSESEURS :

Monsieur le Professeur Serge **BATTU**, Monsieur le Professeur Nicolas **PICARD**

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>MAMBU</b> Lengo	PHARMACOGNOSIE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACIE GALÉNIQUE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

<b>PICARD</b> Nicolas	PHARMACOLOGIE
<b>ROGEZ</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
<b>SAINT-MARCOUX</b> Franck	TOXICOLOGIE

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

<b>CHAUZEIX</b> Jasmine	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
<b>JOST</b> Jérémy	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES :**

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACIE GALÉNIQUE
<b>BÉGAUD</b> Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
<b>CHEMIN</b> Guillaume	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>CLÉDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
<b>COOK-MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
<b>DELEBASSÉE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FABRE</b> Gabin	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>LAVERDET</b> Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
<b>LAWSON</b> Roland	PHARMACOLOGIE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>MERCIER</b> Aurélien	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>PASCAUD-MATHIEU</b> Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE
<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES

**ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :**

<b>AUDITEAU</b> Émilie	ÉPIDÉMIOLOGIE, STATISTIQUE, SANTÉ PUBLIQUE
<b>MARCHAND</b> Guillaume	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE

**ENSEIGNANTS D'ANGLAIS :**

<b>HEGARTY</b> Andrew	CHARGÉ DE COURS
<b>VERCELLIN</b> Karen	PROFESSEUR CERTIFIÉ

## Remerciements

---

C'est avec une grande fierté que je présente cette thèse qui signifie l'aboutissement de mes études de pharmacie. Ça aura été une période très riche d'un point de vue académique, intellectuel et émotionnel, dont je n'aurais pas pu profiter autant sans mon entourage et toutes les personnes qui m'ont accompagné jusqu'à la fin.

Mes premiers remerciements s'adressent au Professeur **Patrick Trouillas**, merci d'avoir accepté de diriger et de présider cette thèse. Je souhaite vous exprimer toute ma gratitude pour votre engagement et votre disponibilité surtout dans ce contexte de travail en distanciel bien particulier. Je vous remercie pour votre implication et pour vos conseils bien constructifs.

Au Professeur **Jean-Baptiste Woillard**, tout d'abord merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Je voulais aussi profiter de cette opportunité pour vous remercier de m'avoir introduit au monde fascinant de la pharmacologie, qui je pense va rester une de mes grandes passions.

Aux juges, Professeurs **Christelle Pouget** et **Marylène Viana**, merci de m'avoir accompagnée surtout pendant les deux dernières de mes études à la faculté, grâce auxquelles j'ai pu développer les compétences qui m'ont permis de m'intégrer au monde industriel avec autant de facilité.

Au Docteur **Maxime Jouaud**, j'adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse ; j'espère que vous la trouverez intéressante.

Aux Professeurs **Miriam Kolko** et **Flemming Steen Jørgensen** qui m'ont accueilli en stage à l'Université de Copenhague j'adresse également mes remerciements. Ce stage est décrit en partie dans cette thèse.

Je ne pouvais pas fermer cette partie sans remercier mes deux précieuses amies **Anne** et **Tessa**. Vous êtes ma famille française, la famille qui a toujours été là pour fêter les réussites (*et les échecs...*), et pour me reconforter dans les moments difficiles. Vous me manquez terriblement et j'ai hâte de vous revoir pour les vacances tant attendues...

À **Léa, Jérémy et Myriam**, merci d'avoir rendu ces années plus agréables au quotidien ! On se retrouve bientôt !!

À **mes amis de Chypre** qui sont là depuis que « étudier en France » était une petite idée que je ne pouvais exprimer qu'à eux seuls...

À mon **Nico**, merci d'avoir été ma force quand, moi, je n'en avais plus. Merci, surtout, de m'avoir aidé à retrouver l'inspiration pendant les (assez fréquents) moments de « black-out », notamment pendant la rédaction de cette thèse. Merci d'être toi, merci d'être là.

À ma petite **sœur**, merci de m'avoir appris l'importance de faire attention et de prendre soin de ces proches, même quand eux ne l'expriment pas. À mon petit **frère**, merci d'avoir été ma joie, ma distraction, une raison de rire même les jours les plus difficiles.

À mes **grands-parents**, vous remplissiez mon cœur d'amour à chaque appel.

À ma **maman**, merci de m'avoir donné la force mentale et psychologique pour pouvoir me battre pour mes rêves et mes valeurs. À mon **papa**, merci d'avoir été mon support et de m'avoir poussé à réaliser mes rêves même quand ça te faisait mal au cœur. Merci à tous les deux, pour m'avoir donné la sécurité de savoir que, quoi qu'il arrive, vous serez toujours à mes côtés.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





## Table des matières

---

Introduction .....	12
I. Méthodes <i>In Silico</i> de Modélisation Moléculaire .....	14
I.1. La Mécanique Moléculaire (Molecular Mechanics).....	15
I.1.1. Principe .....	15
I.1.2. Types de champs de force .....	17
I.1.3. Minimisation énergétique.....	18
I.1.4. Optimisation du solvant .....	18
I.2. La Dynamique Moléculaire (Molecular Dynamics).....	19
I.2.1. Principe .....	19
I.2.2. Mise en œuvre .....	20
I.2.3. Applications .....	24
I.3. Docking moléculaire.....	26
I.3.1. Principe .....	26
I.3.2. Mise en œuvre .....	27
I.3.3. Applications.....	34
II. Le traitement du glaucome : de la connaissance de base à l'utilisation des méthodes <i>in silico</i> .....	36
II.1. Le Glaucome et les médicaments anti-glaucomeux .....	37
II.1.1. La physiopathologie du glaucome .....	37
II.1.2. Les médicaments anti-glaucomeux.....	38
II.2. Pharmacocinétique des médicaments anti-glaucomeux.....	41
II.2.1. Etapes ADME .....	42
II.2.2. Métabolisme et potentielles interactions médicamenteuses.....	47
II.3. Études <i>in silico</i> du métabolisme des $\beta$ -bloquants .....	54
II.3.1. Études de modélisation moléculaire sur CYP .....	54
II.3.2. Modélisation moléculaire de l'interaction CYP2D6 - $\beta$ -bloquants .....	57
Conclusion .....	59
Références bibliographiques .....	61
Annexes .....	77
Annexe 1. Etude statistique sur les différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des 57 médicaments les plus prescrits pour les pathologies oculaires.....	78
Annexe 2. Informations supplémentaires .....	82
Serment De Galien.....	85

## Table des illustrations

---

Figure 1 : Application des méthodes <i>in silico</i> tout le long de la recherche et développement d'un médicament.....	13
Figure 2 : Interactions interatomiques.....	15
Figure 3 : Gauche : paysage énergétique des modèles atomistiques et à grain grossier (coarse-grained) ; Droite : représentations atomistique (balles et bâtons) et à grains grossiers (grandes sphères) sur le modèle MARTINI.....	17
Figure 4 : Gamme d'application des différentes méthodes de dynamique moléculaire .....	21
Figure 5 : Représentation schématique des conditions aux limites périodiques cubiques, projetée en 2 dimensions. La boîte centrale est colorée en violet et la particule jaune se retrouve aux limites de la boîte. Les flèches montrent le mouvement de cette particule. ....	22
Figure 6 : Haut : Verlet Neighbor List ; Bas : Cell List .....	23
Figure 7 : Protocole typique de docking moléculaire.....	27
Figure 8 : Grille énergétique .....	29
Figure 9 : Approche incrémentielle .....	30
Figure 10 : Les différents domaines d'application du Docking Moléculaire dans la recherche de médicaments.....	34
Figure 11 : L'œil et le développement du glaucome chronique à angle ouvert. Les flèches grises représentent la pression intra oculaire. Entouré en jaune, l'angle de drainage.....	37
Figure 12 : Représentation schématique des propriétés pharmacocinétiques de l'œil .....	41
Figure 13 : Représentation schématique des différentes trajectoires que le principe actif peut prendre pour se retrouver au niveau systémique. Flèches bleues : le principe actif ; flèches jaunes métabolite(s) ; épaisseur des flèches : concentration relative.....	46
Figure 14 : Implication relative des différentes enzymes du métabolisme dans le métabolisme des médicaments de l'œil. Autres enzymes : cétone réductase, monoamine oxydase, aldéhyde oxydase. Autres enzymes de conjugaison : sulfo-transférases, acétyltransférases, méthyltransférases. ....	47
Figure 15 : La structure du CYP2D6 dans la membrane.....	55
Figure 16 : Position du site actif au sein des CYPs, exemple du CYP3A4. (Hème : la structure violette entourée ; canal d'accès pour les substrats en vert, canal de sortie pour les produits de métabolisme en rouge) .....	56
Figure 17 : Diagrammes des différents variants du CYP2D6, montrant les différents acides aminés qui forment le canal d'entrée du substrat au site actif.....	58
Figure 18 : Structures des $\beta$ -bloquants du glaucome.....	58

## Table des tableaux

---

Tableau 1 : Liste non-exhaustive des principaux de champs de force .....	18
Tableau 2 : Liste non-exhaustive des logiciels de dynamique moléculaire.....	24
Tableau 3 : Liste non-exhaustive des différentes chimiothèques .....	28
Tableau 4 : Les médicaments anti-glaucomeux et leur mécanisme d'action .....	40
Tableau 5: DMEs impliquées dans le métabolisme des médicaments anti-glaucomeux. ...	51
Tableau 6: L'expression des différentes DMEs impliquées dans le métabolisme des médicaments anti-glaucomeux au niveau des tissus oculaires. ....	53
Tableau 7 : Les principaux médicaments prescrits pour les pathologies oculaires et les enzymes dont ils sont substrats, inhibiteurs, inducteurs. ....	78
Tableau 8 : Inhibiteurs et inducteurs des DMEs impliqués dans le métabolisme des médicaments anti-glaucomeux selon la FDA.....	82

## Introduction

---

Le développement d'un médicament est un processus complexe, long et coûteux. Les étapes clés sont la recherche, l'optimisation et la conception d'un médicament-candidat (drug design), l'évaluation préclinique, l'évaluation clinique, l'autorisation de mise sur le marché et la pharmacovigilance tout le long de la vie du médicament(1,2).

A l'étape de conception, des dizaines de milliers de composés sont criblés (screening large) pour n'en sélectionner que quelques milliers, appelés alors composés « hit ». Ces derniers ont des propriétés prédéfinies correspondant à l'activité biologique ciblée. Les composés hits sont étudiés avec des méthodes *in vitro*<sup>1</sup> et *in silico*<sup>2</sup> pour faire émerger les composés « leads » possédant des propriétés pharmacologiques ou biochimiques prometteuses pour devenir un médicament. La pharmacologie et la toxicologie de ces composés-candidats sont souvent aussi étudiés *in vivo* avant d'atteindre l'étape des essais cliniques chez l'homme. Les étapes de conception et d'évaluation préclinique durent typiquement 5,5 ans et généralement, seul 1 candidat sur 1000 arrive au niveau des essais cliniques. L'évaluation clinique, ayant comme but d'évaluer la toxicité et l'efficacité du médicament, dure en moyenne 6 ans, et est divisée en 3 phases<sup>3</sup> et a un taux de réussite de 20%. Par conséquent, la grande majorité des projets de recherche initiés mène à un échec tardif associé à une perte de temps et d'argent colossale.

Ce problème n'a eu de cesse de pousser les processus de recherche et développement d'un médicament vers l'utilisation de méthodes de screening rapides, et notamment de méthodes *in silico*. En effet, leur utilisation est devenue actuellement indispensable et même potentiellement présente dans toutes les étapes du processus, comme indiqué sur la Figure 1. Cet avènement des méthodes *in silico* a été particulièrement notable ces derniers mois avec l'arrivée de la pandémie causée par le SARS-CoV-2 responsable de syndromes respiratoires aigus et la maladie Covid-19 (COronaVirus Disease 2019)(3–5). L'absence de traitement, associé aux taux de transmission ( $R_0$ ) et de mortalité du virus ont mis notre société dans une situation sans précédent qui a mis en avant le besoin urgent du développement rapide de médicaments et vaccins. Dans ce contexte des collaborations entre les gouvernements, les autorités de santé et les milieux académiques et industriels ont été mises en place. Cette situation, a encouragé l'utilisation des méthodes *in silico* afin d'accélérer la découverte et le développement d'antiviraux ou des traitements de soutien à une infection Covid. En effet, des méthodes de docking moléculaire, de dynamique moléculaire, d'homology modeling et de machine learning ont été appliquées très tôt dans les stratégies de repositionnement des médicaments déjà sur le marché (4). Quarante-neuf molécules ont été étudiées par ces méthodes dont 35 sont actuellement en évaluation clinique (4). Parmi ces molécules nous retrouvons notamment remdesivir, le seul antiviral actuellement autorisé par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pour le traitement de la pneumonie demandant une

---

<sup>1</sup> *In vitro* : sur des modèles cellulaires

<sup>2</sup> *In silico* : sur des modèles informatiques

<sup>3</sup> Phase I (dizaine(s) de volontaires sains/malades dépendant de la maladie, but d'étudier la pharmacocinétique et toxicité) ; Phase II (centaine(s) de volontaires malades, but d'étudier la dose minimale efficace et les effets indésirables) ; Phase III (grand nombre de patients, but d'évaluer l'efficacité) ; Phase IV (après la mise sur le marché du médicament, but d'évaluer l'utilisation du médicament à long terme dans des conditions réelles, détecter des effets indésirables rares, complications tardives, biais de prescription)

supplémentation en oxygène causée par la maladie Covid-19 (6). Ces approches ont été appliquées tout au long du processus de recherche et développement des vaccins (5).

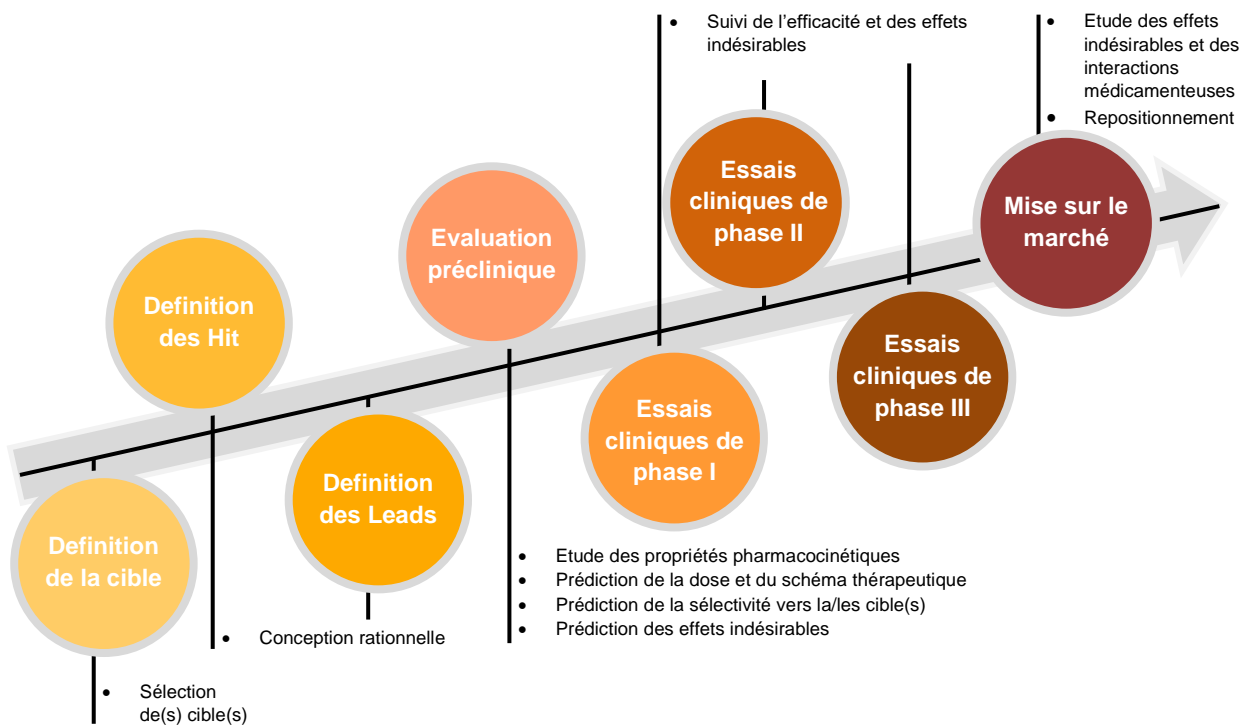


Figure 1 : Application des méthodes *in silico* tout le long de la recherche et développement d'un médicament

Source : N/A

Comme indiqué sur la Figure 1, une des applications majeures des méthodes *in silico* est celle de l'étude des propriétés pharmacocinétiques d'un médicament (étapes ADME : absorption, distribution, métabolisme, excrétion). Elles sont utilisées dans la phase d'évaluation préclinique, mais aussi une fois que le médicament est sur le marché, afin d'étudier ses potentiels effets indésirables et les possibles interactions médicamenteuses. Après avoir brossé un tableau des différentes méthodes *in silico* de modélisation moléculaire (mécanique et dynamique moléculaire, docking moléculaire, applications), ce travail de thèse présentera le cas du métabolisme du Timolol et autres  $\beta$ -bloquants utilisés pour le traitement du glaucome par le cytochrome CYP2D6.

## I. Méthodes *In Silico* de Modélisation Moléculaire

---

L'application des méthodes *in silico* dans la recherche pharmaceutique et la conception de médicaments est de plus en plus importante, voire actuellement indispensable. Les méthodes *in silico* de modélisation moléculaire, telles que la mécanique moléculaire, la chimie quantique et la dynamique moléculaire, permettent de déterminer les agencements spatiaux en trois dimensions des atomes dans une molécule. Elles sont très intéressantes dans le domaine de la recherche médicale car elles permettent d'évaluer les propriétés physicochimiques, les capacités de liaisons intermoléculaires, les propriétés optiques, ou encore la réactivité des molécules ou des systèmes moléculaires.

Leurs premières utilisations dans le domaine pharmaceutique datent de la 2<sup>ème</sup> partie du XX<sup>ème</sup> siècle où la relation entre la structure chimique et les propriétés pharmacodynamiques (PD) et pharmacocinétiques (PK) de composés au sein des systèmes biologiques ont été étudiés *via* des outils informatiques (7). Depuis, d'énormes progrès ont été réalisés dans des domaines connexes tels que la biologie structurale (cristallographie aux rayons X, résonance magnétique nucléaire), la biologie moléculaire, et la bio-informatique. C'est ainsi que les scientifiques ont actuellement à leur disposition des bases de données contenant les structures tridimensionnelles de plus de 100 000 protéines et autres biomolécules. De plus, les infrastructures informatiques ont considérablement grandi au cours des deux dernières décennies, ouvrant de fantastiques champs d'utilisation des méthodes *in silico*. Grâce à ces progrès, ces méthodes ont gagné leur place dans la recherche et développement de nouveaux médicaments et sont largement utilisés par l'industrie pharmaceutique et les laboratoires académiques. De même, ces méthodes sont responsables de la découverte de médicaments qui ont révolutionné le monde médical comme ritonavir, saquinavir, amprenavir et indinavir, médicaments antirétroviraux utilisés actuellement pour le traitement de la maladie de HIV (8,9). D'autres exemples de médicaments issus de cette recherche et actuellement utilisés sont captopril, norfloxacin, isoniazide, dorzolamide et flubiprofène (8).

Les méthodes *in silico* peuvent être classées en 2 catégories, les méthodes basées sur le ligand et les méthodes basées sur le récepteur (9). Les approches basées sur le ligand sont fondées sur l'hypothèse que des composés ayant des structures similaires interagissent avec la(les) même(s) cible(s). Parmi ces approches, les plus utilisées sont les méthodes QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) qui permettent d'estimer la relation entre une structure et son activité biologique à l'aide d'un ensemble de descripteurs structuraux et physicochimiques. De l'autre côté, les approches basées sur le récepteur ou « structure-based drug design » ont comme origine le principe du mécanisme clé-serrure (lock and key mechanism). Elles se basent sur le principe de la reconnaissance spécifique entre la clé et sa serrure pour expliquer la reconnaissance d'un substrat par le site actif d'une protéine. Ce concept a été développé en ce qu'on appelle le concept « main et gant » (« hand and glove ») qui permet de prendre en compte la flexibilité conformationnelle du récepteur et du ligand. Cette méthode est régulièrement utilisée pour l'identification et l'optimisation des composés « hit » et « lead » et pour ceux-ci, elle associe la structure tridimensionnelle de la protéine cible avec les connaissances moléculaires connues à propos de la pathologie (8). Elle consiste à étudier comment les composés se lient à la cible protéique et à estimer l'affinité relative des ligands. Pour se faire, les techniques de dynamique et de docking moléculaire sont les plus utilisées. Ces deux méthodes seront détaillées dans les chapitres suivants, après une introduction à la mécanique moléculaire, méthode sur laquelle reposent les deux autres.

## I.1. La Mécanique Moléculaire (Molecular Mechanics)

La mécanique moléculaire permet de calculer la géométrie (conformation) et l'énergie potentielle des systèmes moléculaires sans résoudre l'équation de Schrödinger. Cette méthode est particulièrement utilisée pour le calcul de systèmes de haut poids moléculaire telles que les macromolécules biologiques (protéines, membranes, ADN) (10,11).

### I.1.1. Principe

La mécanique moléculaire s'appuie sur trois principes :

- Les lois de Newton régissant la mécanique classique.
- Les molécules ont des vitesses plus faibles que la vitesse de la lumière.
- Les mouvements des noyaux (étant plus lourds) sont beaucoup plus lents que ceux des électrons permettant de considérer séparément les mouvements de ces deux types de particules (approximation de Born-Oppenheimer).

En mécanique moléculaire, les atomes sont considérés comme des balles en caoutchouc (caractérisées par leur rayon, leur masse et leur charge), reliées entre elles par des ressorts (caractérisées par une longueur d'équilibre et constante de raideur). Il est donc possible d'associer une fonction d'énergie potentielle à chaque degré de liberté de la molécule : élongation des liaisons (bond stretching), flexion des angles définis par trois atomes liés de façon covalente (bond bending), torsion autour d'une liaison définie par quatre atomes, et interactions interatomiques non-covalentes notamment forces de van der Waals, attraction/répulsion électrostatiques (non-bonding interactions) et liaisons hydrogène (Figure 2).

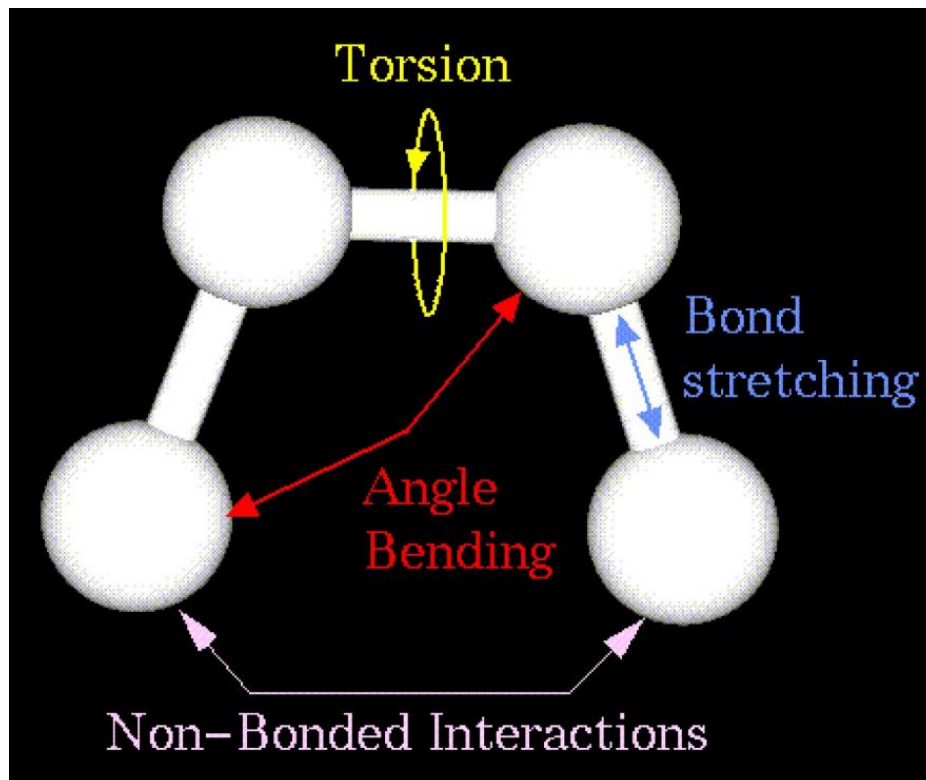


Figure 2 : Interactions interatomiques

Source : Vanommeslaeghe et al.

La fonction mathématique décrivant l'énergie potentielle peut s'écrire comme la somme de ces quatre contributions :

$$E = E_{\text{bond-stretching}} + E_{\text{angle-bending}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{non-bonding}}$$

- **E<sub>bond-stretching</sub> (élongation des liaisons)** est l'énergie nécessaire pour l'élongation d'une liaison à partir de sa longueur d'équilibre, elle est donnée par :

$$E = \sum_{\text{bonds}} k_r (r - r_0)^2$$

où  $k_r$  : constante d'élongation ;  $r_0$  : la distance entre les 2 atomes à l'équilibre

- **E<sub>angle-bending</sub> (flexion ou déformation des angles)** est l'énergie nécessaire pour l'augmentation/diminution de l'angle entre 2 liaisons à partir de son état d'équilibre, elle est donnée par :

$$E = \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

où  $k_\theta$  : constante de déformation ;  $\theta_0$  : angle  $\theta$  à l'état d'équilibre (repos)

- **E<sub>torsion</sub> (torsion des angles dièdres)** est l'énergie nécessaire pour tordre une liaison à partir de son état d'équilibre, elle est donnée par :

$$E = \sum_{\text{torsions}} \frac{V_{n,\varphi}}{2} [1 + \cos(n\varphi - \delta)]$$

où  $V_{n,\varphi}$  : constante de force de torsion ;  $n$  : périodicité de la rotation ;  $\varphi$  : angle de torsion dièdre entre les liaisons ;  $\delta$  : angle de phase du dièdre

- *\*E<sub>improper</sub> (torsion diédrale impropre) peut être utilisée pour forcer les atomes à rester dans un plan ou pour empêcher une configuration de chiralité opposée.*
- **E<sub>non-bonding</sub> = E<sub>vdW</sub> + E<sub>électrostatique</sub> (énergie de non-liaison)** : elle consiste en l'interaction entre 2 atomes non liées de façon covalente

$$E = \sum_{ij} \left[ \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] + \sum_{ij} \left[ \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \right]$$

où  $A_{ij}$  et  $B_{ij}$  : constantes de vdW ;  $r_{ij}$  : distance qui sépare 2 atomes non liés  $i$  et  $j$  ;  $q_i$  et  $q_j$  : charges partielles des 2 atomes non liés  $i$  et  $j$  ;  $\epsilon$  : permittivité du milieu environnant

La fonction mathématique pour l'énergie d'un système moléculaire contient donc un ensemble de paramètres caractéristiques des liaisons et donc des atomes constituants. L'énergie est minimisée par des étapes successives en faisant varier, les distances, angles et torsions autour des valeurs d'équilibre, pour obtenir les géométries d'équilibre de différents conformères et leurs énergies relatives. L'ensemble des paramètres ( $k_r$ ,  $r_0$ ,  $k_\theta$ ,  $\theta_0$ ...) pour les différents atomes et la fonction mathématique pour l'énergie constituent le champ de force. Les paramètres atomiques des champs de force sont obtenus soit par des calculs de chimie quantique avec des méthodes post-Hartree Fock de haute précision (simulation des surfaces d'énergie potentielle), soit par comparaison aux propriétés physiques mesurées



expérimentalement issues de la structure cristalline, des spectres (infrarouge, Raman, RMN), et des données thermodynamiques (chaleurs de sublimation, de formation, d'hydrogénation).

### I.1.2. Types de champs de force

Les champs de force sont choisis en fonction des types de systèmes moléculaires et des applications (cf. chapitre suivant I.2.2). Il existe des champs de forces avec différentes résolutions, atomistiques et à « gros grains »(11,12).

Les champs de force atomistiques prennent en compte tous les atomes du système moléculaire et leurs interactions comme décrit ci-dessus. Les champs de forces United-Atoms ne considèrent pas tous les atomes d'hydrogène, certains groupements chimiques (par ex. CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) étant considérés comme des entités à part entière. Les champs de force à « gros grains », ou coarse-grained, (Figure 3) traitent des mini-clusters d'atomes comme des super-atomes ou pseudo-atomes, le solvant (eau) pouvant être pris comme une particule de van der Waals (11,12). En diminuant, la résolution, on diminue la précision des interactions, mais on accélère les calculs, pouvant ainsi traiter des systèmes moléculaires très gros avec les champs de force à « gros grains ».

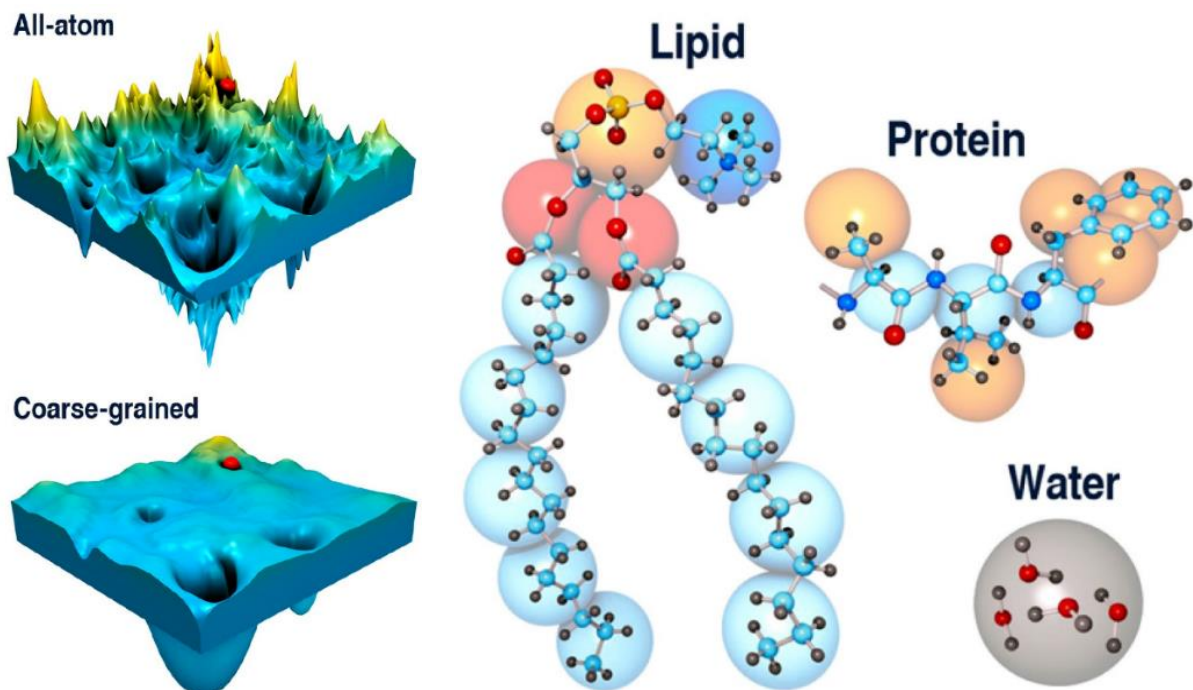


Figure 3 : Gauche : paysage énergétique des modèles atomistiques et à grain grossier (coarse-grained) ; Droite : représentations atomistique (balles et bâtons) et à grains grossiers (grandes sphères) sur le modèle MARTINI.

Source : Kmiecik et al.

Quelques exemples de champs de force sont présentés dans le Tableau 1 ; les plus utilisés pour étudier la dynamique des biomolécules sont CHARMM, AMBER et GROMOS. Souvent le choix entre les différents champs de force est basé sur les structures/ éléments que l'on veut étudier. Les champs de force CHARMM and AMBER sont historiquement plus appropriés pour l'étude de protéines, alors que GROMOS est souvent le champ de forces choisi pour l'étude

de lipides et membranes. Cependant, les trois champs de forces ont beaucoup évolué cette dernière décennie pour traiter un plus large panel de macromolécules.

Tableau 1 : Liste non-exhaustive des principaux de champs de force

Type	Champs de force	Reference
<b>Atomistique</b>	CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)	(13–16)
	AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement)	(17)
	MMFF (Merck Molecular Force Field)	(18)
	OPLS/AA (Optimised Potential for Liquid Simulations)	(19)
<b>Gros grains</b>	MARTINI	(20,21)
<b>United atom</b>	GROMOS	

### I.1.3. Minimisation énergétique

La minimisation énergétique par mécanique moléculaire consiste à minimiser l'énergie potentielle en optimisant les paramètres géométriques, notamment en diminuant les interactions stériques (11). La mécanique moléculaire permet ainsi de trouver le puits d'énergie potentielle le plus proche de la géométrie de départ, souvent choisie arbitrairement. Il s'agit d'une optimisation locale car la conformation obtenue reste voisine de la conformation de départ sur la surface d'énergie potentielle, et cette minimisation permet rarement d'obtenir la conformation la plus stable du système moléculaire (minimum global), mais plutôt un minimum énergétique local.

### I.1.4. Optimisation du solvant

Le solvant entourant la structure que l'on étudie, souvent l'eau, est aussi un paramètre qui doit être considéré car il interagit directement avec la molécule d'intérêt. On peut modéliser une solution en l'assimilant à une structure périodique dont le motif élémentaire est constitué par une « boîte » contenant 1 molécule de soluté et  $n$  molécules de solvant. La minimisation de l'énergie se fait alors sur le système global. Il existe 3 catégories de modèles de solvant : les modèles rigides, flexibles et polarisables. Les plus couramment utilisés sont les modèles rigides à 3 sites, comme SPC et TIP3P. Ces modèles attribuent à chacun des 3 atomes une charge ponctuelle, et seul l'atome d'oxygène est, en plus, décrit par des paramètres de Lennard-Jones.

## I.2. La Dynamique Moléculaire (Molecular Dynamics)

Comme nous venons de le voir, la mécanique moléculaire permet de calculer la position des atomes dans une molécule et de trouver leurs états énergétiques conformationnels minimum. Cependant, aucune vibration ou autre mouvement n'est pris en compte dans cette optimisation de géométrie. En d'autres termes, le calcul de mécanique moléculaire est réalisé à la température de 0K. Pour étudier la dynamique d'un système moléculaire et notamment l'entropie, on utilise la dynamique moléculaire. Cette méthode simule une température supérieure à 0K en simulant les comportements dynamiques des systèmes moléculaires (c-à-d en attribuant des vitesses aux atomes dans les molécules) au cours du temps.

La dynamique moléculaire s'appuie sur la considération que toutes les entités trouvées dans une boîte de simulation sont flexibles, ce qui permet de simuler les mouvements intramoléculaires, tout en appliquant les lois de Newton sur le mouvement. Ces simulations modifient les géométries étape par étape de manière que chaque étape représente un ensemble de positions et de vitesses atomiques. Ces changements conformationnels guidés par le champ de force et les vitesses des atomes permettent l'exploration autour d'un minimum énergétique ou le passage d'un puits d'énergie potentielle à un autre, permettant ainsi l'exploration d'une plus grande partie de la surface d'énergie potentielle.

### I.2.1. Principe

Les lois de Newton peuvent être appliquées sur chaque atome de la molécule tant que ceux-ci sont considérés comme des masses ponctuelles. Selon ces lois, le mouvement d'un atome  $i$  est déterminé par l'ensemble des forces  $F_i$  exercées sur celui-ci (par les atomes autour de lui), en fonction du temps. Il dépend donc de la position  $r_i$  de l'atome à l'instant  $t$ .

- Les vitesses  $v_i$  et positions  $r_i$  de chaque atome sont reliées à l'énergie cinétique  $E_c$  et à la température du système, et sont déterminées par des lois de distribution de Maxwell-Boltzmann :

$$F(v)dv = 4\pi n \left(\frac{m}{2\pi kT}\right)^{3/2} e^{-\frac{mv^2}{2kT}} v^2 dv$$

où,  $v$  est la vitesse ;  $n$  est le nombre moyen de molécules par unité de volume ;  $m$  : masse d'une molécule

Le problème consiste alors à pouvoir simuler la position d'un atome à l'instant  $t + \Delta t$  en connaissant sa position à l'instant  $t$ .

- La force  $F_i(t)$  exercée sur l'atome en position  $r_i(t)$  à l'instant  $t$  peut être calculée à partir de l'énergie potentielle  $E_p(t)$ , elle-même calculée avec des méthodes de mécanique moléculaire (champs de force) :

$$\vec{F}_i(t) = \frac{\delta \vec{E}(r_1, \dots, r_n)}{\delta \vec{r}_i(t)}$$

où  $\vec{r}_i$  : vecteur position de l'atome  $i$

- Ensuite, avec la loi d'action de masse, on peut calculer l'accélération atomique  $\vec{a}_i$  qui va nous permettre de calculer la vitesse  $\vec{v}_i$  :

$$\alpha_i(t) = \frac{F_i(t)}{m_i} = \frac{dv_i}{dt}$$

- Enfin, les nouvelles positions des atomes sont calculées à partir des vitesses atomiques :

$$v_i(t) = \frac{dr_i}{dt} ; r_i(t + \delta t) = r_i(t) + v_i \Delta t(t) + \frac{1}{2} \alpha_i \Delta t^2(t)$$

Le calcul se fait à des étapes séparées par des intervalles de temps  $\Delta t$  très courts (de 1 à 10 femtosecondes ( $10^{-15}$  s)), appelés pas d'intégration. On réalise ces calculs sur des temps de l'ordre de plusieurs centaines de nanosecondes, voire microsecondes, ce qui donne des trajectoires atomiques (ensemble de conformations moléculaires en fonction du temps).

## I.2.2. Mise en œuvre

### **Choix de la méthode (atomistique ou à « gros grains ») :**

Pour des biomolécules les méthodes de chimie quantique ne peuvent pas être utilisées car le nombre d'atomes est beaucoup trop important pour que le calcul se fasse dans un temps raisonnable. En dynamique moléculaire on peut alors choisir entre les champs de force dits tout-atome (all-atom) ou les champs de force à « gros grains » (coarse-grained) (Figure 4). Les protéines étant des systèmes moléculaires de grande taille, même en utilisant la dynamique moléculaire, l'étude de leurs fonctions biologiques nécessite des algorithmes et capacités informatiques puissantes. L'utilisation des méthodes atomistiques classiques est cependant limitée à des petits systèmes moléculaires et/ou des processus biologiques rapides comme par exemple le repliement de petites protéines, ou leur dimérisation (12). Les méthodes à « gros grains » ont été développées pour la réalisation de simulations à des échelles de temps et de taille assez grandes et pour pouvoir étudier des processus biologiques de plus en plus réalistes. Le but des méthodes à « gros grains » est de diminuer la résolution (12) ; les super-atomes pouvant être des parties d'acides aminés voire des acides-aminés entiers. Le degré de « simplification » dépend du modèle choisi (Martini, Rosetta(22), PRIMO(23), Levitt-Warshel, SICHO, UNRES(24), CABS(25)). Une limitation non négligeable des modèles à « gros grains » est le fait qu'ils sont valides seulement à des conditions spécifiques et qu'une optimisation et paramétrisation des modèles doit être effectuée (26).

### **Étapes :**

Une simulation de dynamique moléculaire se fait en trois phases (thermalisation, équilibration et production).

- La thermalisation consiste à chauffer le système pour l'amener de 0K à la température souhaitée (généralement 298 ou 310K). Cette partie dure environ 2 à 10ps de simulation (1000 à 5000 pas d'intégration).
- L'équilibration consiste à stabiliser la température du système et elle dure 10 à 20ps. Pendant cette phase, il y a un échange important d'énergie potentielle et d'énergie cinétique. La température est calculée après chaque étape, et ramenée à la température de référence, avec la formule :

$$\frac{dT}{dt} = \tau^{-1}(T_0 - T)$$

où  $\tau$  est le temps de relaxation, généralement égal à 10fs, la valeur doit être assez petite pour permettre un couplage efficace,  $T_0$  la température de référence,  $T$  la température du système.

- La phase de production est la phase concrète des simulations qui va être exploitable. Elle dure de quelques dizaines de nanosecondes à quelques dizaines de microsecondes. Les conformations sont sauvegardées toutes les 0,05 ou 0,1ps.

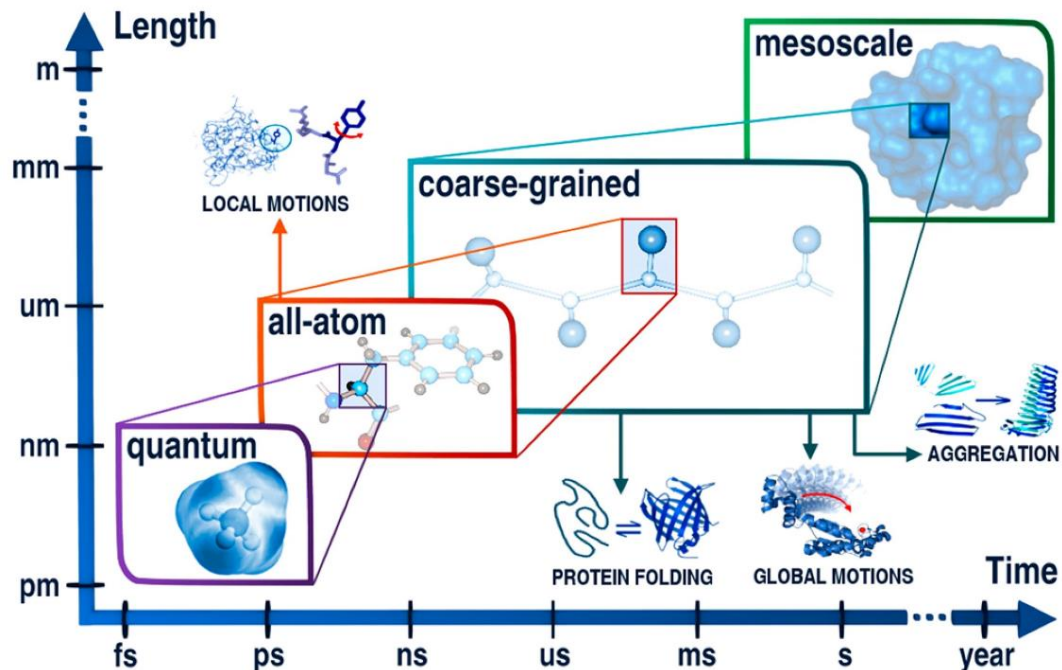


Figure 4 : Gamme d'application des différentes méthodes de dynamique moléculaire

Source : Kmiecik et al.

### Paramètres de construction du système

Régulation de la température et de la pression (27). Les simulations de dynamiques moléculaires sont réalisées dans des ensembles canoniques :

- *Ensemble NVT* : ensemble où le nombre de particules « N », le volume « V » et la température « T » sont maintenus constants. Pour maintenir la température constante, on utilise des algorithmes de thermostats totaux ou locaux.
  - Totaux : Nosé-Hoover, Berendsen, Parrinello-Bussi
  - Locaux : Langevin, Andersen, Dissipative Particle Dynamics (DPD)
- *Ensemble NPT* : environnement isothermique-isobarique où N, T et la pression P sont maintenus constants, le volume pouvant changer. Ces systèmes, en plus des thermostats, utilisent des algorithmes de barostats :
  - Andersen, Parrinello-Rahman, Berendsen

Définition des limites de la boîte de simulation (11,27). La définition des limites de la boîte de simulation est cruciale. Le système de simulation ne peut être ni ouvert, ni entièrement fermé car ces deux cas simuleraient des comportements irréalistes. Dans un système ouvert, les particules pourraient bouger à l'infini, changeant ainsi la densité des particules, alors qu'elle doit être constante. Dans un système complètement fermé, les particules en bordure de boîte

subiraient des effets de surface irréalistes. Pour s'affranchir de ces problèmes, le choix le plus commun est la définition des conditions aux limites périodiques.

- *Periodic Boundary Conditions (PBC)* : quand on applique les conditions aux limites périodiques, une image virtuelle de la boîte de simulation est répétée infiniment autour d'une boîte centrale, dans toutes les directions (Figure 5). Les molécules des boîtes virtuelles environnant la boîte centrale vont bouger exactement de la même manière que dans la boîte centrale. Dans ces conditions, quand une molécule sort de la boîte centrale, son image réapparaît du côté opposé.

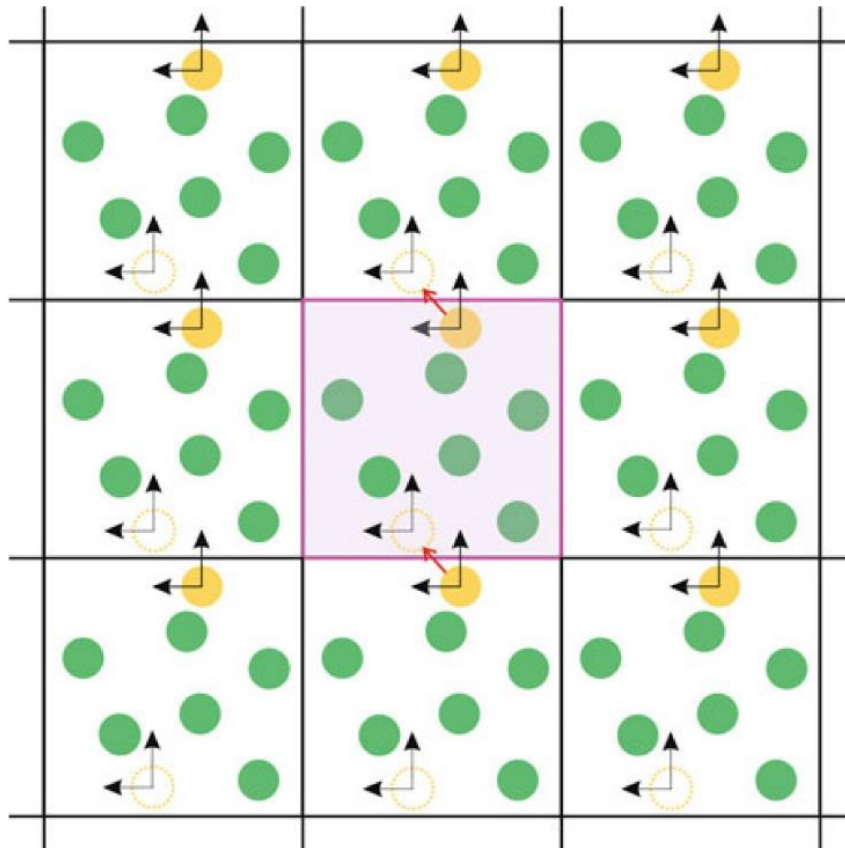


Figure 5 : Représentation schématique des conditions aux limites périodiques cubiques, projetée en 2 dimensions. La boîte centrale est colorée en violet et la particule jaune se retrouve aux limites de la boîte. Les flèches montrent le mouvement de cette particule.

Source : Source : Hug, 2013

*Diminution du temps de simulation.* La partie la plus coûteuse en temps de simulation est le calcul des forces interatomiques existantes pour tous les atomes du système. Prenant en compte qu'après une certaine distance interatomique, les interactions sont plus faibles, une manière d'économiser du temps de calcul est d'ignorer les forces d'interaction entre atomes séparés par une distance plus grande qu'une distance limite. Ceci est appliqué pour les interactions non-covalentes (forces van der Waals et électrostatiques) et en utilisant des méthodes comme les listes de voisinage (neighbor lists) et les listes de cellules (cell-lists).

- *Verlet Neighbor List* : cette liste de voisinage définit deux zones limites, le  $r_c$  et le  $r_v$ . La première zone correspond à la zone dans laquelle toutes les forces d'interactions interatomiques sont calculées à un moment donné et la deuxième correspond à la zone

de voisinage. Les particules incluses dans la zone de voisinage sont celles avec lesquelles la particule d'intérêt peut interagir à un autre moment (cf. Figure 6 haut).

- *Cell-List* : cette méthode divise la boîte de simulation en plusieurs sous-boîtes, dont la largeur correspond à la distance limite d'interactions interatomiques  $r_c$ . Seules les forces d'interactions entre les particules retrouvées dans la même boîte que la particule d'intérêt ou les boîtes voisines sont prises en compte (cf. Figure 6 bas).
- *Algorithmes de contraintes* : Une autre façon d'économiser du temps de simulation est d'appliquer des algorithmes de contraintes qui diminuent les degrés de liberté des molécules. Ces algorithmes traitent les molécules comme des unités rigides ou semi-rigides (avec des longueurs de liaison et/ou angles de liaison fixes).
  - Algorithmes de contraintes itératifs : SHAKE, RATTLE
  - Linear Constraint Solver (LINCS)
  - Explicit constraint forces

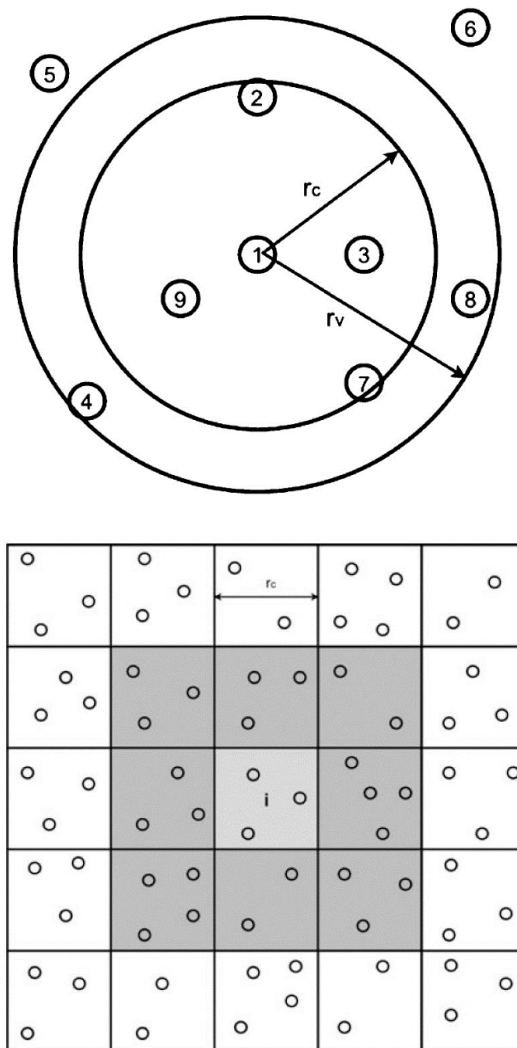


Figure 6 : Haut : Verlet Neighbor List ; Bas : Cell List

Source : Hug, 2013



Tableau 2 : Liste non-exhaustive des logiciels de dynamique moléculaire

Logiciel	Reference
Lammps (large-scale atomic/molecular massively parallel simulator)	(28)
Namd (nanoscale molecular dynamics)	(29)
Gromacs ( groningen machine for chemical simulations)	(30)
Amber (assisted model building and energy refinement)	(31)
Charmm (chemistry at harvard macromolecular mechanics)	(32)
Hoomd-blue	(33)

### I.2.3. Applications

Les méthodes de dynamique moléculaire ont trouvé de nombreuses applications en particulier dans l'étude de la structure des protéines au-delà des données issues de la cristallographie. Elles permettent d'étudier la dynamique des protéines, de découvrir des sites de liaison plus rares (cryptic binding sites), et ainsi d'augmenter les cibles potentiels de médicaments (9).

Une des principales utilisations de la dynamique moléculaire dans la conception de médicaments est la découverte et le choix de la structure cible. Les simulations de dynamique moléculaire peuvent permettre de cartographier le(s) site(s) de liaison, analyser le(s) mode(s) de liaison/libération du ligand ainsi que le(s) mode(s) d'interaction ligand-récepteur. L'utilisation de la dynamique moléculaire pour déterminer des sites de liaison allostériques et des conformations des complexes ligand allostérique-récepteur est de plus en plus employée (9). Un exemple est celui de l'étude faite par Dror, R., Green, H. Valant, C. *et al.* qui ont pu, en utilisant des champs de force atomistiques, déterminer les sites de liaison et les interactions ligand-récepteur entre les récepteurs GPCR muscariniques M2 et l'acétylcholine ainsi que des ligands allostériques (34). Une autre application de la dynamique moléculaire très intéressante en pharmacologie est l'étude de la cinétique de formation et dissociation des complexes ligand-récepteur et de l'énergie nécessaire pour ce processus (9). Cette application peut donner des informations sur l'affinité du complexe mais aussi sur le temps de rétention du ligand au niveau de la cible (35). En effet, plus le ligand reste lié au récepteur, plus il aura le temps d'exercer son effet thérapeutique donc plus le médicament sera efficace.

La dynamique moléculaire a été traditionnellement employée en tant que complément des méthodes de docking moléculaire, par l'utilisation post-simulation de méthodes de clustering de méthodes dites d'affinement (refining) et de re-notation (rescoring) des poses d'amarrage (36). Elle est aussi habituellement utilisée pour étudier la stabilité du complexe ligand-récepteur obtenu par un « induced-fit docking » (36). Une application plus récente est l'approche « relaxed-complex scheme » qui utilise au préalable la dynamique moléculaire atomistique sur la protéine cible afin de décrire la flexibilité de celle-ci et les différentes conformations avant de commencer le docking moléculaire (37). Chaque conformation obtenue, appelée « protein snapshot », est considérée par le logiciel de docking moléculaire comme une cible différente dans laquelle les ligands sont introduits (9). Un autre protocole de docking moléculaire qui inclut l'utilisation des méthodes de dynamique moléculaire est le protocole MD-IF (Molecular Dynamics-Induced Fit) (36). Il consiste à utiliser des simulations



de dynamique moléculaire atomistique pour moduler l'ouverture des poches secondaires du site actif afin d'induire la formation d'un premier complexe ligand-récepteur qui va être utilisé comme base pour la suite (9). Enfin, la dynamique moléculaire peut aussi être utilisée pour la cartographie du site actif afin de retrouver les sites de liaison les plus probables. Un exemple est le protocole SILCS (Site Identification By Ligand Competitive Saturation) qui consiste à introduire simultanément de grandes concentrations de plusieurs petits ligands pour occuper la totalité du site actif et retrouver ainsi les sites de liaison les plus favorables (9).

Les simulations de dynamique moléculaire sont aussi souvent utilisées pour l'optimisation *in silico* des ligands. Ceci permet notamment d'étudier les différentes interactions entre les différents conformères des ligands et le récepteur, afin de déterminer quelles sont les organisations conformationnelles plus stables dans le temps et qui contribuent (thermodynamiquement) le plus au processus de liaison (9).

### I.3. Docking moléculaire

Le docking moléculaire est un outil de simulation qui a comme objectif de comprendre et prédire une reconnaissance moléculaire, souvent entre un ligand et un récepteur. Les logiciels de docking moléculaire peuvent trouver le mode de liaison du ligand avec son récepteur et estimer l'affinité du complexe ligand-récepteur. Il est surtout utilisé pour la conception de médicaments (drug design) lorsqu'un récepteur particulier est ciblé. Combinée à la dynamique moléculaire, elle constitue l'une des principales approches théoriques de conception basées sur le récepteur (receptor-based drug design). L'avantage de cet outil est qu'il est très rapide (vitesse <1s/ligand).

On peut distinguer trois variantes des méthodes de docking moléculaire :

- Re-docking : docking d'un ligand obtenu *via* la structure déterminée par diffraction des rayons X (DRX) d'un complexe ligand/protéine dans le site de liaison de la protéine avec laquelle il a été co-cristallisé.
- Cross-docking : docking d'un ligand obtenu *via* la structure déterminée par DRX d'un complexe ligand/protéine dans le site de liaison d'une protéine obtenue *via* une autre structure déterminée par DRX.
- Screening : docking d'une librairie de ligands dans le site de liaison d'une protéine et classement des complexes par rapport à un score de docking (lié à l'énergie du complexe ligand-récepteur).

#### I.3.1. Principe

Les logiciels de docking moléculaire fonctionnent sur le principe d'un algorithme qui a été construit à base de données biophysiques (RMN, fluorescence) et biochimiques (modifications chimiques, mutagenèse, protéolyse), de données sur différents complexes ligand-récepteur de référence (RMN, DRX), les lois de la physico-chimie et des calculs statistiques. Cet algorithme est ainsi capable de prédire le mode d'interaction entre un ligand et un récepteur en se basant seulement sur les structures 3D de ces deux systèmes moléculaires (36,38).

Le mode d'interaction est défini en prenant en compte les aspects géométriques, c'est-à-dire la position  $(x, y, z)$ , l'orientation et la conformation (angles de torsion) du récepteur (38). Comme schématisé sur la Figure 7, l'étape de « docking » consiste à faire un échantillonnage des conformations/orientations du ligand dans un espace défini. Elle est suivie d'une étape d'évaluation de l'affinité des complexes correspondant à chaque mode d'interaction possible, appelée « scoring ». Cette étape a pour but d'associer la meilleure conformation du complexe au minimum global de la surface d'énergie potentielle.

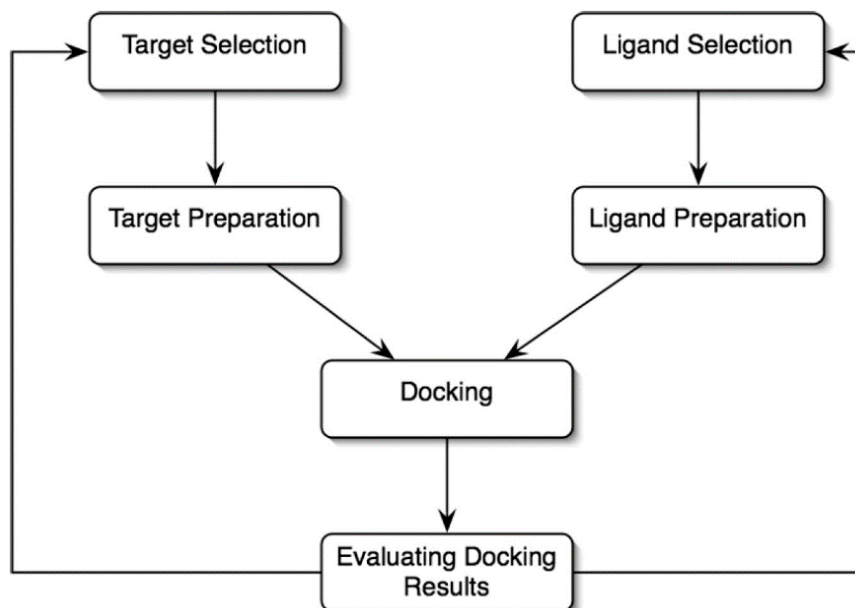


Figure 7 : Protocole typique de docking moléculaire

Source: Garrett M. Morris and Marguerita Lim-Wilby

### I.3.2. Mise en œuvre

#### 1. Sélection et préparation du récepteur

Si la structure cristalline du récepteur a été obtenue expérimentalement (RMN, DRX), celle-ci peut être trouvée dans des bases de données comme la PDB (Protein Databank [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), ReLiBase ou Binding MOAD. Il est généralement préférable d'utiliser des structures qui ont déjà un ligand fixé dans le site actif, qui contiennent toutes les molécules biologiquement nécessaires pour la fonction de la protéine (ex. cofacteurs) et dont la séquence est complètement résolue, tout au moins dans les parties clés du site de liaison. Lorsque la structure 3D de la protéine cible n'est pas résolue, il faut utiliser des modèles d'homologie, mais dans ce cas la qualité du docking moléculaire dépendra fortement de la qualité du modèle. Celle-ci peut être mesurée par des paramètres tels que le facteur résiduel R (R-factor), le facteur B (B-factor) et la résolution de la structure de départ.

- Le facteur R évalue l'accord entre la structure cristallographique et les résultats des données expérimentales obtenues par diffraction des rayons X.
- Le facteur B, ou facteur de température évalue la mobilité statique ou dynamique des atomes, il permet d'indiquer visuellement les régions pour lesquelles il y a une ambiguïté structurelle.
- La résolution de la structure doit préférentiellement être inférieure à 2,5 Å.

Un autre paramètre important est la flexibilité du récepteur. Les structures cristallines sont des images statiques du récepteur, ignorant le comportement dynamique de celui-ci. En effet, le récepteur peut adopter des conformations différentes lorsqu'il n'est pas en phase solide (cristal) ou encore lorsqu'il accueille des ligands différents. Pour résoudre ce problème, il est

possible d'utiliser de la dynamique moléculaire avant de continuer avec le docking, pour calculer la flexibilité du récepteur. La plupart des logiciels de docking gardent le récepteur rigide.

Avant de commencer le docking, il faut enlever les molécules d'eau fixées sur la structure cristalline qui ne participent pas au processus d'interaction et rajouter les protons au pH désiré (généralement pH 7,2). Si la structure contient un ligand, il faut aussi l'enlever.

## 2. Sélection du ligand

La sélection du ligand dépend de l'objectif du projet : recherche de lead (molécule médicamenteuse candidat avec un fort potentiel thérapeutique), optimisation de lead, etc. Le plus souvent, la structure 3D du ligand, contenant tous les protons est nécessaire. Les ligands peuvent être retrouvés dans des chimiothèques de molécules publiques ou privées (cf. Tableau 3). Si la structure 3D du ligand n'est pas disponible, il est possible, à partir du langage SMILES de convertir les ligands en structures 3D à l'aide de logiciels comme CORINA ou ZINC. Il est aussi possible de passer de la forme 2D à la forme 3D du ligand en utilisant des logiciels comme CORINA ou Ghemical. Pour ne pas rajouter des biais au calcul de docking, il est important de vérifier que les états de protonation, les formes tautomère et stéréoisomères du ligand sont correctes. Ceci peut être vérifié par des logiciels comme QUACPAC, TAUTOMER et LigPrep.

Tableau 3 : Liste non-exhaustive des différentes chimiothèques

	CHIMIOTHEQUE	Reference
<b>PUBLIQUES</b>	PubChem	(39)
	ChEMBL	(40)
	BindingDB	(41)
	ZINC	(42)
	ChemSpider	(43)
	DrugBank	(44)
	ChemBioFrance	(45)
<b>PRIVEES</b>	ChemBridge	(46)
	Maybridge	(47)
	ChemDiy	(48)
	Life Chemicals	(49)
	Specs	(50)
	Enamine	(51)

La plupart des logiciels de docking traite les ligands comme flexibles. Cependant, plus le nombre de degrés de liberté sur le ligand est grand (ex. liaisons de rotation), le plus le calcul sera long. Pour économiser du temps de calcul, une recherche de la flexibilité du ligand peut être effectuée au préalable. Le plus souvent, on peut faire une exploration de l'espace des conformations avec des méthodes de dynamique moléculaire, des algorithmes de Monte Carlo, des algorithmes génétiques, des procédures de recuit simulé, des comparaisons aux bases de données expérimentales, ou encore des calculs de chimie quantique. Une autre stratégie est de reconstruire le ligand par fragments dans le site actif, par une approche incrémentielle (cf. Figure 9 : Approche incrémentielle).

### 3. Docking

Le docking est étape à proprement parlé d'exploration d'un espace défini (« poche », binding pocket) au sein du récepteur pour trouver le(s) meilleur(s) mode(s) de liaison du ligand. Une fois que les ligand(s) et récepteur ont été introduits dans le programme et modélisés comme décrit dans les paragraphes précédents, on choisit un champ de force et on fait une minimisation énergétique. Le calcul recherche la surface accessible au solvant du récepteur et crée une image négative de cette surface. Les poches de liaison sont ainsi détectées et l'on découpe l'espace environnant en une grille telle que les nœuds sont associés à une valeur énergétique. Le positionnement des atomes du ligand sur les nœuds de la grille permet de réaliser un classement énergétique (« scoring ») et d'identifier les meilleures poses.

#### a. Détection de la poche et définition de la grille énergétique

L'espace à explorer peut-être la protéine entière, on parle alors de « blind docking ». Ce genre de procédure peut être long et hasardeux et n'apporte pas facilement d'informations spécifiques sur l'interaction ligand-récepteur. Lorsque l'espace à explorer est plus réduit, grâce par exemple à la présence d'autres ligands dans le site de liaison connu, de données de mutagenèse *etc.*, le docking est plus ciblé. Pour détecter cet espace il est aussi possible d'utiliser des logiciels comme Pocket-Finder, CAVER, MSPocket, Q-SiteFinder ou eFindSite.

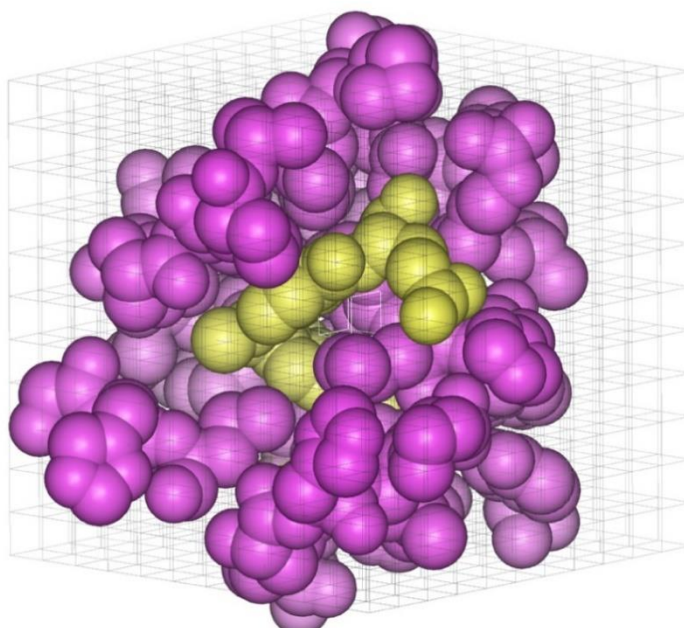


Figure 8 : Grille énergétique

Source : Cours Pr Levoin, M2 BS-COMIT, Université de Rennes 1

## b. Exploration (docking)

Les méthodes d'exploration peuvent être classées par rapport aux degrés de flexibilité des molécules (ligand et récepteur) : docking rigide, docking semi-flexible et docking flexible. Dans un docking rigide, les deux molécules sont considérées comme des entités rigides et seules les rotations et translations du ligand sont prises en compte. Les méthodes semi-flexibles considèrent le ligand, tout ou partie, flexible alors que la géométrie de la protéine reste rigide. Enfin, dans le docking flexible, le ligand et certains acides aminés de la poche du récepteur sont flexibles. Ce type de docking est beaucoup plus coûteux en temps de calcul mais permet un docking beaucoup plus réaliste.

### • Docking semi-flexible (Flexible ligand docking)

Dans le docking semi-flexible, l'exploration de la poche peut être effectuée soit par des algorithmes systématiques ou stochastiques, locaux, globaux ou mixtes. Les méthodes locales cherchent les minima locaux alors que les méthodes globales cherchent le minimum énergétique global.

#### **Algorithmes systématiques :**

Le principe des algorithmes systématiques consiste à représenter chaque degré de liberté du ligand par une grille de valeurs qui vont être explorées de manière combinatoire (52). Plus il y a des degrés de liberté, plus l'espace d'exploration est grand, ce qui impose la mise en place de critères de terminaison de l'exploration pour économiser du temps de calcul (52). Cette méthode est plus adaptée pour le docking avec peu de degrés de liberté (38). Les méthodes systématiques peuvent être sous-divisées en méthodes de recherche exhaustive, par fragmentation (méthode incrémentielle) et ensemble conformationnel (conformational ensemble) (36). Le logiciel Glide inclut une étape de recherche exhaustive pendant l'étape de docking alors que l'algorithme de construction incrémentielle est celui qui est le plus souvent utilisé (36). La méthode par fragmentation consiste à identifier les fragments d'importance significative dans le ligand (ex. cycle aromatique, acides aminés) et les placer dans le site actif de façon à trouver la conformation de chaque fragment, donnant les contacts les plus favorables (cf. Figure 9). La position et orientation des fragments dans le site actif sera ainsi le point de départ d'une étude conformationnelle du ligand entier. C'est la méthode de recherche des logiciels comme FlexX (53) et CORINA (54).

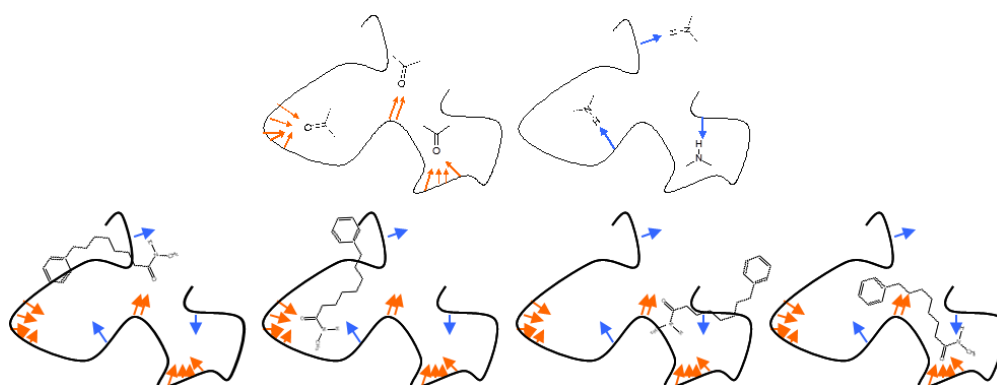


Figure 9 : Approche incrémentielle

Source : Cours Pr Levoine, M2 BS-COMIT, Université de Rennes 1

### **Algorithmes stochastiques :**

Les algorithmes stochastiques changent aléatoirement (au moins 50 fois) les valeurs des degrés de liberté jusqu'à arriver à un critère de terminaison déterminé par le chercheur (36,38). Souvent elles changent un degré de liberté du système à la fois (52). Ces méthodes ont l'avantage d'être très rapides, ainsi, elles sont plus convenables pour un docking moléculaire de plus grande dimension (38). Cependant, elles n'assurent pas l'exploration de l'espace conformationnel entier, ce qui impose le risque de ne pas retrouver la « vraie » meilleure pose (36,52).

Parmi les algorithmes stochastiques, on retrouve les méthodes de Monte Carlo, les méthodes Tabu, les algorithmes évolutionnaires (evolutionary algorithms) et les méthodes d'optimisation Swarm (Swarm optimisation) (31). Les méthodes basées sur l'algorithme Monte Carlo sont utilisées par des logiciels comme AutoDock, ICM, MCDOCK, AutoDock Vina et ROSETTALIGAND. Parmi les méthodes Tabu, on retrouve PRO\_LEADS et PSI-DOCK, alors que l'algorithme évolutionnaire le plus connu est l'algorithme génétique (Genetic Algorithms). Les algorithmes génétiques sont utilisés par des logiciels comme AutoDock 3 et 4, PSI-DOCK, S4MPLE et rDock.

- **Docking flexible (36,52,55)**

Les méthodes de docking flexible considèrent également le récepteur-protéine comme flexible. Certaines approches étudient les différentes conformations du récepteur (single receptor conformation input), alors que d'autres étudient plusieurs structures du récepteur avec différentes conformations (multiple input receptor conformations).

#### **Single receptor conformation input :**

Une des premières approches utilisées est celle du soft-docking. La méthode consiste à atténuer les forces de vdW employées dans le champ de force du scoring énergétique, ce qui permet le chevauchement entre ligand et protéine et induit des interactions entre eux (56). Une stratégie est par exemple d'étudier seulement la flexibilité de certaines chaînes latérales (sidechain flexibility), souvent de chaînes latérales autour du site actif. Cette approche est utilisée par GOLD, RosettaLigand, AutoDock 4 et AutoDock Vina.

#### **Multiple input receptor conformations :**

Il est possible d'utiliser des bibliothèques de conformères (conformer libraries) et « faire interagir » le ligand avec tous les conformères choisis. Il est possible d'utiliser des bibliothèques de rotamères ou de générer les conformères par dynamique moléculaire. Des exemples d'algorithmes utilisant cette méthode sont DDE (Dead End Elimination) et EUDOC. Une autre approche est l'utilisation de l'ensemble de la bibliothèque des conformères pour le calcul préalable de la contribution potentielle du récepteur sur l'énergie libre de liaison et la génération d'une grille énergétique (ensemble grid ou average grid). Une fois la grille générée, le processus d'interaction est étudié, le récepteur étant rigide. Cette méthode est utilisée par le logiciel DOCK. Le logiciel FlexE utilise la grille énergétique (ensemble grid), mais cette fois une grille est générée pour un ensemble de protéines chimères. Cette méthode est appelée « united description of the protein » et les protéines chimères sont formées par une fusion des parties rigides conservées avec des parties flexibles du récepteur, associées entre elles de façon combinatoire.

- **Dynamique Moléculaire et docking moléculaire**

Une autre méthode d'exploration est la dynamique moléculaire qui permet de décrire toute l'évolution du processus d'interaction ligand-récepteur. Elle permet de simuler toute la dynamique de l'interaction à partir de l'état non lié du ligand et récepteur jusqu'à la formation du complexe, de manière à effectuer un docking flexible (36). Ceci permet d'étudier les états métastables du ligand, des sites de liaison alternatifs, le rôle de l'eau dans le processus d'interaction et les différents réarrangements conformationnels qui se forment pendant le processus (36). On réalise souvent des dynamiques moléculaires courtes (10-50 ns) à l'issue des procédures de docking, permettant un échantillonnage réaliste de l'espace conformationnel.

### **c. Scoring énergétique (36)**

A l'étape de « scoring » le logiciel accorde une valeur à chaque conformation trouvée pendant le docking. Les « scores » sont ni plus ni moins que les énergies des complexes ligand-récepteur et permettent d'estimer l'affinité ligand-récepteur. Il existe des fonctions de scoring empiriques (regression-based), statistiques (knowledge-based) et de mécanique moléculaire.

#### ***Fonctions empiriques :***

Les fonctions empiriques prennent en compte les termes énergétiques empiriques décrivant les complexes, comme les interactions de vdW, les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène, les liaisons ioniques, les surfaces de contact hydrophobes, l'enthalpie initiale, la perte entropique du ligand, etc. L'avantage des fonctions empiriques est qu'elles sont adaptables et paramétrables ; cependant elles sont dépendantes des complexes initiaux et elles considèrent principalement les paramètres enthalpiques. Des exemples des fonctions empiriques sont LUDI, GlideScore et ChemScore.

#### ***Fonctions statistiques :***

Les fonctions statistiques considèrent que les contacts entre le ligand et le récepteur qui sont les plus explorés statistiquement sont ceux dont les interactions sont le plus favorables, en accord avec des distributions de Maxwell-Boltzmann. Elles ont comme avantage de prendre en compte des paramètres complexes comme la désolvation et la polarisation, cependant, elles dépendent des complexes initiaux. DrugScore et GOLD/ASP sont deux exemples de fonctions statistiques.

#### ***Fonctions basées sur la mécanique moléculaire (champs de force) :***

Ces fonctions sont beaucoup plus précises, mais le calcul est beaucoup plus long. Dans les fonctions de champs de force pour le docking, on prend généralement en compte les énergies non-covalentes (vdW et électrostatiques). Les énergies de liaison du ligand, surtout l'énergie de torsion, peuvent aussi être prises en compte par certains logiciels. Un terme ajouté aux champs de force pour le docking, est celui de l'énergie de solvation. Quelques exemples de fonctions basées sur le champ de forces sont : GoldScore, AutoDock et GBVI/WSA.

Des nouvelles approches de scoring sont développées, comme des fonctions basées sur la machine-learning, les interactions fingerprints ou la mécanique quantique avec des approches QM/MM (quantum mechanics / molecular mechanics). Il semble que les méthodes de docking moléculaire se dirigent de plus en plus vers une description holistique du processus de liaison. L'utilisation de la mécanique quantique pour ceci permettrait d'éviter l'utilisation des fonctions



de scoring décrites ci-dessus qui ont comme limitation l'utilisation des approximations et simplifications (55).

#### 4. Evaluation des résultats

A la fin d'un calcul de docking, on obtient une affinité moléculaire plus ou moins précise en fonction de la fiabilité des estimations des interactions ligand-récepteur. Il est aussi possible réintroduire *a posteriori* le ligand dans la poche et vérifier si le même mode d'interaction que celui obtenu par docking est retrouvé. On peut réaliser cette procédure de « redocking » avec les ligands trouvés dans les structures cristallines. On considère alors la procédure de calcul correcte si le RMSD (root square deviation) entre l'agencement du ligand docké et celui de la structure cristalline est plus petit que 2 Å. La réussite d'un docking dépend de la protéine cible et du logiciel utilisé (9), elle dépend en effet de la qualité des interactions entre ligand et récepteur. Ceci peut être exprimé par l'efficacité du ligand (Ligand Efficiency ou LE) qui est l'énergie de liaison moyenne par atome du ligand. Le traitement des molécules d'eau, est un des problèmes de cette méthode, car il est difficile de prédire quelles molécules sont fixées dans le site de liaison du récepteur et pourront intervenir dans le processus d'interaction ligand-récepteur.

Un des problèmes majeurs du docking moléculaire est l'existence de faux positifs. Ceci dépend de la précision du calcul de l'énergie de liaison relative et donc de la bonne prédiction du mode de liaison. Une étude a comparé les hits retrouvés en utilisant le docking moléculaire et le HTS en étudiant 197861 composés contre une thiol-protéase. Ils ont retrouvé que parmi les 0,1% de composés les mieux classés selon le docking, 97,5% des hits étaient des faux positifs (57). Il existe aussi des composées appelées PAINS (pan-assay interference compounds) qui sont souvent identifiés comme des hits du, par exemple, à leur activité non-spécifique sur une protéine (58). Plusieurs méthodes ont été développées afin de faire face aux faux positifs, des exemples étant de prendre en compte la plasticité du récepteur (59), de calculer l'énergie libre de liaison (60) et l'utilisation des simulations de dynamique moléculaire (61).

### I.3.3. Applications

Le docking moléculaire a plusieurs applications dans le processus de conception d'un médicament (Figure 10). Il peut par exemple être utilisé pour le screening virtuel et l'optimisation des composés lead et hit (analyse rétrospective pour différencier les « bons » et les « mauvais » ligands). Cette technique consiste à placer virtuellement une collection de milliards de composés (issus de librairies) dans une cible biologique (protéine) et d'évaluer leur affinité. L'évaluation est effectuée par un classement des ligands (scoring) en termes d'affinité dans le complexe ligand-récepteur (9,62). Cette procédure *in silico* est intéressante car elle permet, à l'opposé de la procédure conventionnelle, l'évaluation rapide de grandes librairies de composés, ce qui permet de diminuer le nombre de composés à tester expérimentalement *in vitro*(62).

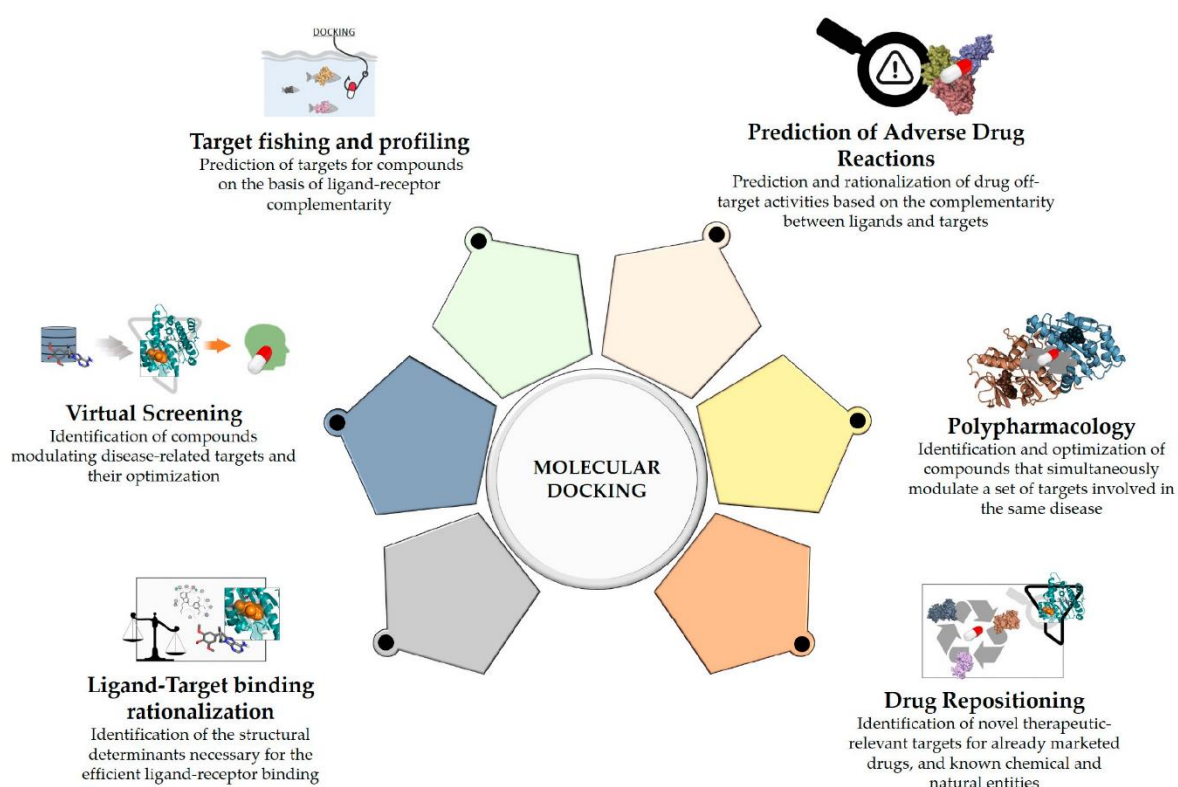


Figure 10 : Les différents domaines d'application du Docking Moléculaire dans la recherche de médicaments.

Source: Pinzi and Rastelli 2019 – Molecular Docking Shifting Paradigms in Drug Discovery

Un exemple, est l'étude des inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 par Hazuda et al. (63). Les chercheurs de cette équipe ont créé une librairie de 50 conformères de ligands (inhibiteurs), par un screening virtuel, introduits dans le site de liaison de l'enzyme. Ils ont ainsi pu déterminer quelle orientation du ligand donnerait la meilleure affinité ligand-récepteur, quel était le groupement pharmacophore responsable de l'activité inhibitrice et quels groupements pouvaient être remplacés pour améliorer cette affinité.

Un autre exemple est celui de l'aliskiren, un nouveau médicament indiqué dans le traitement de l'hypertension artérielle (64). Dans ce cas, le docking moléculaire a été utilisé pour l'optimisation des paramètres pharmacocinétiques du hit choisi (ligand-target binding

rationalisation). Wood et al. ont associé les données de cristallographie par diffraction des rayons X avec les méthodes de modélisation moléculaire pour déterminer les groupements pharmacophores, importants pour la formation du complexe ligand-récepteur et les groupements donnant au ligand les propriétés pharmacocinétiques défavorables (64). Ces données ont pu guider les chercheurs dans la modification de la structure du composé en enlevant les « mauvais » groupements et en rajoutant des groupements qui ont pu améliorer l'affinité et la sélectivité du ligand envers son récepteur (64).

## II. Le traitement du glaucome : de la connaissance de base à l'utilisation des méthodes *in silico*

---

La recherche, l'industrie et la pratique pharmaceutiques se dirigent vers une prise en charge personnalisée des patients et de leur pathologie. L'industrie pharmaceutique se focalise sur le développement de médicaments ciblés vers des populations spécifiques et non plus vers un développement dédié à une pathologie donnée. L'objectif de ces évolutions stratégiques est d'améliorer l'efficacité du traitement et de diminuer les effets indésirables. Cependant, cette approche n'a pas été pensée ainsi jusqu'à maintenant et pour la majorité des médicaments actuellement prescrits. Beaucoup d'entre eux présentent non seulement des effets secondaires mais aussi une grande variabilité interindividuelle et un grand risque d'interagir avec d'autres médicaments.

Timolol, par exemple, un  $\beta$ -bloquant non sélectif, est un médicament de choix pour le traitement de glaucome. Pourtant ce médicament a été très tôt associé à des effets indésirables systémiques : cardiovasculaires (bradycardie, décompensation d'une insuffisance cardiaque) et respiratoires (bronchospasme, dyspnée aigue) (65). Ces observations ont été confirmées par plusieurs études au cours des années et ont été associées avec une grande variabilité interindividuelle<sup>4</sup>. Cet effet a été expliqué par un statut de métaboliseur lent<sup>5</sup> chez certains patients (66–69). En effet, timolol est principalement métabolisé par le CYP2D6, une enzyme très polymorphe et qui peut aussi être inhibée par une grande partie de médicaments couramment utilisés.

Dans la deuxième partie de cette thèse, après avoir présenté la physiopathologie du glaucome et ses traitements, nous présenterons des études computationnelles ayant mis en lumière les interactions entre Timolol et CYP2D6. Nous allons évoquer à travers l'exemple du Timolol comment les études *in silico*, et notamment le docking moléculaire, pourrait faciliter l'analyse poste-autorisation de mise sur le marché d'effets indésirables, et des réponses inter-individuelles variables.

---

<sup>4</sup> La variabilité interindividuelle existe lorsque le profil pharmacocinétique d'un médicament varie beaucoup d'un sujet à l'autre

<sup>5</sup> Un métaboliseur lent est caractérisé par une population de patients qui, du a un polymorphisme génétique au niveau du gène responsable de l'enzyme du métabolisme d'un médicament donné, va métaboliser ce médicament de manière plus lente. Ceci, va causer une augmentation de la demi-vie d'élimination du médicament dans l'organisme et donc une augmentation de ses effets indésirables.

## II.1. Le Glaucome et les médicaments anti-glaucomeux

L'enquête Handicaps-Incapacités-Dépendance (HID) de 2005 nous a appris qu'environ 1 700 000 personnes, soit 2,9% de la population, vivent avec une déficience visuelle en France (70). Au niveau mondial, au moins 2,2 milliards de personnes auraient une déficience visuelle d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le National Eye Institute (71,72). Ce nombre est amené à augmenter dans la prochaine décennie, suivant une tendance à l'augmentation de l'incidence des affections oculaires. Une telle affection oculaire est le glaucome et c'est une maladie chronique qui touche principalement les personnes âgées (73,74). Par exemple au Danemark, 3,76% des personnes de plus de 50 ans et 10% des personnes de plus de 80 ans sont traitées pour cette affection (75).

### II.1.1. La physiopathologie du glaucome

Le glaucome est une neuropathie optique. Il existe deux types majeurs : le glaucome primaire à angle-ouvert et le glaucome à angle-fermé<sup>6</sup> (77). La différence entre les deux se trouve à l'ouverture de l'angle de drainage. Comme représenté à la Figure 11, cet angle est formé par la jonction entre le corps ciliaire et l'iris et définit la région de l'œil où se trouve le système de drainage de l'humeur aqueuse, appelé réseau trabéculaire. Le glaucome à angle fermé est une situation rare est c'est une urgence médicale causée par la fermeture totale de l'angle de drainage (77).

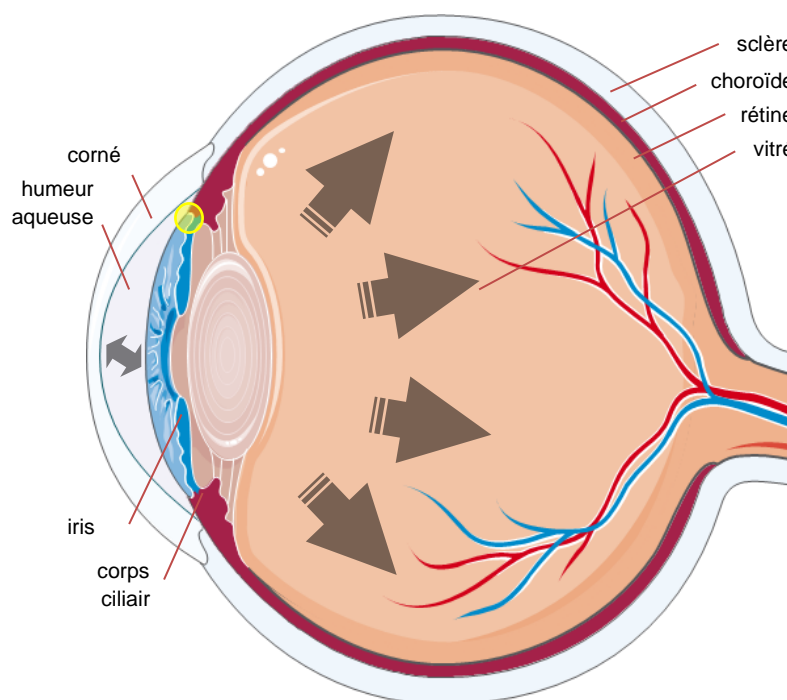


Figure 11 : L'œil et le développement du glaucome chronique à angle ouvert. Les flèches grises représentent la pression intra oculaire. Entouré en jaune, l'angle de drainage.

Source : *Source des images originales Servier Medical Art*

<sup>6</sup> Il existe d'autres types de glaucome plus rares, comme les glaucomes normotensif, congénital, pigmentaire, pseudoexfoliatif et le glaucome secondaire médicamenteux (76).

Le glaucome primaire à angle ouvert est une maladie chronique et progressive, caractérisée par une augmentation progressive de la pression intraoculaire causant la destruction progressive du nerf optique. Ce caractère progressif et la capacité du cerveau à « masquer » les premiers signes de perte de vue font que la maladie est souvent silencieuse et diagnostiquée très tardivement. Il est important de noter que l'augmentation de la pression intraoculaire étant juste un symptôme de la maladie, la cause du glaucome primaire à angle ouverte n'a pas encore été identifiée. C'est pour ceci que tous les traitements médicamenteux actuels sont juste symptomatiques et ciblent la pression intraoculaire.

### II.1.2. Les médicaments anti-glaucomeux

Le traitement du glaucome est chronique et dans 75% des cas il consiste en une association de plusieurs médicaments. Il existe cinq classes pharmacologiques de médicaments autorisées par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) et/ou la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement du glaucome chronique. Comme indiqué au paragraphe précédent, tous ces médicaments ciblent la pression intraoculaire mais ont des mécanismes un peu différents, comme présenté au Tableau 4. Les  $\beta$ -bloquants et les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique diminuent la production de l'humeur aqueuse alors que la Pilocarpine et les analogues de la prostaglandine augmentent l'excrétion de l'humeur aqueuse. Les netarsudil et brimonidine ont un double mode d'action en diminuant la production de l'humeur aqueuse et en augmentant son excrétion.

Un des premiers médicaments indiqués dans le traitement du glaucome est la pilocarpine. Cependant, à cause des nombreux effets indésirables aussi bien oculaires que systémiques, elle n'est actuellement utilisée que comme traitement de dernière ligne en combinaison avec le timolol (78–81). Les deux classes pharmacologiques les plus utilisées actuellement sont les  $\beta$ -bloquants et les analogues de la prostaglandine, le Timolol étant le médicament de référence, utilisé soit seul, soit en association. En revanche, les  $\beta$ -bloquants, et en particulier le timolol, ont été associés à des effets indésirables systémiques importants causés par l'inhibition des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  retrouvés au niveau des appareils cardiovasculaire, respiratoire et rénal, au niveau du système nerveux central et autres tissus (récepteurs  $\beta_3$ )<sup>7</sup> (65,84–87). De plus, cette classe pharmacologique est caractérisée par une grande variabilité interindividuelle. En effet, des études et l'utilisation courante de ces médicaments ont montré que l'apparition d'effets indésirables systémiques et leur gravité sont très variables d'un patient à l'autre (66–68). Au contraire des  $\beta$ -bloquants, les analogues de la prostaglandine sont généralement bien tolérés, avec seulement quelques effets indésirables oculaires, cependant leur efficacité est variable d'un patient à l'autre<sup>8</sup> (90–97). En deuxième ligne de traitement, le choix est souvent fait entre la brimonidine ou les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, brinzolamide et dorzolamide (98–100)<sup>9</sup>. A noter qu'il existe des associations fixes entre timolol-

---

<sup>7</sup> Les bétaxolol et cartéolol, inhibiteurs sélectifs des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta$ -bloquant à activité sympathomimétique intrinsèque respectivement, ont été développés afin de diminuer les effets secondaires systémiques des  $\beta$ -bloquants (82,83).

<sup>8</sup> Il a été observé que les patients non-répondeurs au Latanoprost, molécule chef de file des analogues de la prostaglandine, sont bien traités par Bimatoprost (88,89).

<sup>9</sup> L'acétazolamide a été le premier médicament de la classe des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique commercialisé pour cette indication, pris par voie orale. Cependant à cause des nombreux effets indésirables, ce médicament est actuellement rarement utilisé et a été remplacé par des gouttes ophtalmiques de brinzolamide ou dorzolamide.

dorzolamide, timolol-brinzolamide, timolol-brimonidine et brimonidine-dorzolamide. Enfin, le netarsudil est un nouveau médicament qui n'a, jusqu'à maintenant, obtenu l'autorisation de mise sur le marché que par la FDA. Il est indiqué pour le traitement du glaucome chronique à angle ouvert soit en monothérapie, soit en association avec le latanoprost.

Le traitement du glaucome a un impact notable dans la qualité de vie des patients, d'un côté puisqu'il s'agit d'un traitement quotidien, biquotidien ou même tri-quotidien, et d'un autre côté car il s'agit souvent d'une association de plusieurs médicaments (75). Il est ainsi important de faire un choix rationnel des médicaments, de la voie d'administration, de la prise en charge, ainsi que de mettre en place un suivi personnalisé (101). Le résultat thérapeutique dépend de plusieurs facteurs comme l'âge, le sexe, les facteurs génétiques, les comorbidités, le mode de vie ainsi que les traitements concomitants du patient. Il est important de noter que la population affectée par cette maladie est une population souvent polymédicamentée, ce qui augmente le risque d'apparition d'interactions médicamenteuses. Comme expliqué par la suite, bien que topiques (gouttes ophtalmiques), les médicaments pour le glaucome peuvent aussi être retrouvés dans la circulation sanguine, causant ainsi des effets indésirables à ce niveau-là ou pouvant interagir avec des médicaments pris par voie systémique (102).

Les interactions médicamenteuses peuvent être classées en termes de pharmacodynamie ou pharmacocinétique<sup>10</sup>. Les interactions pharmacodynamiques impliquant les médicaments du glaucome sont bien documentées, mentionnées dans la notice et prises en compte lors de la mise en place du traitement. Cependant, les interactions de nature pharmacocinétique ne sont souvent que peu connues. Les interactions pharmacocinétiques les plus courantes sont soit au niveau de la distribution (compétition au niveau de la liaison aux protéines), soit au niveau du métabolisme (inhibition/induction d'une enzyme du métabolisme ou compétition au niveau de son site d'action) (103,104).

---

<sup>10</sup> A noter qu'il existe aussi des interactions pharmacogénétiques qui sont définies par une altération de l'expression du gène responsable de la production du récepteur d'un médicament donné par un autre médicament. Ces interactions n'ont pas été documentées pour les médicaments anti-glaucomeux.

Tableau 4 : Les médicaments anti-glaucomeux et leur mécanisme d'action

Classe pharmacologique	Mode d'action	Nom	Ref
<b>B-bloquants</b>	Inhibition de la stimulation $\beta$ -adrénergique de la synthèse de l'AMP cyclique nécessaire pour la production de l'humeur aqueuse.	Betaxolol Timolol Lévobunolol Cartéolol	(84)
<b>Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique</b>	Inhibition de l'anhydrase carbonique II (CA-II) causant la diminution de la production de l'humeur aqueuse au segment antérieur et la diminution du débit sanguin au segment postérieur de l'œil.	Acétazolamide Dorzolamide Brinzolamide	(99,105)
<b>Inhibiteur de la Rho-kinase</b>	Inhibition de ROCK1 et ROCK2 causant la relaxation des muscles ciliaires et l'ouverture du réseau trabéculaire.  Inhibition du transporteur NET causant une augmentation des taux de norépinephrine dans l'œil, ce qui diminue la sécrétion de l'humeur aqueuse et diminue la pression veineuse épisclérale.	Netarsudil	(106, 107)
<b>Parasympathomimétiques</b>	A2-agoniste : stimulation sélective des récepteurs adrénergiques $\alpha_2$ , causant la diminution de la production de l'humeur aqueuse et l'augmentation de son élimination <i>via</i> le réseau uveoscléral.	Brimonidine	(108)
	Stimulation de la contraction du sphincter de l'iris causant une myose, ce qui qui facilite l'élimination de l'humeur aqueuse <i>via</i> le réseau trabéculaire	Pilocarpine	(78–81)
<b>Analogues de la prostaglandine</b>	Stimulation du récepteur F des prostaglandines (FP) causant l'augmentation de l'élimination de l'humeur aqueuse à travers les réseaux trabéculaire et/ou uveoscléral.  <i>Bimatoprost : analogue synthétique de prostamides à activité hypotensive oculaire intrinsèque.</i>	Bimatoprost Latanoprost Tafluprost Travoprost	(109–112)



## II.2. Pharmacocinétique des médicaments anti-glaucomeux

Une étape primordiale avant de commencer l'analyse de l'efficacité, des potentielles interactions médicamenteuses ou des effets indésirables des médicaments des pathologies oculaires, est l'étude des propriétés pharmacocinétiques de l'œil. La pharmacocinétique est la science qui étudie le devenir du médicament dans l'organisme, depuis son absorption (au niveau du site d'administration) à son élimination, en passant par sa distribution dans les différents tissus (tissus cibles ou non) et son métabolisme (biotransformation). Du fait de ses particularités tissulaires, l'œil est un des organes les plus difficiles à étudier d'un point de vue pharmacocinétique. Les

Figure 12 et Figure 13 représentent de manière schématique les différents parcours qu'une molécule peut suivre dans l'organisme une fois administrée au niveau de l'œil.

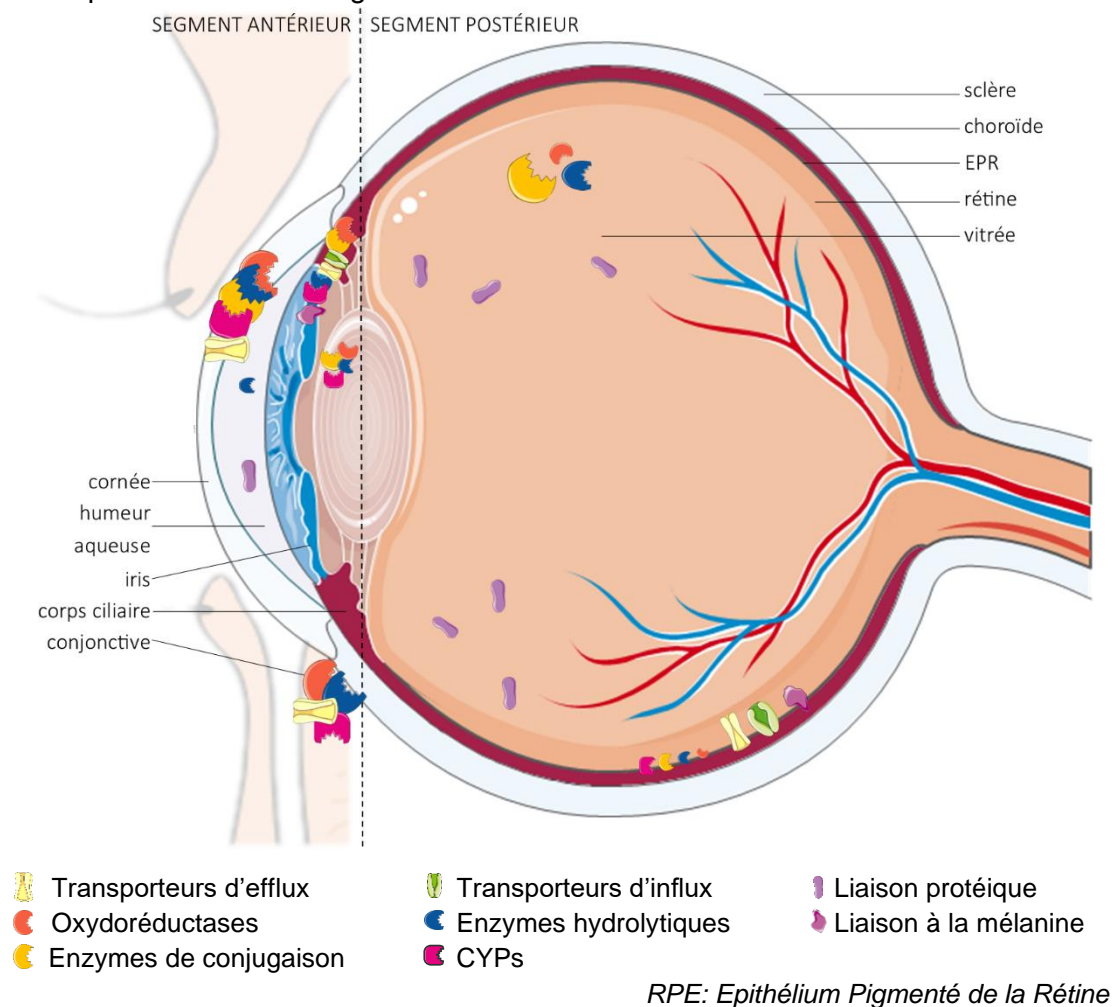


Figure 12 : Représentation schématique des propriétés pharmacocinétiques de l'œil

Source : Source des images originales Servier Medical Art

## II.2.1. Etapes ADME

### 1. Absorption

Très souvent un médicament prescrit pour une pathologie donnée est plus efficace s'il est administré directement au niveau de l'organe cible, ce qui est particulièrement vrai pour l'œil. Pour un traitement encore plus ciblé, il est aussi possible de choisir en fonction de la pathologie quel segment de l'œil doit être ciblé, comme les segments antérieur ou postérieur. Différentes voies d'administration sont ainsi disponibles pour chaque segment, par exemple les voies topique, intra-camellaire et sub-conjonctivale sont des voies d'administration pour le segment antérieur, alors que les voies intra-vitréale, périoculaire, supra-choroïdale et sub-rétinale ciblent le segment postérieur (113,114). Dans certaines situations, la voie systémique peut être utilisée, souvent en association avec un traitement topique (113,114). Cependant, pour le traitement du glaucome chronique, la voie d'administration choisie est la voie topique (utilisation de gouttes ophtalmiques). Cette voie est la plus adaptée pour le patient (115).

Une fois administrée au niveau de l'œil, la goutte ophtalmique doit franchir plusieurs étapes avant que le principe actif ne soit absorbé au segment antérieur de l'œil, c'est-à-dire au niveau de son site d'action. Ces différentes étapes peuvent diminuer la biodisponibilité du médicament jusqu'à 5-10%. L'absorption du médicament au niveau du segment antérieur dépend ainsi :

- de barrières mécaniques : perte à l'application des gouttes, filtration au niveau des différentes couches de tissus de l'œil (116)
- de propriétés physicochimiques (poids moléculaire, charge ionique, lipophilicité) (116)
- du métabolisme primaire (first pass metabolism) (116).

Une partie considérable de la quantité de médicament administrée est perdue directement après administration à cause des facteurs appelés pré-cornéens (pre-corneal) (115). Ces facteurs incluent le drainage de l'humeur aqueuse, le clignement des yeux, le film lacrymal et les larmes (115). D'autres facteurs comme la formulation des gouttes : la concentration et la taille des gouttes peuvent aussi influencer l'absorption du médicament au niveau de la cornée. En effet, d'un côté le type de formulation (aqueuse ou visqueuse) peut influencer la vitesse d'absorption, et d'un autre côté, la taille de la goutte peut-être un facteur limitant car la capacité maximale du cul-de-sac de l'œil est de 30 $\mu$ L. Comme il va être expliqué au paragraphe suivant, le passage du médicament à travers les différentes couches de l'œil (cornée, conjonctive, sclère) dépend de ses propriétés physicochimiques. De plus, les enzymes du métabolisme sont fortement exprimées au niveau des tissus de l'œil antérieur comme la cornée, la conjonctive, l'iris et le corps ciliaire (cf. Figure 12) et peuvent considérablement influencer l'absorption du médicament (117–119). Un dernier facteur très important est le fort drainage sanguin et lymphatique de la conjonctive et la sclère qui causent une perte/redistribution directe du médicament au niveau de la circulation systémique (114,120). Différentes approches de conception du médicament ont été développées pour maîtriser ces paramètres comme le développement de prodrogues qui mettent en faveur les enzymes du métabolisme primaire pour améliorer l'absorption de certaines molécules qui allaient sinon être dégradées avant d'être absorbées. En outre, plusieurs équipes de recherche sont actuellement en train de développer des formulations innovantes pour améliorer l'efficacité de l'administration topique ophtalmique avec l'utilisation de nano micelles, de nano suspensions et de lentilles de contact (113).

## 2. Distribution

Un traitement peut être efficace seulement si une concentration suffisante du médicament arrive au niveau du site d'action et y reste un temps suffisant, c'est la distribution du médicament. De plus, un médicament avec des propriétés pharmacocinétiques de distribution idéales devrait avoir une concentration maximale et spécifique au niveau du site d'action et une distribution nulle au niveau des autres tissus de l'organisme pour éviter les effets secondaires. La distribution d'un médicament dépend de ses propriétés physicochimiques (en particulier taille et charge) qui vont notamment impacter sur sa capacité à diffuser à travers les barrières statiques, à se fixer aux différents tissus (lipophilie), à passer les barrières physiques, et à se lier aux protéines et notamment les transporteurs.

### **Barrières statiques :**

Pour arriver au niveau du segment antérieur, un médicament peut soit traverser la cornée pour se retrouver au niveau de l'humeur aqueuse, soit traverser la conjonctive et la sclère. Les différentes couches de la cornée filtrent surtout les molécules larges (ex. protéines) alors que la sclère retient surtout les molécules chargées positivement (115). Les molécules dissoutes, de petite taille, neutres ou anioniques ont une meilleure diffusion dans l'humeur aqueuse que les molécules de grande taille ou cationiques. Quant à la distribution au niveau du segment postérieur, les molécules chargées positivement ont tendance à s'agréger au niveau de l'humeur vitré en se liant avec ses composants chargés négativement comme les hyaluronanes (114,115). Une très faible quantité de médicament peut être aussi redistribuée du segment postérieur au segment antérieur de l'œil en passant de l'humeur vitrée à l'humeur aqueuse.

### **Transporteurs :**

Les transporteurs ont un rôle majeur dans la distribution d'un médicament. En effet, le transport actif est une voie alternative pour la perméation des médicaments à travers les différentes membranes. Les transporteurs d'influx peuvent faciliter la distribution (entrée) du médicament au niveau de sa cible, alors que les transporteurs d'efflux limitent la concentration du médicament et possiblement de ses métabolites au niveau de la cible. Les transporteurs d'influx appartiennent majoritairement à la famille « solute carrier cassette » (SLC) alors que les transporteurs d'efflux appartiennent à la famille « ATP-binding cassette » (ABC). Des transcrits ARN de transporteurs ont été mesurés sur plusieurs tissus de l'œil, avec une expression plus importante au niveau de la rétine et de la cornée (121). L'expression protéique de certains transporteurs a aussi été mesurée chez certains tissus ophtalmiques animaux, cependant des différences ont été observées entre animaux (122). Chez l'humain, l'expression des transporteurs MRP4, BCRP, MRD1, MRD2 et MRD5 de la famille ABC a été identifiée au niveau des tissus de la cornée et de la conjonctive. Toutefois, des expériences de simulation de l'absorption médicamenteuse au niveau de la cornée ont montré que le transport actif avait un rôle minime et non significatif (122). Deux autres tissus humains qui expriment des transporteurs d'efflux et d'influx sont la barrière hémato-aqueuse (blood-aqueous barrier, BAB), située au niveau de l'iris-corps ciliaires, et la barrière hémato-rétinale (blood-rétinal barrier, BRB), située entre la rétine neurale et la choroïde. Le rôle physiologique des transporteurs au niveau des barrières sanguines est la protection de l'œil vis-à-vis de l'entrée de xénobiotiques dans l'œil à partir de la circulation systémique (114). Les transporteurs d'efflux ont donc une implication très importante au niveau de ces tissus. Les transporteurs ABC (P-gp, BCRP, MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6 ou MRP7) contribuent fortement à l'élimination des médicaments vers la circulation systémique alors que les

transporteurs d'influx (OATP1A2, OCT2 ; OCT3 ; Mate, OAT2, MCT1, MCT3, MCT4) facilitent l'entrée de nutriments et autres molécules nécessaires (122). Plusieurs études sont actuellement effectuées sur la conception de médicaments en ciblant un mécanisme de transport-facilité grâce à des transporteurs d'influx (targeting uptake transporter-enhanced systemic drug delivery).

#### ***Liaison aux protéines et à la mélanine :***

La liaison aux protéines est un autre paramètre qui doit être considéré quand on étudie la pharmacocinétique d'un médicament. En effet, seule la partie libre peut être distribuée au niveau du site actif pour exercer l'action thérapeutique. De plus, la liaison aux protéines peut prolonger la demi-vie d'un médicament dans les tissus où la protéine est exprimée, et dans le cas d'une administration chronique, ceci peut causer une accumulation du médicament dans les tissus considérés ainsi que des effets toxiques. Bien que l'œil soit un organe exprimant beaucoup de protéines, des études de liaison protéine-médicament n'ont pas encore été effectuées. Théoriquement, une liaison protéique peut exister au niveau de tous les tissus de l'œil, même au niveau du film lacrymal (71,79). Une des protéines les plus importantes est la mélanine car elle a un rôle biologique indispensable pour l'œil (71,79). La mélanine est fortement exprimée au niveau de l'épithélium pigmenté de l'iris et de la rétine. Ainsi une liaison à la mélanine après administration topique et systémique d'un médicament pourrait influencer la distribution de celui-ci au niveau des autres tissus ophtalmiques (71,79).

### **3. Métabolisme**

La troisième étape critique déterminant l'avenir d'un médicament dans l'organisme est le métabolisme. Celui-ci est non seulement l'étape primordiale avant l'élimination pour une grande majorité des médicaments, mais dans certaines situations, il peut être aussi à l'origine des différences interindividuelles au niveau de la biodisponibilité du médicament (métaboliseurs lents, rapides, ultrarapides) ou même des effets toxiques (métabolites actifs toxiques, interactions médicamenteuses...) (114,118). Les enzymes du métabolisme de médicaments (drug metabolising enzymes DMEs) sont largement exprimées au niveau des tissus oculaires. De plus, les tissus du segment antérieur (cornée, conjonctive, iris, corps ciliaire) ont une activité métabolique beaucoup plus importante que les tissus du segment postérieur (114,118). Comme expliqué précédemment, les connaissances sur les enzymes du métabolisme ont abouti à la conception guidée de médicaments-prodrogues qui ciblent ces enzymes pour améliorer les propriétés physicochimiques du médicament et leur activité (123).

#### ***Méthodes de conception du médicament basées sur le métabolisme :***

La grande activité métabolique de l'œil a intéressé les chercheurs de chimie médicale qui ont rapidement pensé à l'utiliser pour le développement de médicaments afin d'améliorer la biodisponibilité des médicaments (118). Parmi les méthodes de conception les plus répandues, on peut citer celles basées sur les prodrogues et les codrogues. Le médicament administré par une de ces approches est inactif et une fois au contact des enzymes de l'œil, il est biotransformé (métabolisé) en substance(s) active(s). Quelques exemples de prodrogues sont les esters de l'acide-pilocarpique, les esters de la prostaglandine- $F_{2\alpha}$ , les dérivés oxime- et methoxime- des bétaxolol et timolol et les dérivés d'oxyde nitrique de dorzolamide et brinzolamide (124). La conception de codrogues a été principalement développée afin de faciliter l'administration de plusieurs médicaments souvent prescrits ensemble pour le traitement du glaucome. Dans ce cas-là, les deux principes actifs sont associés par un agent de liaison (molécule-linker) qui est destiné à être métabolisé par les enzymes de l'œil. Des

équipes de recherche sont en train de développer des codrogues pour l'association de netarsudil avec des bêtabloquants ou pour l'association de bêtabloquants avec des analogues de prostaglandine (118,125).

#### ***L'expression oculaire de DMEs :***

Plusieurs revues de la littérature se sont intéressées à l'expression d'enzymes du métabolisme au niveau des tissus oculaires et les informations décrites sont regroupées dans le Tableau 4 (116–118,123,124,126,127). Il est intéressant de mentionner que la majorité des recherches ont été effectuées *in vitro*, soit au niveau des extraits de tissus humains, soit de tissus animaux. Cependant, il n'existe pas de corrélation cohérente entre les différentes espèces animales, et l'expression tissulaire d'une enzyme ne signifie pas nécessairement une activité biologique importante. Les limitations décrites ci-dessus, doivent ainsi être prises en compte quand on étudie l'importance du métabolisme oculaire sur le devenir du médicament dans l'organisme. Enfin, une modification de l'activité enzymatique oculaire a été associée avec différentes maladies de l'œil comme le glaucome primaire, les rétinopathies et la maladie de Biettis (121). Cette association a rendu les enzymes associées avec ces maladies très intéressantes pour l'étude de ces pathologies, soit pour comprendre leur rôle dans le développement de la maladie, soit pour étudier leur utilisation potentielle comme cibles thérapeutiques (121).

#### **4. Excrétion**

##### ***Excrétion au niveau de l'œil :***

Dépendant du tissu oculaire où il se trouve, le médicament peut suivre différentes voies d'élimination. Les voies générales étant l'élimination avec le renouvellement de l'humeur aqueuse/vitreuse et l'élimination au niveau de la circulation sanguine. Presque 80% de la quantité de médicament administré par voie topique au niveau de l'œil est éliminée directement lors de l'administration. Cette perte considérable est expliquée d'un côté par le renouvellement de l'humeur aqueuse et la capacité du cul-de-sac de l'œil, mais aussi par le passage du médicament au niveau du canal-lacrymo-nasal (116). A partir du segment antérieur, le médicament peut être éliminé avec le renouvellement de l'humeur aqueuse ou/et avec le flux sanguin de l'uvée (120). Ces voies d'élimination existent pour les médicaments retrouvés au niveau du segment postérieur, cependant, la voie d'élimination principale pour cette partie de l'œil est le flux sanguin de la choroïde. Cette voie d'élimination est plus convenable pour des molécules petites et lipophiles, alors que les macromolécules et molécules hydrophiles sont plutôt éliminées par le renouvellement de l'humeur aqueuse (114,116). En effet, le facteur déterminant pour qu'un médicament soit éliminé par la voie choroïdale est la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne. Si le médicament peut diffuser à travers cette barrière, il va se retrouver au niveau du flux sanguin de la choroïde. Il est aussi important de prendre en compte le transport actif à travers cette barrière car il y a une forte expression de transporteurs au niveau de la barrière hémato-rétinienne, comme au niveau de la barrière hémato-aqueuse. Enfin, la liaison à la mélanine, comme expliqué précédemment peut aussi retarder l'élimination des médicaments (114).

##### ***Passage au niveau de la circulation sanguine systémique :***

Il existe deux voies majeures par lesquelles les médicaments administrés au niveau de l'œil peuvent arriver à la circulation sanguine systémique : soit par les capillaires sanguins du nez ou de la peau des joues, soit par le flux sanguin de l'uvée ou de la choroïde. La deuxième voie est une voie qui lie les médicaments retrouvés dans l'œil directement à la circulation systémique, alors que la première est la voie avec laquelle arrive la partie du médicament

éliminée par l'humeur aqueuse. A partir de la circulation sanguine systémique, le médicament peut diffuser à d'autres tissus et causer des effets secondaires en fonction de ses propriétés physicochimiques. Il peut aussi interagir avec des médicaments retrouvés au niveau systémique par des interactions pharmacodynamiques ou pharmacocinétiques.

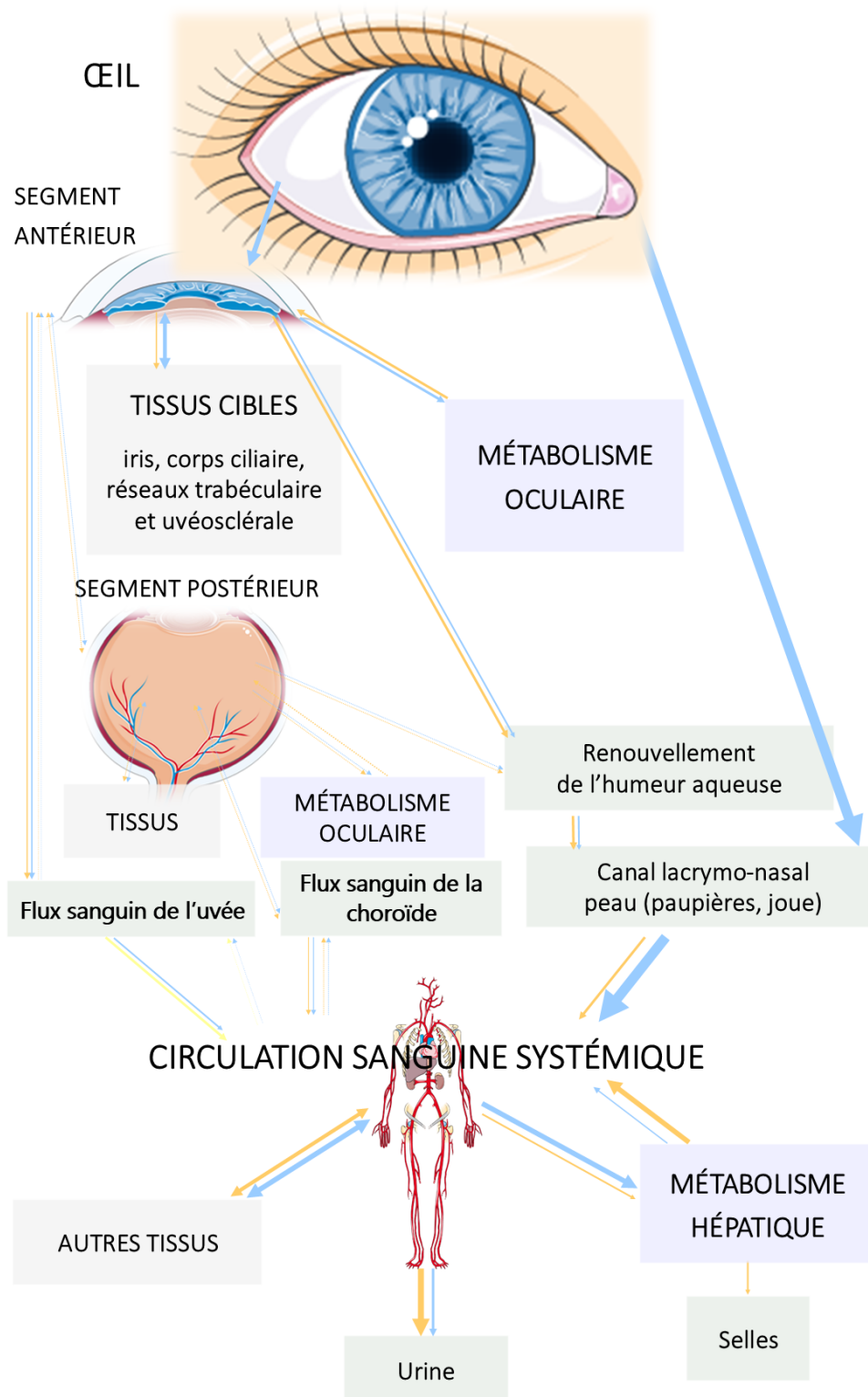


Figure 13 : Représentation schématique des différentes trajectoires que le principe actif peut prendre pour se retrouver au niveau systémique. Flèches bleues : le principe actif ; flèches jaunes métabolite(s) ; épaisseur des flèches : concentration relative

Source : *Source des images originales Servier Medical Art*

## II.2.2. Métabolisme et potentielles interactions médicamenteuses

La Figure 14 représente la participation relative des différentes DMEs dans le métabolisme des médicaments utilisés par voie topique pour le traitement des affections de l'œil. Les DMEs impliquées dans le métabolisme des médicaments anti-glaucomeux sont données et leur expression au niveau des tissus oculaires dans les Tableau 5 et Tableau 6 respectivement. Le Tableau 8 regroupe les médicaments les plus couramment utilisés qui modifient l'activité (inhibition ou induction) ou sont substrats des enzymes impliqués dans le métabolisme des  $\beta$ -bloquants.

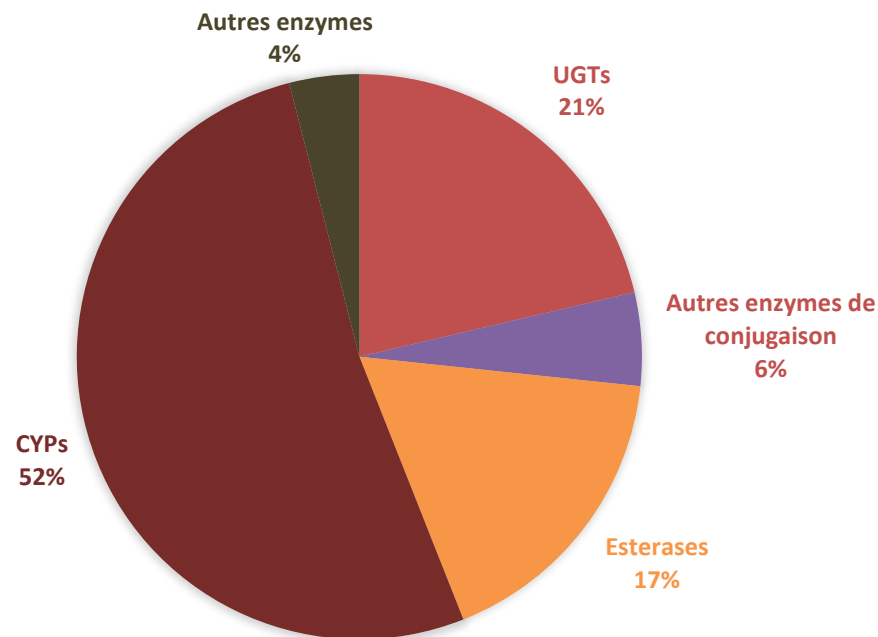


Figure 14 : Implication relative des différentes enzymes du métabolisme dans le métabolisme des médicaments de l'œil. Autres enzymes : cétone réductase, monoamine oxydase, aldéhyde oxydase. Autres enzymes de conjugaison : sulfo-transférases, acétyltransférases, méthyltransférases.

Source : La figure est le résultat d'une étude bibliographique effectuée sur les différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des 57 médicaments les plus prescrits pour les pathologies oculaires. (Annexe 1)

### 1. Cytochromes P450 (CYPs)

Les cytochromes P450 (CYPs) constituent la principale famille d'enzymes responsables du métabolisme des médicaments ; elles sont responsables du métabolisme de plus de 80% des médicaments connus. Ces enzymes sont en effet des monooxygénases qui contiennent dans leur cavité active un groupement hémique qui peut catalyser des réactions comme des oxydations aliphatiques et aromatiques, ou encore des oxydations des hétéroatomes et des N-, O- et S- déalkylations (128). Le « Human Genome Project » a permis d'identifier 57 CYPs et les a classés en 18 familles et 44 sous-familles. Seules les familles CYP1, CYP2 et CYP3 sont considérées comme étant les plus importantes pour le métabolisme des xénobiotiques (129). Parmi les différents CYPs les plus étudiés et les plus impliqués dans le métabolisme des médicaments, on retrouve les CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 et CYP2C19 (129). La plupart des CYPs peuvent métaboliser plusieurs médicaments et, de même, un

médicament peut être métabolisé par plusieurs CYPs ou peut moduler (inhiber/induire) plusieurs CYPs. Par conséquent, la compétition des médicaments pour une même enzyme et la modulation enzymatique par un médicament co-prescrit sont deux facteurs importants causant une variabilité interindividuelle dans l'efficacité thérapeutique et l'apparition d'effets indésirables chez les patients traités par des médicaments substrats des CYPs. En outre, certaines de ces enzymes (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9) sont très polymorphiques, ce qui peut causer une grande variabilité interindividuelle en termes d'expression et d'activité. En effet, ces polymorphismes génétiques peuvent engendrer des phénotypes de métaboliseurs ultra-rapides, extensives, intermédiaires ou lents. Un phénotype de métaboliseur ultra-rapide peut se traduire par une inefficacité du traitement ou par une toxicité de celui-ci si les métabolites sont toxiques. Au contraire, un phénotype de métaboliseur lent peut s'exprimer par une toxicité du médicament et un plus grand risque d'apparition d'effets indésirables.

### ***β-bloquants :***

Comme présenté dans le Tableau 5, les CYPs et plus particulièrement le CYP2D6 jouent un rôle majeur dans le métabolisme des β-bloquants. L'inhibition du CYP2D6 par des médicaments concomitants et les polymorphismes au niveau du gène du CYP2D6 ont été associés au développement d'effets indésirables systémiques et à la forte variabilité interindividuelle du timolol (66–68). Il a été montré que les patients métaboliseurs lents pour le CYP2D6 sont d'avantage sensibles au traitement par β-bloquants (timolol, bétaxolol, cartéolol) et ont plus de risques de développer des effets indésirables systémiques (69,130–132). En prenant en compte l'incidence globale du phénotype de métaboliseur lent, le nombre de médicaments inhibiteurs de cette enzyme et la polymédication relative à l'âge, les patients souffrant de glaucome ont un risque significatif de développer des effets indésirables systémiques.

### ***Pilocarpine :***

Un autre médicament du glaucome associé aux CYPs est la pilocarpine. Selon des études sur son métabolisme hépatique, elle est substrat et inhibiteur du CYP2A6. Cette enzyme a aussi été identifiée au niveau de tissus oculaires (cornée, iris, corps ciliaire, rétine, choroïde), cependant l'implication de cette enzyme dans le métabolisme oculaire de la pilocarpine n'a pas encore été étudié (133). Prenant en compte le profil hautement polymorphique de cette enzyme et l'index thérapeutique étroit de la pilocarpine, des études sur l'implication de cette enzyme au métabolisme oculaire du médicament seraient intéressantes (134).

### ***Bimatoprost, Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique :***

Selon la littérature, les CYPs sont aussi impliquées dans le métabolisme du bimatoprost et des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, mais leur implication reste minime. Selon Krauss et Woodward, bimatoprost a une stabilité métabolique excellente (91,135–137). Il a un métabolite actif (17-phenyl PGF<sub>2α</sub>) qui est le produit d'une hydrolyse acide mais qui est produit en quantité minime aussi bien au niveau oculaire que systémique et qui est ainsi considéré comme n'ayant pas d'effet pharmacologique (138,139). Selon le résumé des caractéristiques du produit, le bimatoprost est l'espèce chimique qui se retrouve en majorité au niveau de la circulation sanguine et qui est en majorité éliminée sous sa forme active ou peut aussi être soumise à des réactions d'oxydation, N-deethylation et glucuronidation au niveau du foie. Des études *in vitro* sur des isoenzymes P450 humains recombinants ont montré que l'enzyme



responsable des réactions d'oxydation et de N-deethylation est CYP3A4, néanmoins sa contribution dans l'élimination globale du médicament est mineure.

En ce qui concerne les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, ils sont éliminés principalement sous forme inchangée, alors qu'une autre partie est métabolisée par les CYPs avant d'être éliminée (140,141). Cependant, les médicaments-parents et leurs métabolites (N-desethyl-métabolites) ont une activité additive, les premiers étant des inhibiteurs de l'isoenzyme CA-II et les deuxièmes étant des inhibiteurs de la CA-I. De même que les médicaments parents, les métabolites ont une demi-vie longue. Ils peuvent ainsi et en cas de prise chronique s'accumuler au niveau des tissus exprimant les anhydrases carboniques (yeux, érythrocytes, foie, reins, rate, estomac, pancréas, intestin, poumons, glandes salivaires, CNS) (140,142–146). Par leur activité additive au niveau des deux isoenzymes de l'anhydrase carbonique, des effets indésirables dus à l'action synergique du médicament parent et des métabolites peuvent potentiellement être observés. De telles situations n'ont pas été documentées, mais des cas d'apparition d'effets indésirables sévères causés par une accumulation de la brimonidine au niveau des érythrocytes et des reins ont été observés surtout chez des patients ayant des comorbidités comme une insuffisance rénale ou hépatique (141). De plus, l'acétazolamide, pris par voie orale, a été associé avec des effets indésirables sévères dus à une acidose métabolique causée par une saturation complète des isoenzymes de l'anhydrase carbonique au niveau des érythrocytes (99,141). C'est pourquoi, les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique sont aussi contre-indiqués avec les inhibiteurs des CYP3A4 (140).

## 2. Estérases

Les estérases sont la deuxième famille enzymatique la plus importante d'enzymes responsables des réactions de phase I du métabolisme de médicaments. Elles sont impliquées dans la détoxification de drogues (cocaïne, héroïne, codéine) mais aussi dans l'activation de prodrogues (valacyclovir, valgancyclovir, clopidogrel, prasugrel, dabigatran, ramipril etc.) (147). Comme présenté dans le Tableau 8, non seulement elles contribuent au métabolisme de 10% des médicaments contenant un groupement ester-, amide- et thioester-, mais aussi des inhibiteurs puissants ont aussi été identifiés (148–150). De plus, ces enzymes, spécialement les carboxylestérases, sont susceptibles de présenter des polymorphismes génétiques causant une variabilité interindividuelle cliniquement significative (151). Les estérases sont responsables de la bio-activation des analogues de la prostaglandine, du netarsudil et de la pilocarpine.

### ***Analogues de la prostaglandine :***

En ce qui concerne les latanoprost, travoprost et tafluprost, du fait de leur métabolisme hépatique rapide, de leur demi-vie courte, de leur faible concentration systémique et de leur bonne tolérance systémique, le risque que ces médicaments participent à des interactions médicamenteuses métaboliques impliquant les estérases est très faible. Une fois au niveau de la cornée, ils sont rapidement hydrolysés en entités actives (acides carboxyliques). Cette réaction peut aussi être catalysée par les estérases du plasma et est suivie par une clairance plasmatique rapide. Les acides carboxyliques de ces médicaments sont rapidement métabolisés au niveau hépatique par une réaction de  $\beta$ -oxydation suivie d'une glucuronidation. Il est à noter que des situations d'absence de bio-activation des médicaments causée par un polymorphisme génétique de métaboliseur lent/non métaboliseur pourraient théoriquement être observées. De telles situations pourraient expliquer pourquoi des patients non-répondeurs

aux analogues de la prostaglandine (latanoprost, travoprost, tafluprost) sont bien traités par le bimatoprost (152).

#### **Netarsudil :**

Le netarsudil est rapidement absorbé au niveau de la cornée où il est métabolisé par des estérases en un métabolite qui est 5 fois plus actif envers les récepteurs ROCK. Une très faible exposition systémique a été observée aussi bien pour le médicament parent que pour son métabolite actif, ainsi, aucune étude de pharmacocinétique au niveau systémique n'a encore été effectuée. En outre, au niveau de la littérature il n'y a encore eu aucune mention d'effets indésirables systémiques de ce médicament (153–155). En revanche, les inhibiteurs de la rho-kinase administrés par voie systémique ont des effets indésirables au niveau systémique, surtout au niveau de la pression artérielle et du rythme cardiaque.

### **3. Aldéhyde oxydase**

L'aldéhyde oxydase est une des enzymes les plus étudiées actuellement. De plus en plus d'études montrent son rôle essentiel dans le métabolisme et la clairance des médicaments (156–158). Son activité peut être influencée par des variations génétiques, des maladies ou des interactions médicamenteuses (156). De plus, l'expression de cette enzyme est dépendante de l'âge et elle est très faible chez les enfants de moins de 2 ans. Ceci explique pourquoi les enfants sont plus sensibles à des médicaments métabolisés par cette enzyme (158,159). Des interactions médicamenteuses pourraient aussi se développer chez les personnes âgées étant souvent en polymédication avec des médicaments substrats et inhibiteurs de l'enzyme (*cf.* : Tableau 8) (156,159,160).

#### **Brimonidine :**

La brimonidine est le seul médicament métabolisé par l'aldéhyde oxydase, mais aucun cas d'interactions médicamenteuses métaboliques n'a encore été rapporté dans la littérature et leur effet n'a pas encore été étudié. Elle est rapidement absorbée par la cornée et grâce à sa liaison à la mélanine, elle a une demi-vie longue au niveau des tissus oculaires pigmentés (iris et rétine). Elle peut se retrouver au niveau systémique rapidement et elle a un métabolisme hépatique extensif et une clairance rapide (98,108). L'aldéhyde oxydase est la principale enzyme responsable de son métabolisme et trois métabolites ont été identifiés aussi bien au niveau oculaire (conjonctive, cornée, humeur aqueuse) que systémique (urine) (108,161,162). Malgré sa bonne tolérance générale, la brimonidine peut traverser la barrière hémato-encéphalique et causer des effets indésirables au niveau du système nerveux central (SNC) (sédation, fatigue, somnolence *etc.*) allant jusqu'à la dépression du SNC dans certains cas extrêmes (163). Ces effets sont dépendants de la dose et chez les adultes sont extrêmement rares. Cependant, des cas de dépression du SNC ont été observés chez des enfants, ce qui a conduit à la contre-indication de ce médicament chez les enfants de moins de 2 ans (108,163–170). Cette variabilité liée à l'âge, en termes d'effets indésirables, peut être expliquée d'une part par l'immaturité de la barrière hémato-encéphalique chez les enfants qui facilite le passage de la molécule au niveau central et d'autre part par les faibles taux d'expression de l'aldéhyde oxydase hépatique jusqu'à cet âge (166,168). Des situations de surexposition pourraient aussi se présenter chez des patients ayant une mutation génétique causant une diminution de l'activité de l'enzyme où en cas d'inhibition médicamenteuse de l'enzyme, mais aucun cas n'a encore été rapporté dans la littérature.

Tableau 5: DMEs impliquées dans le métabolisme des médicaments anti-glaucomeux.

Médicament	Réaction métabolique	Enzyme du métabolisme	Réf
<b>Bimatoprost</b>	Hydrolyse acide		(135,139,171)
	Oxydation	CYP3A4	(171–173)
	N-dééthylation		(171–173)
	Glucuronidation	UGTs	(171–173)
<b>Latanoprost</b>	Hydrolyse d'ester	Estérases	(110,174–176)
	$\beta$ -oxydation	Enzymes de la $\beta$ -oxydation	(110,174–176)
	Glucuronidation	UGTs	(110,174–176)
	Hydroxylation		(110)
<b>Betaxolol</b>	O- et N- Déalkylation	CYP2D6 40%, CYP1A2	(130,177)
	Hydroxylation		(177)
	Glucuronidation	UGTs	(177)
	O- et N- Acétylation	Acétyltransférases	(177)
	O- et N- Méthylation	Méthyltransférases	(177)
<b>Timolol</b>	Hydroxylation	CYP2D6 90%, CYP3C19 10%	(132,178)
	Glucuronidation	UGTs	(66)
<b>Lévobunolol</b>	Reduction	Cétone réductase	(179–181)
	Oxydation	CYPs	(180)
	Glucuronidation	UGTs	(180,181)
	O- et N- Acétylation	Acétyltransférases	(180,181)
<b>Cartéolol</b>	Hydroxylation	CYP2D6	(182–185)
<b>Brimonidine</b>	Oxydation	Aldéhyde oxydase	(161,186)
	Oxydation	Cytochrome P450	(186)
	Oxydation	MAO	(164)
	Glucuronidation	UGTs	(161,186)
<b>Acétazolamide</b>		Inhibiteur de CYP3A4	(187)
<b>Dorzolamide</b>	N-déalkylation	CYPs (2B, 2E1, 3A2, 3A4)	(143,187,188)

<b>Brinzolamide</b>	O- et N-déalkylation	CYPs (2A6, 2C8, 2C9, 3A4)	(99,140,187)
<b>Netarsudil</b>	O- et N- Acétylation	Estérases	(106,189)
<b>Pilocarpine</b>	Hydrolyse d'ester	Estérases	(190)
	Hydroxylation CYP2D6		(134,191)

Tableau 6: L'expression des différentes DMEs impliquées dans le métabolisme des médicaments anti-glaucomeux au niveau des tissus oculaires.

Enzyme	Segment antérieur	Segment postérieur	Réf
<b>Oxydoréductases</b>			
Aldéhyde oxydase	cornée, iris-corps ciliaire ♦	rétilne, RPE, choroïde ♦	(192,193)
Cétone réductase	cornée, conjonctive, iris-corps ciliaire, lentilles ♦		(179)
MAO	cornée, iris-corps ciliaire ♦	RPE, nerf optique, choroïde ♦	(194,195)
CYP1A2	cornée, iris-corps ciliaire ♦	rétilne, choroïde ♦	(196,197)
CYP2A6	cornée, iris-corps ciliaire ■	rétilne, choroïde ■	(133)
CYP2C9	cornée ■		(133,198)
CYP2C19	cornée ■		(133,198)
CYP2D6	cornée, iris-corps ciliaire ■	rétilne, choroïde ■	(133,198,199)
CYP2E1	cornée ■	rétilne, choroïde ■	(133,198)
CYP3A4	glande lacrymale ♦		(200)
<b>Enzymes Hydrolytiques</b>			
Peptidases	cornée, humeur aqueuse ♦	rétilne, RPE, vitré ♦	(117,201)
Estérases	cornée, iris-corps ciliaire ♦	rétilne, RPE, choroïde, humeur vitré, nerf optique ♦	(117,201–204)
Déshydrogénases	cornée, conjonctive, sclère, lentilles ♦	rétilne, RPE ♦	(117,205)
<b>Enzymes de conjugaison</b>			
UGT	cornée, iris-corps ciliaire, lentilles ♦	rétilne, RPE ♦	(206–208)
Acétyltransférases	cornée, iris-corps ciliaire ♦	rétilne, choroïde ♦	(124,208)
Méthyltransférases	iris-corps ciliaire, lentilles ♦	rétilne, choroïde, nerf optique ♦	(124,177,194)

■ lignées cellulaires humaines ♦ espèce animale

Déshydrogénases : aldéhyde-, alcool, 15-hydroxyprostaglandine ; Peptidases : amino-, di peptidyl- ; Estérases : acétyl-, butyryl-, carboxyl- ; Acétyltransférases : n-acétyltransférases 1 et 2 ; Méthyltransférases : histamine-N- ; hydroxyindole-O-, phospholipid-N- ; catechol O-

### II.3. Études *in silico* du métabolisme des $\beta$ -bloquants

Comme présenté ci-dessus, les  $\beta$ -bloquants, et spécialement le timolol, ont depuis longtemps été associés avec des effets indésirables systémiques avec une variabilité interindividuelle (66–68). L'enzyme CYP2D6 a souvent été associée avec cette variabilité. Ceci est expliqué d'une part par la grande probabilité que cette enzyme soit impliquée dans des interactions médicamenteuses (grand nombre de médicaments inhibiteurs souvent prescrits chez la population à risque de glaucome ; cf. : Tableau 8) et de l'autre part par le fait que cette enzyme est hautement polymorphique. Il existe une grande incidence de métaboliseurs lents parmi la population européenne. De plus, des études ont montré l'association entre le statut métaboliseur lent et l'apparition d'effets indésirables, ou la gravité de ses effets. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de prouver la significativité clinique de ces observations (66,68,69,130,209–212).

Pour faire face à ceci, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées au développement de méthodes de conception du médicament permettant une amélioration de la biodisponibilité de ces médicaments au niveau de l'œil et une minimisation de l'exposition systémique (177,213). Quelques exemples sont les implants oculaires, les micro-aiguilles, les nano sphères et les lentilles de contact imbibées de médicament (214–219). Récemment, Bushe *et al.*, ont étudié le développement d'un implant intraoculaire de bétaxolol (177). Une telle technologie pourrait en effet minimiser la perte médicamenteuse lors de l'administration et la perte avec passage à la circulation sanguine par la muqueuse nasale ou la peau. Cependant, des études plus approfondies sur le métabolisme oculaire de ce médicament devraient être effectuées afin d'étudier l'influence des polymorphismes du CYP2D6 sur le profil pharmacocinétique de ces médicaments mais aussi pour étudier les interactions médicamenteuses avec d'autres médicaments administrés topiquement. Les méthodes *in silico* pourraient en effet être utilisées pour étudier l'influence des polymorphismes du CYP2D6 sur le devenir des  $\beta$ -bloquants dans l'organisme.

#### II.3.1. Études de modélisation moléculaire sur CYP

La première étape pour étudier l'interaction d'une protéine avec un ligand est d'étudier la structure de cette protéine dans son environnement. Dépendant de son placement, intracellulaire, transmembranaire, libre, *etc.*, une protéine va interagir avec des substrats hydrophiles, hydrophobes ou amphiphiles. De même, l'emplacement du site actif au sein de la protéine est un facteur très important qui détermine quels substrats vont pouvoir interagir avec celui-ci dépendant de leurs propriétés physicochimiques.

Les CYPs sont des enzymes attachées à la membrane du réticulum endoplasmique des cellules (220). La membrane étant une bicouche lipidique, seulement des molécules lipophiles ou amphiphiles peuvent la traverser et interagir avec les CYPs. En effet, il a été prouvé que les substrats des CYPs sont des molécules amphiphiles qui s'accumulent dans la membrane (étant partiellement attachées aux têtes polaires). Des études de dynamique moléculaire combinées aux techniques SAXS (small-angle X-ray scattering) ont montré que l'hélice N-terminale de la protéine est un domaine transmembranaire intégré dans la bicouche lipidique servant d'ancre pour le reste de la protéine. La partie distale de la protéine se trouve face à la membrane et est partiellement immergée dans la partie supérieure de la membrane, positionnant le site catalytique à la surface (cf. Figure 15) (220).

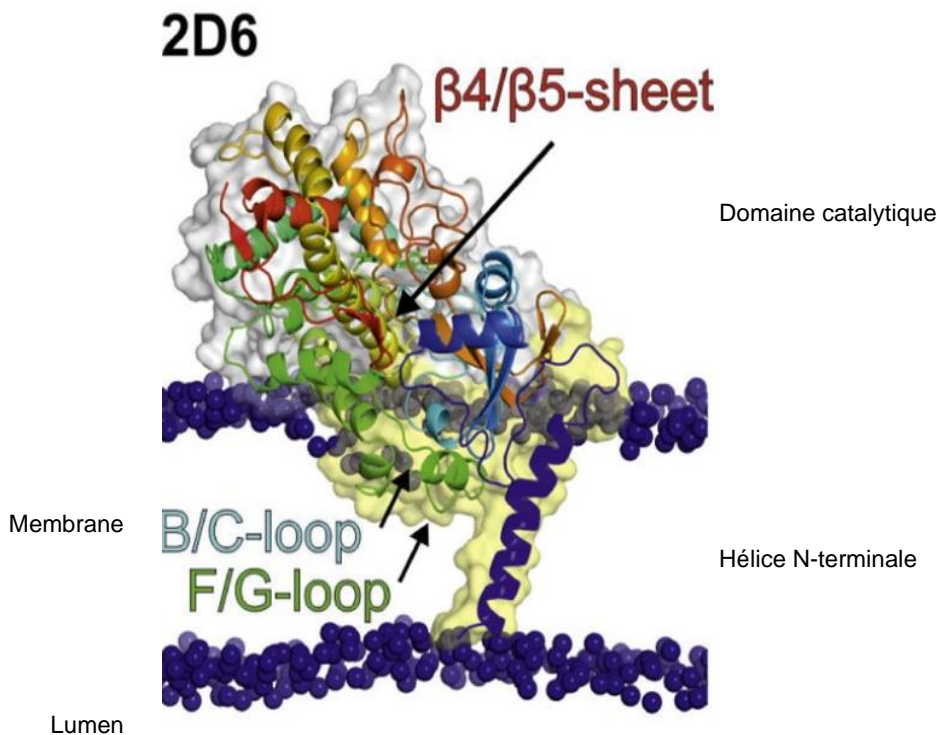


Figure 15 : La structure du CYP2D6 dans la membrane.

Source: Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners.

Il existe quelques différences au niveau de la structure des différents isoformes de la famille des CYPs, mais ils ont tous la même position au sein de la membrane du RE et les mêmes régions structurales les plus importantes pour leur fonctionnement. Parmi celles-ci, nous retrouvons l'hélice-I qui contient une thréonine très importante au processus catalytique, la boucle F/G et l'ensemble des hélices F et G avec la boucle B/G qui forment un « couvercle » au-dessus du site actif. Comme on peut le voir sur la Figure 16, le site actif se trouve au fond de la cavité de l'enzyme, au niveau de l'hème qui est son cofacteur. Un autre acide aminé très important et très conservé est la cystéine, qui contient un thiolate qui fait une liaison S-Fe avec l'hème, permettant ainsi la liaison de celle-ci au domaine catalytique de l'enzyme (220).

Des simulations de dynamique moléculaire ont aussi montré que les CYPs sont plastiques, leur position dans la membrane change dynamiquement, ce qui joue potentiellement un rôle important dans le processus d'interaction enzyme-substrat. Ces changements dynamiques de conformation de l'enzyme peuvent par exemple faciliter l'entrée d'un substrat et son cheminement jusqu'au site actif. Grâce à sa flexibilité, le site actif peut accueillir des substrats de formes et de tailles différentes. Il peut même accueillir plusieurs substrats simultanément permettant des effets de synergie ou d'antagonisme, phénomènes associés aux interactions médicamenteuses (220). Des canaux d'accès et de sortie permettent la circulation des substrats et produits de métabolisme (en rouge et vert sur la Figure 16). Des méthodes comme les des simulations RAMD (random accelerated molecular dynamics method), SMD (steered molecular dynamics) et BE-META (bias-exchange metadynamics) peuvent être utilisées pour étudier le processus de passage d'un ligand à travers le canal d'accès pour arriver au site actif (220). Il est cependant, difficile d'étudier le passage d'un ligand au site actif car les conformations de la protéine changent avec le passage d'un ligand. Le processus dépend

ainsi du ligand, des ligands peuvent induire l'ouverture de nouveaux canaux et de même l'étude du processus inverse (sortie d'un ligand à partir du site actif ; technique utilisée par les méthodes présentées ci-dessus) ne va pas forcément donner des informations correctes pour le processus d'entrée du ligand au site actif (220).

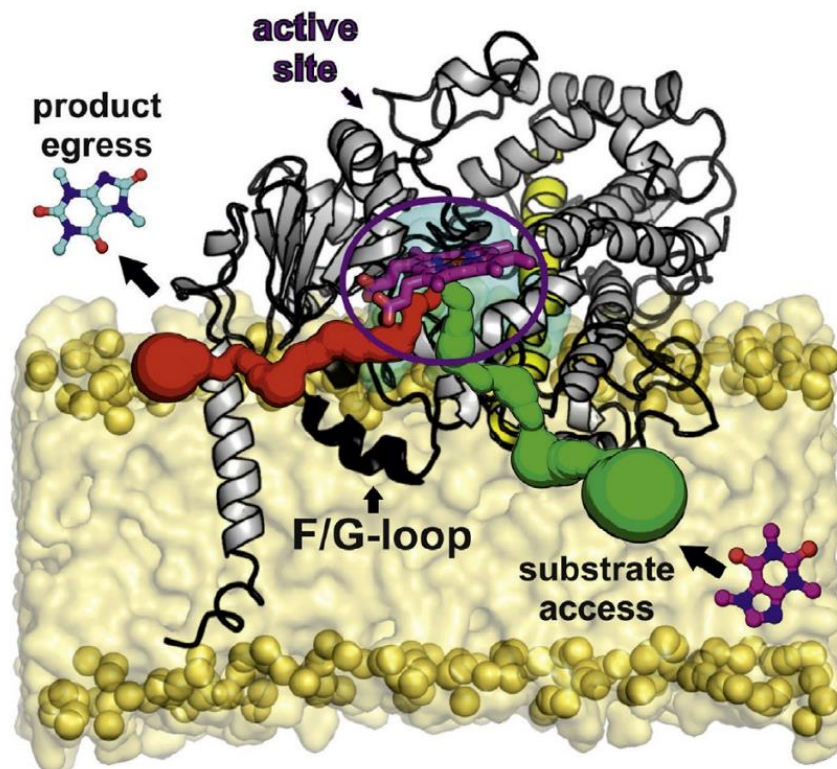


Figure 16 : Position du site actif au sein des CYPs, exemple du CYP3A4. (Hème : la structure violette entourée ; canal d'accès pour les substrats en vert, canal de sortie pour les produits de métabolisme en rouge)

Source: Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners.



### II.3.2. Modélisation moléculaire de l'interaction CYP2D6 - $\beta$ -bloquants

Le CYP2D6 est une enzyme saturée à des concentrations basses de substrat. Ses substrats sont en général des bases lipophiles qui contiennent un azote basique à 5-10Å de leur site de biotransformation. Le site actif a un volume d'environ 540Å<sup>3</sup> et parmi les résidus les plus importants, on retrouve Val-104, Phe-120, Leu-121, Glu-216, Phe-483, Asp-301, Ala-305, Val-374, Phe-481 et Leu-484 (221). Ces résidus sont impliqués dans la reconnaissance des substrats, de la liaison des substrats au site actif et de leur orientation. Par exemple, Phe-120 a un rôle majeur dans la reconnaissance des substrats et il contrôle l'orientation des substrats par rapport à l'hème, déterminant la regio-spécificité de l'enzyme (221). Un autre résidu très important est Asp-301 qui interagit avec l'azote basique des ligands et facilite la liaison et l'orientation de ceux-ci dans le site actif (221). Par l'importance de ces résidus pour l'interaction entre l'enzyme et ses substrats, une potentielle mutation génétique de ceux-ci pourrait conduire à une diminution de l'affinité enzyme-substrat, une diminution de l'activité enzymatique et potentiellement une perte de l'activité (conduisant ainsi à des phénomènes de métaboliseurs lents, par exemple).

Les  $\beta$ -bloquants étant des substrats historiques du CYP2D6, différentes molécules (bufuralol, cartéolol, propranolol) de la famille ont été utilisées comme molécules de référence pour les études de l'influence des mutations sur la structure et l'activité de l'enzyme (222–225). Il a été montré que les mutations donnant le variant CYP2D6\*17<sup>11</sup>, altèrent la liaison du substrat au site actif (221). D'autres mutations causent une diminution de la flexibilité du domaine catalytique et causent une diminution de l'activité catalytique des  $\beta$ -bloquant (variant CYP2D6\*10,

Figure 17)<sup>13</sup> (223).

Les différents exemples présentés dans les paragraphes précédents nous montrent comment des méthodes *in silico* permettent de mieux comprendre les processus d'interaction entre les médicaments et les enzymes du métabolisme, mais aussi d'expliquer ou même prédire les conséquences de certaines mutations.

Les  $\beta$ -bloquants étant une classe pharmacologique très importante ont été le sujet de plusieurs études *in silico* permettant d'étudier leur mécanisme d'interaction avec leur cible protéique mais aussi d'améliorer leur profil pharmacocinétique (227,228). Cependant, même s'ils forment l'une des classes les plus utilisées pour le traitement du glaucome, le métabolisme des  $\beta$ -bloquants de l'œil reste très faiblement étudié. Il serait pourtant très intéressant d'étudier comment ces  $\beta$ -bloquants interagissent avec le CYP2D6 et avec les variants de CYP2D6

---

<sup>11</sup> CYP2D6\*17 est un des variants les plus importants du CYP2D6, car il est le plus fréquent chez les américains d'Afrique (il est absent chez les caucasiens Européens). CYP2D6\*1 est le variant normal, d'autres variants importants sont : CYP2D6\*2, CYP2D6\*3, CYP2D6\*4 (20 à 25% des caucasiens), CYP2D6\*5, CYP2D6\*10 (35-55% des asiatiques) et CYP2D6\*41 (226).

<sup>12</sup> Le variant CYP2D6\*17 est causé par l'association des mutations T107I et R296c. La substitution T107I est une substitution de l'acide aminé hydrophile Thr en un hydrophobe Ile. Thr107 est très proche des résidus de la boucle B/C Phe112, Phe120, Leu121 qui forment la cavité du site active ; dès sa position proche de l'entrée du site active, il est probablement impliqué comme résidu de reconnaissance qui attire les ligands au site actif et forme un site de liaison intermédiaire.

<sup>13</sup> Le variant CYP2D6\*10 est causé par une substitution P34S. P34, comme Thr107, est situé au niveau de l'entrée de la cavité active. La mutation cause une altération de la mobilité de l'enzyme et des changements de la structure et de la flexibilité de la cavité active causent la diminution de l'activité catalytique.

causant les phénotypes de métaboliseurs lents. Cette population présente une plus grande incidence d'effets indésirables systémiques et/ou d'effets indésirables plus graves.

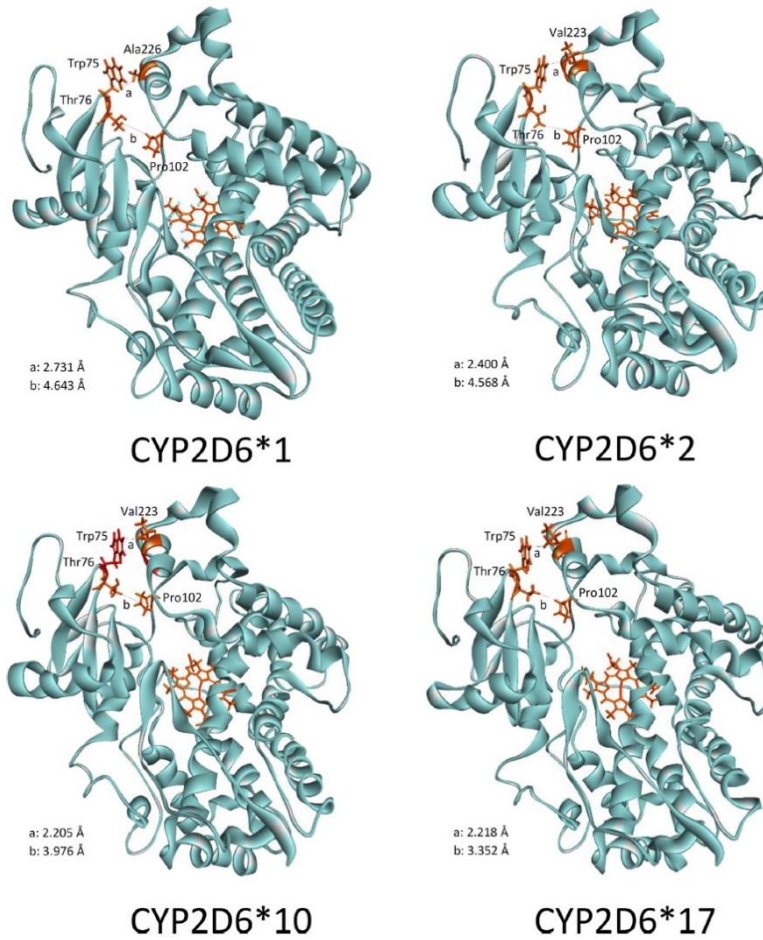


Figure 17 : Diagrammes des différents variants du CYP2D6, montrant les différents acides aminés qui forment le canal d'entrée du substrat au site actif.

Source: Functional and structural characterisation of common cytochrome P450 2D6 allelic variants-roles of Pro34 and Thr107 in catalysis and inhibition.

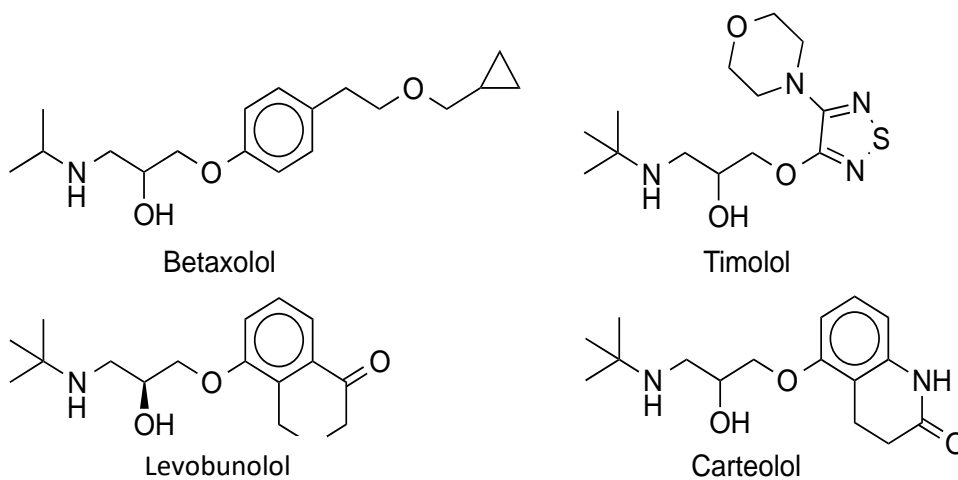


Figure 18 : Structures des  $\beta$ -bloquants du glaucome.

Source : PubChem

## Conclusion

---

L'objectif de cette thèse était en partie d'expliquer pourquoi les stratégies de personnalisation des thérapies devraient s'appliquer aussi sur certains médicaments historiques -comme les  $\beta$ -bloquants du glaucome- dans l'objectif d'améliorer leur utilisation. D'autre part, nous souhaitons ici montrer comment les méthodes *in silico* pourraient être utilisées afin de faciliter ce type de stratégies.

Le principe de base des méthodes *in silico* utilisées dans la recherche pharmaceutique, telles que la modélisation moléculaire et le docking moléculaire, ainsi que leurs applications ont été présentés dans la première partie de cette thèse. Il est important de pouvoir se familiariser avec le langage technique lié à ses nouvelles méthodes. Ensuite, la physiopathologie et le traitement médicamenteux du glaucome primaire chronique, ont été développés. Cette partie permet de comprendre l'intérêt d'une optimisation des médicaments couramment utilisés, dans le but d'améliorer la prise en charge des patients. Dans la dernière partie, nous avons montré, sur la base d'un exemple, comment les méthodes de modélisation moléculaire avancées permettent de comprendre et de prédire des effets biologiques liés au métabolisme des médicaments.

Comme présenté dans la première partie du document, les méthodes *in silico* peuvent être utilisées pour l'étude des propriétés pharmacocinétiques (dont le métabolisme) des xénobiotiques. Ces méthodes peuvent être appliquées tout le long du processus de recherche et développement, mais aussi une fois que le médicament est mis sur le marché. Il existe une grande partie des médicaments, dits historiques mais encore utilisés (anti-hypertenseurs, antihistaminiques, antipsychotiques, anti-dépresseurs et autres, cf. Tableau 8), qui présentent des effets indésirables et de possibles interactions-médicamenteuses qui ne sont pas complètement élucidés. C'est le cas du Timolol présenté dans cette étude comme exemple. Pourtant, ces effets peuvent causer une diminution de la qualité de vie des patients, une diminution de l'observance, et dans certains cas un échec de la thérapie. Ceci est partiellement dû au fait qu'au moment de leur développement, très peu d'études pharmacocinétiques ont été effectuées. Ces études étaient basées sur des modèles *in vitro* ou des modèles animaux qui ne correspondaient pas aux profils pharmacocinétiques observés chez l'Homme. De plus, la notion d'inter-individualité n'était pas prise en considération dans les développements passés.

Paradoxalement, dans le cas du glaucome comme pour bien d'autres pathologies, il est actuellement très difficile de mettre sur le marché de nouveaux médicaments avec une meilleure efficacité que ces médicaments historiques. Par conséquent, il serait très intéressant de se diriger vers une réévaluation de ces médicaments et proposer des optimisations à partir des connaissances et moyens de recherche *in silico* et bio-informatiques modernes. Le principe de la réutilisation de médicaments déjà sur le marché, n'est pas nouveau. Il existe nombre de médicaments dont la première indication est différente de leur utilisation actuelle. Les coûts et le temps nécessaires pour la découverte d'un nouveau médicament favorisent cette stratégie et l'utilisation des modèles bio-informatiques. Un exemple d'étude basée sur des modèles de QSAR (Hologram Quantitative Structure Activity Relationships) a proposé des optimisations des propriétés pharmacocinétiques et l'affinité de liaison au récepteur cible des  $\beta$ -bloquants (228). Les auteurs ont utilisé cette méthode pour reconcevoir des  $\beta$ -bloquants avec une demi-vie et une affinité de liaison aux récepteurs  $\beta$  améliorés et avec des profils

métaboliques, de toxicité et d'efficacité identiques aux  $\beta$ -bloquants actuellement sur le marché (228).

Cette perspective d'optimisation de médicaments existants est intéressante dans un objectif de médecine personnalisée, c'est-à-dire en ciblant les problématiques d'une population la plus réduite et la plus spécifique possible. L'objectif est d'améliorer la qualité de vie des patients et l'observance, dans un but évident d'améliorer le succès des traitements. C'est une perspective non seulement prometteuse pour les patients, mais aussi pour l'industrie pharmaceutique car elle demande moins d'investissement qu'une recherche pharmaceutique *de novo*. Nul doute que ce genre de stratégies va se multiplier dans les prochaines années notamment parce qu'elles sont efficacement supportées par des méthodes *in silico* de plus en plus performantes.

## Références bibliographiques

---

1. Médicament (développement du) [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 20 févr 2021]. Disponible à: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/medicament-developpement>
2. Commissioner O of the. Step 1: Discovery and Development. FDA [Internet]. 18 avr 2019 [cité 20 févr 2021]; Disponible à: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-1-discovery-and-development>
3. Coronavirus et Covid-19 [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 21 févr 2021]. Disponible à: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/coronavirus-sars-cov-et-mers-cov>
4. Sumon TA, Hussain MdA, Hasan MdT, Hasan M, Jang WJ, Bhuiya EH, et al. A Revisit to the Research Updates of Drugs, Vaccines, and Bioinformatics Approaches in Combating COVID-19 Pandemic. *Front Mol Biosci* [Internet]. 25 janv 2021 [cité 16 févr 2021];7. Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7868442/>
5. Hwang W, Lei W, Katriasis NM, MacMahon M, Chapman K, Han N. Current and prospective computational approaches and challenges for developing COVID-19 vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 6 févr 2021 [cité 16 févr 2021]; Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7871111/>
6. GLANVILLE D. Treatments and vaccines for COVID-19: authorised medicines [Internet]. European Medicines Agency. 2021 [cité 21 févr 2021]. Disponible à: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/treatments-vaccines-covid-19-authorised-medicines>
7. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol*. sept 2007;152(1):9-20.
8. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci* [Internet]. 6 juin 2019 [cité 20 févr 2021];20(11). Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6601033/>
9. Śledź P, Caflisch A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Curr Opin Struct Biol*. 2018;48:93-102.
10. Vanommeslaeghe K, Guvench O, MacKerell AD. Molecular mechanics. *Curr Pharm Des*. 2014;20(20):3281-92.
11. Mécanique moléculaire modélisation champ force énergie potentielle protéine Enseignement recherche biochimie enzymologie bioinformatique Emmanuel Jaspard Université Angers biochimej [Internet]. [cité 6 juill 2020]. Disponible à: <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/TexteTD/9BioinfoSTRUCTURALE/1MécaniqueMoléculaire/1MécaniqueMoléculaire.htm>
12. Kmiecik S, Gront D, Kolinski M, Wieteska L, Dawid AE, Kolinski A. Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. *Chem Rev*. 27 2016;116(14):7898-936.

13. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem.* 1983;4(2):187-217.
14. Lee S, Tran A, Allsopp M, Lim JB, Hénin J, Klauda JB. CHARMM36 United Atom Chain Model for Lipids and Surfactants. *J Phys Chem B.* 16 janv 2014;118(2):547-56.
15. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods.* janv 2017;14(1):71-3.
16. MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J Phys Chem B.* 1 avr 1998;102(18):3586-616.
17. Kollman PA. Advances and Continuing Challenges in Achieving Realistic and Predictive Simulations of the Properties of Organic and Biological Molecules. *Acc Chem Res.* 1 janv 1996;29(10):461-9.
18. Halgren TA. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J Comput Chem.* 1996;17(5-6):490-519.
19. Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J Phys Chem B.* 1 juill 2001;105(28):6474-87.
20. Periole X, Marrink S-J. The Martini coarse-grained force field. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;924:533-65.
21. J. Marrink S, Peter Tieleman D. Perspective on the Martini model. *Chem Soc Rev.* 2013;42(16):6801-22.
22. Das R, Baker D. Macromolecular modeling with rosetta. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:363-82.
23. Kar P, Gopal SM, Cheng Y-M, Predeus A, Feig M. PRIMO: A Transferable Coarse-Grained Force Field for Proteins. *J Chem Theory Comput.* 13 août 2013;9(8):3769-88.
24. Liwo A, Baranowski M, Czaplewski C, Gołaś E, He Y, Jagieła D, et al. A unified coarse-grained model of biological macromolecules based on mean-field multipole–multipole interactions. *J Mol Model.* 15 juill 2014;20(8):2306.
25. admin. CABS [Internet]. 2012 [cité 3 août 2020]. Disponible à: <http://biocomp.chem.uw.edu.pl/tools/cabs>
26. Best RB. Atomistic Force Fields for Proteins. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2019;2022:3-19.
27. Hug S. Classical molecular dynamics in a nutshell. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;924:127-52.
28. LAMMPS Molecular Dynamics Simulator [Internet]. [cité 21 juill 2020]. Disponible à: <https://lammps.sandia.gov/#nogo>

29. NAMD - Scalable Molecular Dynamics [Internet]. [cité 21 juill 2020]. Disponible à: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>
30. GROMACS - Gromacs [Internet]. [cité 21 juill 2020]. Disponible à: <http://www.gromacs.org/>
31. The Amber Molecular Dynamics Package [Internet]. [cité 21 juill 2020]. Disponible à: <http://ambermd.org/>
32. Home - CHARMM [Internet]. [cité 21 juill 2020]. Disponible à: <https://www.charmm.org//>
33. HOOMD-blue - Home [Internet]. [cité 21 juill 2020]. Disponible à: <http://glotzerlab.engin.umich.edu/hoomd-blue/>
34. Dror RO, Green HF, Valant C, Borhani DW, Valcourt JR, Pan AC, et al. Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs. *Nature*. nov 2013;503(7475):295-9.
35. Mollica L, Decherchi S, Zia SR, Gaspari R, Cavalli A, Rocchia W. Kinetics of protein-ligand unbinding via smoothed potential molecular dynamics simulations. *Sci Rep*. 23 juin 2015;5(1):11539.
36. Salmaso V, Moro S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 [cité 16 juill 2020];9. Disponible à: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00923/full>
37. Forli S, Perryman AL. AutoDock Virtual Screening: Relaxed Complex scheme. :9.
38. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2008;443:365-82.
39. PubChem. PubChem [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
40. ChEMBL Database [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>
41. Liu T, Lin Y, Wen X, Jorissen RN, Gilson MK. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. *Nucleic Acids Res*. 3 janv 2007;35(Database):D198-201.
42. Sterling T, Irwin JJ. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model*. 23 nov 2015;55(11):2324-37.
43. ChemSpider | Search and share chemistry [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <http://www.chemspider.com/>
44. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 4 janv 2018;46(D1):D1074-82.
45. ChemBioFrance - Infrastructure de recherche [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://chembiofrance.cn.cnrs.fr/en/>

46. ChemBridge | Home [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://www.chembridge.com/index.php>
47. Maybridge.com [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://www.maybridge.com/>
48. Screening Libraries (Compound Libraries) - Chemical Libraries and Screening Compounds by ChemDiv [Internet]. ChemDiv. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://www.chemdiv.com/screening-libraries11/>
49. Leading supplier of HTS compounds, building blocks | Life Chemicals [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://lifechemicals.com/>
50. Specs - Compound Management services and Research Compounds for the Life Science industry [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://www.specs.net/>
51. Home - Enamine [Internet]. [cité 8 août 2020]. Disponible à: <https://enamine.net/>
52. Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1 juin 2003;32(1):335-73.
53. Rarey M, Kramer B, Lengauer T. Time-Efficient Docking of Flexible Ligands into Active Sites of Proteins. :9.
54. CORINA Classic - High-Quality 3D Molecular Models | MN-AM [Internet]. [cité 10 août 2020]. Disponible à: <https://www.mn-am.com/products/corina>
55. Yuriev E, Holien J, Ramsland PA. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012–2013 in review. *J Mol Recognit.* 2015;28(10):581-604.
56. Jiang F, Kim S-H. "Soft docking": Matching of molecular surface cubes. *J Mol Biol.* 5 mai 1991;219(1):79-102.
57. Ferreira RS, Simeonov A, Jadhav A, Eidam O, Mott BT, Keiser MJ, et al. Complementarity Between a Docking and a High-Throughput Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors. *J Med Chem.* 8 juill 2010;53(13):4891-905.
58. Sink R, Gobec S, Pečar S, Zega A. False positives in the early stages of drug discovery. *Curr Med Chem.* 2010;17(34):4231-55.
59. Awuni Y, Mu Y. Reduction of False Positives in Structure-Based Virtual Screening When Receptor Plasticity Is Considered. *Molecules.* 19 mars 2015;20(3):5152-64.
60. Deng N, Forli S, He P, Perryman A, Wickstrom L, Vijayan RSK, et al. Distinguishing Binders from False Positives by Free Energy Calculations: Fragment Screening Against the Flap Site of HIV Protease. *J Phys Chem B.* 22 janv 2015;119(3):976-88.
61. Khanjiwala Z, Khale A, Prabhu A. Docking structurally similar analogues: Dealing with the false-positive. *J Mol Graph Model.* 1 déc 2019;93:107451.
62. Kontoyianni M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1647:255-66.
63. Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, Jolly SM, Wai JS, Zhuang L, et al. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 août 2004;101(31):11233-8.



64. Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen N-C, Rasetti V, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 5 sept 2003;308(4):698-705.
65. Vinti, H., Chichmanian, R.M., Fournier, J.P., Pesce, A., Taillan, B., Fuzibet, J.G., Cassuto, J.P. & Dujardin, P. Accidents systémiques des bêta-bloquants en collyres: A propos de six observations. *Rev Médecine Interne.* 1 janv 1989;10(1):41-4.
66. Volotinen M, Hakkola J, Pelkonen O, Vapaatalo H, Mäenpää J. Metabolism of Ophthalmic Timolol: New Aspects of an Old Drug. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;108(5):297-303.
67. Mäenpää J, Pelkonen O. Cardiac safety of ophthalmic timolol. *Expert Opin Drug Saf.* nov 2016;15(11):1549-61.
68. Nieminen, T., Lehtimäki, T., Mäenpää, J., Ropo, A., Uusitalo, H. & Kähönen, M. Ophthalmic timolol: Plasma concentration and systemic cardiopulmonary effects. *Scand J Clin Lab Invest.* janv 2007;67(2):237-45.
69. Nieminen, T., Uusitalo, H., Mäenpää, J., Turjanmaa, V., Rane, A., Lundgren, S., Ropo, A., Rontu, R., Lehtimäki, T. & Kähönen, M. Polymorphisms of genes CYP2D6, ADRB1 and GNAS1 in pharmacokinetics and systemic effects of ophthalmic timolol. A pilot study. *Eur J Clin Pharmacol.* 1 déc 2005;61(11):811-9.
70. Observatoire régional de la santé des Pays de la Loire. La population en situation de handicap visuel en France Importance, caractéristiques, incapacités fonctionnelles et difficultés sociales. 2005.
71. World report on vision [Internet]. [cité 13 mars 2020]. Disponible à: <https://www.who.int/publications-detail/world-report-on-vision>
72. All Vision Impairment Data and Statistics | National Eye Institute [Internet]. [cité 16 mars 2020]. Disponible à: <https://www.nei.nih.gov/learn-about-eye-health/resources-for-health-educators/eye-health-data-and-statistics/all-vision-impairment-data-and-statistics>
73. Bourne RRA, Jonas JB, Bron AM, Cicinelli MV, Das A, Flaxman SR, et al. Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe in 2015: magnitude, temporal trends and projections. *Br J Ophthalmol.* 2018;102(5):575-85.
74. Tham Y-C, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng C-Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology.* nov 2014;121(11):2081-90.
75. Kolko M, Horwitz A, Thygesen J, Jeppesen J, Torp-Pedersen C. The Prevalence and Incidence of Glaucoma in Denmark in a Fifteen Year Period: A Nationwide Study. *PLoS ONE* [Internet]. 16 juill 2015 [cité 8 mai 2020];10(7). Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4504501/>
76. Español I en, Statement A, Policy P, Use T& C of, Credits P. Types of Glaucoma [Internet]. Glaucoma Research Foundation. [cité 15 févr 2021]. Disponible à: <https://www.glaucoma.org/glaucoma/types-of-glaucoma.php>
77. What Is Glaucoma? [Internet]. American Academy of Ophthalmology. 2019 [cité 15 janv 2020]. Disponible à: <https://www.aao.org/eye-health/diseases/what-is-glaucoma>

78. Everitt DE, Avorn J. Systemic effects of medications used to treat glaucoma. *Ann Intern Med.* 15 janv 1990;112(2):120-5.
79. Diestelhorst M, Nordmann J-P, Toris CB. Combined Therapy of Pilocarpine or Latanoprost with Timolol Versus Latanoprost Monotherapy. *Surv Ophthalmol.* 1 août 2002;47:S155-61.
80. Sirois FJ. Pilocarpine Psychosis. *Psychosomatics.* 1 janv 2005;46(1):88.
81. Benjamin KW. Toxicity of ocular medications. *Int Ophthalmol Clin.* 1979;19(1):199-255.
82. Caccavale A, Fusco R, Romano B, Antinozzi PP, Pignalosa G. Effects of Ocular Betaxolol on Glucose and Lipid Metabolism after Long-Term Treatment. *Clin Drug Investig.* 1 nov 1997;14(5):363-8.
83. Buckley MM-T, Goa KL, Clissold SP. Ocular Betaxolol: A Review of its Pharmacological Properties, and Therapeutic Efficacy in Glaucoma and Ocular Hypertension. *Drugs.* juill 1990;40(1):75-90.
84. Akingbehin TY, Raj PS. Ophthalmic Topical Beta Blockers: Review of Ocular and Systemic Adverse Effects. *J Toxicol Cutan Ocul Toxicol.* janv 1990;9(2):131-47.
85. Frishman WH, Kowalski M, Nagnur S, Warshafsky S, Sica D. Cardiovascular Considerations in Using Topical, Oral, and Intravenous Drugs for the Treatment of Glaucoma and Ocular Hypertension: Focus on  $\beta$ -Adrenergic Blockade. *Heart Dis.* nov 2001;386-97.
86. Lin L, Wang Y, Chen Y, Liu M. Bradyarrhythmias secondary to topical levobunolol hydrochloride solution. *Clin Interv Aging.* 13 oct 2014;9:1741-5.
87. Stewart WC, Castelli WP. Systemic side effects of topical beta-adrenergic blockers. *Clin Cardiol.* 1996;19(9):691-7.
88. Scherer WJ. A Retrospective Review of Non-Responders to Latanoprost. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1 juin 2002;18(3):287-91.
89. Williams RD. Efficacy of bimatoprost in glaucoma and ocular hypertension unresponsive to latanoprost. *Adv Ther.* 1 nov 2002;19(6):275-81.
90. Aihara M. Clinical appraisal of tafluprost in the reduction of elevated intraocular pressure (IOP) in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol Auckl NZ.* 2010;4:163-70.
91. Wirta, D., VanDenburgh, A.M., Weng, E., Whitcup, S.M., Kurstjens, S., Beddingfield III, F.C. Long-term safety evaluation of bimatoprost ophthalmic solution 0.03%: a pooled analysis of six double-masked, randomized, active-controlled clinical trials. *Clin Ophthalmol Auckl NZ.* 2011;(5):759.
92. Quaranta, L., Riva, I., Katsanos, A., Floriani, I., Centofanti, M. & Konstas, A.G. Safety and efficacy of travoprost solution for the treatment of elevated intraocular pressure. *Clin Ophthalmol Auckl NZ.* 10 avr 2015;9:633-43.
93. Pantcheva MB, Seibold LK, Awadallah NS, Kahook MY. Tafluprost: a novel prostaglandin analog for treatment of glaucoma. *Adv Ther.* 18 août 2011;28(9):707.

94. Raber, S., Courtney, R., Maeda-Chubachi, T., Simons, B.D., Freedman, S.F., Wirostko, B. & A6111139 Study Group. Latanoprost Systemic Exposure in Pediatric and Adult Patients with Glaucoma: A Phase 1, Open-Label Study. *Ophthalmology*. 1 oct 2011;118(10):2022-7.
95. Alm A. Latanoprost in the treatment of glaucoma. *Clin Ophthalmol Auckl NZ*. 26 sept 2014;8:1967-85.
96. Pozarowska D. Safety and tolerability of tafluprost in treatment of elevated intraocular pressure in open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol Auckl NZ*. 2010;4:1229-36.
97. Whitson, J. T. Travoprost – a new prostaglandin analogue for the treatment of glaucoma: Expert Opin Pharmacother. févr 2005;3(7):965-77.
98. Cantor LB. Brimonidine in the treatment of glaucoma and ocular hypertension. *Ther Clin Risk Manag*. déc 2006;2(4):337-46.
99. Cvetkovic RS, Perry CM. Brinzolamide. *Drugs Aging*. 1 oct 2003;20(12):919-47.
100. Balfour JA, Wilde MI. Dorzolamide. *Drugs Aging*. 1 mai 1997;10(5):384-403.
101. Bartlett, J. D., Jaanus, S. D. *Clinical Ocular Pharmacology*. Elsevier Health Sciences; 2007. 816 p.
102. Gerber SL, Cantor LB, Brater DC. Systemic drug interactions with topical glaucoma medications. *Surv Ophthalmol*. 1 nov 1990;35(3):205-18.
103. Diamond JP. Systemic Adverse Effects of Topical Ophthalmic Agents: Implications for Older Patients. *Drugs Aging*. nov 1997;11(5):352-60.
104. Lama P. Systemic Side Effects of Glaucoma Medications. Dans: Schacknow PN, Samples JR, éditeurs. *The Glaucoma Book: A Practical, Evidence-Based Approach to Patient Care* [Internet]. New York, NY: Springer; 2010 [cité 4 mai 2020]. p. 677-88. Disponible à : [https://doi.org/10.1007/978-0-387-76700-0\\_59](https://doi.org/10.1007/978-0-387-76700-0_59)
105. Kadam RS, Jadhav G, Ogidigben M, Kompella UB. Ocular Pharmacokinetics of Dorzolamide and Brinzolamide After Single and Multiple Topical Dosing: Implications for Effects on Ocular Blood Flow. *Drug Metab Dispos*. sept 2011;39(9):1529-37.
106. Hoy SM. Netarsudil Ophthalmic Solution 0.02%: First Global Approval. *Drugs*. 1 mars 2018;78(3):389-96.
107. Ghanghas RR, Mohan P, Sharma V, Sharma AK. Netarsudil: a novel intra-ocular pressure lowering agent. *Int J Basic Clin Pharmacol*. 2018;7(11):2268-70.
108. Adkins JC, Balfour JA. Brimonidine. *Drugs Aging*. 1 mars 1998;12(3):225-41.
109. Woodward DF, Phelps RL, Krauss AH-P, Weber A, Short B, Chen J, et al. Bimatoprost: A Novel Antiglaucoma Agent. *Cardiovasc Drug Rev*. 2004;22(2):103-20.
110. Fukano Y, Kawazu K. Disposition and Metabolism of a Novel Prostanoid Antiglaucoma Medication, Tafluprost, Following Ocular Administration to Rats. *Drug Metab Dispos*. août 2009;37(8):1622-34.

111. Sjöquist B, Stjernschantz J. Ocular and Systemic Pharmacokinetics Of Latanoprost in Humans. *Surv Ophthalmol.* 1 août 2002;47:S6-12.
112. Stahl E, Bremond-Gignac D, Landry T, Curtis M, Gedif K, Al Shahwan S, et al. Pharmacokinetics and Safety of Travoprost 0.004% Ophthalmic Solution Preserved with Polyquad in Pediatric Patients with Glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther.* juin 2017;33(5):361-5.
113. Patel A, Cholkar K, Agrahari V, Mitra AK. Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol.* 2013;2(2):47-64.
114. del Amo, E.M., Rimpelä, A.K., Heikkinen, E., Kari, O.K., Ramsay, E., Lajunen, T., Schmitt, M., Pelkonen, L., Bhattacharya, M., Richardson, D. & Subrizi, A. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. *Prog Retin Eye Res.* 1 mars 2017;57:134-85.
115. Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular Drug Delivery. *AAPS J.* 1 sept 2010;12(3):348-60.
116. Whitcup, S.M. & Azar, D.T., éditeur. *Pharmacologic therapy of ocular disease.* New York, NY: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
117. Duvvuri S, Majumdar S, Mitra A. Role of Metabolism in Ocular Drug Delivery. *Curr Drug Metab.* 1 déc 2004;5(6):507-15.
118. Al-Ghananeem AM, Crooks PA. Phase I and Phase II Ocular Metabolic Activities and the Role of Metabolism in Ophthalmic Prodrug and Codrug Design and Delivery. *Molecules.* mars 2007;12(3):373-88.
119. Barot M, Patel M, Kwatra D, Mitra AK. 7 - Transporter–metabolism interplay in the eye. Dans: Mitra AK, éditeur. *Ocular Transporters and Receptors* [Internet]. Woodhead Publishing; 2013 [cité 5 mai 2020]. p. 229-48. (Woodhead Publishing Series in Biomedicine). Disponible à: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781907568862500071>
120. Schoenwald RD. Ocular Drug Delivery: Pharmacokinetic Considerations. *Clin Pharmacokinet.* avr 1990;18(4):255-69.
121. Nakano M, Lockhart CM, Kelly EJ, Rettie AE. Ocular cytochrome P450s and transporters: roles in disease and endobiotic and xenobiotic disposition. *Drug Metab Rev.* août 2014;46(3):247-60.
122. Vellonen, K.S., Hellinen, L., Mannermaa, E., Ruponen, M., Urtti, A. & Kidron, H. Expression, activity and pharmacokinetic impact of ocular transporters. *Adv Drug Deliv Rev.* 15 févr 2018;126:3-22.
123. Argikar, U.A., Dumouchel, J.L., Kramlinger, V.M., Cirello, A.L., Gunduz, M., Dunne, C.E. & Sohal, B. Do We Need to Study Metabolism and Distribution in the Eye: Why, When, and Are We There Yet? *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2276-81.
124. Argikar UA, Dumouchel JL, Dunne CE, Bushee AJ. Ocular non-P450 oxidative, reductive, hydrolytic, and conjugative drug metabolizing enzymes. *Drug Metab Rev.* 3 juill 2017;49(3):372-94.

125. Wang R-F, Williamson JE, Kopczynski C, Serle JB. Effect of 0.04% AR-13324, a ROCK, and Norepinephrine Transporter Inhibitor, on Aqueous Humor Dynamics in Normotensive Monkey Eyes: *J Glaucoma*. janv 2015;24(1):51-4.
126. Attar M, Shen J, Ling K-HJ, Tang-Liu D. Ophthalmic drug delivery considerations at the cellular level: drug-metabolising enzymes and transporters. *Expert Opin Drug Deliv*. 1 sept 2005;2(5):891-908.
127. Attar M, Shen J. The Emerging Significance of Drug Transporters and Metabolizing Enzymes to Ophthalmic Drug Design. Dans: Tombran-Tink J, Barnstable CJ, éditeurs. *Ocular Transporters In Ophthalmic Diseases And Drug Delivery* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2008 [cité 24 mars 2020]. p. 375-97. Disponible à: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-375-2\\_20](http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-375-2_20)
128. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 1 avr 2013;138(1):103-41.
129. Preissner, S.C., Hoffmann, M.F., Preissner, R., Dunkel, M., Gewiess, A. & Preissner, S. Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy. *PLOS ONE*. 10 déc 2013;8(12):e82562.
130. Zateyshchikov, D.A., Minushkina, L.O., Brovkin, A.N., Savel'eva, E.G., Zateyshchikova, A.A., Manchaeva, B.B., Nikitin, A.G., Sidorenko, B.A. & Nosikov, V.V. Association of CYP2D6 and ADRB1 genes with hypotensive and antichronotropic action of betaxolol in patients with arterial hypertension. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007;21(4):437-43.
131. Mäenpää, J., Volotinen-Maja, M., Kautiainen, H., Neuvonen, M., Niemi, M., Neuvonen, P.J. & Backman, J.T. Paroxetine markedly increases plasma concentrations of ophthalmic timolol; CYP2D6 inhibitors may increase the risk of cardiovascular adverse effects of 0.5% timolol eye drops. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. déc 2014;42(12):2068-76.
132. Mäenpää J, Pelkonen O. Cardiac safety of ophthalmic timolol. *Expert Opin Drug Saf*. 1 nov 2016;15(11):1549-61.
133. Zhang, T., Xiang, C.D., Gale, D., Carreiro, S., Wu, E.Y. & Zhang, E.Y. Drug Transporter and Cytochrome P450 mRNA Expression in Human Ocular Barriers: Implications for Ocular Drug Disposition. *Drug Metab Dispos*. 1 juill 2008;36(7):1300-7.
134. Endo, T., Ban, M., Hirata, K., Yamamoto, A., Hara, Y. & Momose, Y. Involvement of CYP2A6 in the Formation of a Novel Metabolite, 3-Hydroxypilocarpine, from Pilocarpine in Human Liver Microsomes. *Drug Metab Dispos*. 1 mars 2007;35(3):476-83.
135. Krauss AH-P, Woodward DF. Update on the mechanism of action of bimatoprost: a review and discussion of new evidence. *Surv Ophthalmol*. 1 mars 2004;49(2, Supplement 1):S5-11.
136. Williams, R.D., Cohen, J.S., Gross, R.L., Liu, C.C., Safyan, E., Batoosingh, A.L. & Bimatoprost Study Group. Long-term efficacy and safety of bimatoprost for intraocular pressure lowering in glaucoma and ocular hypertension: year 4. *Br J Ophthalmol*. 1 oct 2008;92(10):1387-92.
137. Palleria, C., Leporini, C., Chimirri, S., Marrazzo, G., Sacchetta, S., Bruno, L., Lista, R.M., Staltari, O., Scuteri, A., Scicchitano, F. & Russo, E. Limitations and obstacles of the

- spontaneous adverse drugs reactions reporting: Two “challenging” case reports. *J Pharmacol Pharmacother.* déc 2013;4(Suppl1):S66-72.
138. Shen J, Goodkin ML, Tong W, Attar M. Ocular pharmacokinetics and tolerability of bimatoprost ophthalmic solutions administered once or twice daily in rabbits, and clinical dosing implications. *Clin Ophthalmol Auckl NZ.* 2017;11:1761.
  139. Woodward, D.F., Krauss, A.P., Chen, J., Lai, R.K., Spada, C.S., Burk, R.M., Andrews, S.W., Shi, L., Liang, Y., Kedzie, K.M. & Chen, R. The Pharmacology of Bimatoprost (Lumigan™). *Surv Ophthalmol.* 1 mai 2001;45:S337-45.
  140. Greig SL, Deeks ED. Brinzolamide/Brimonidine: A Review of Its Use in Patients with Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension. *Drugs Aging.* 1 mars 2015;32(3):251-60.
  141. Hoffmanová I, Sánchez D. Metabolic acidosis and anaemia associated with dorzolamide in a patient with impaired renal function. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(4):796-9.
  142. Yeh J, Kravitz D, Francis B. Rational use of the fixed combination of dorzolamide – timolol in the management of raised intraocular pressure and glaucoma. *Clin Ophthalmol Auckl NZ.* juin 2008;2(2):389-99.
  143. Ichhpujani P, Katz LJ. Efficacy, safety and tolerability of combination therapy with timolol and dorzolamide in glaucoma and ocular hypertension. *Drug Healthc Patient Saf.* 24 mai 2010;2:73-83.
  144. Biollaz, J., Munafo, A., Buclin, T., Gervasoni, J.P., Magnin, J.L., Jaquet, F. & Brunner-Ferber, F. Whole-blood pharmacokinetics and metabolic effects of the topical carbonic anhydrase inhibitor dorzolamide. *Eur J Clin Pharmacol.* 1 janv 1995;47(5):453-60.
  145. Hall, R., Havner, G., Baker, J., Stafford, G., Schneider, W., Lin, W.Y., May, J., Curtis, M., Struble, C., McCue, B. & Jasheway, D. Brinzolamide. Dans: *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* [Internet]. Academic Press; 1999 [cité 29 avr 2020]. p. 47-96. Disponible à: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099542808606218>
  146. DeSantis L. Preclinical Overview of Brinzolamide. *Surv Ophthalmol.* 1 janv 2000;44:S119-29.
  147. Meyer MR, Schütz A, Maurer HH. Contribution of human esterases to the metabolism of selected drugs of abuse. *Toxicol Lett.* 5 janv 2015;232(1):159-66.
  148. Fukami T, Yokoi T. The emerging role of human esterases. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27(5):466-77.
  149. Li P, Callery PS, Gan L-S, Balani SK. Esterase Inhibition by Grapefruit Juice Flavonoids Leading to a New Drug Interaction. *Drug Metab Dispos.* 1 juill 2007;35(7):1203-8.
  150. Zhu H-J, Appel DI, Peterson YK, Wang Z, Markowitz JS. Identification of selected therapeutic agents as inhibitors of carboxylesterase 1: Potential sources of metabolic drug interactions. *Toxicology.* 11 avr 2010;270(2):59-65.
  151. Marsh, S., Xiao, M., Yu, J., Ahluwalia, R., Minton, M., Freimuth, R.R., Kwok, P.Y. & McLeod, H.L. Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics.* 1 oct 2004;84(4):661-8.

152. Williams RD. Efficacy of bimatoprost in glaucoma and ocular hypertension unresponsive to latanoprost. *Adv Ther.* 1 nov 2002;19(6):275-81.
153. Kahook, M.Y., Serle, J.B., Mah, F.S., Kim, T., Raizman, M.B., Heah, T., Ramirez-Davis, N., Kopczynski, C.C., Usner, D.W., Novack, G.D. & ROCKET-2 Study Group. Long-term Safety and Ocular Hypotensive Efficacy Evaluation of Netarsudil Ophthalmic Solution: Rho Kinase Elevated IOP Treatment Trial (ROCKET-2). *Am J Ophthalmol.* 1 avr 2019;200:130-7.
154. Sinha S, Lee D, Kolomeyer NN, Myers JS, Razeghinejad R. Fixed combination netarsudil-latanoprost for the treatment of glaucoma and ocular hypertension. *Expert Opin Pharmacother.* 2 janv 2020;21(1):39-45.
155. Berryman JD, Novack GD. Efficacy and safety of netarsudil 0.02% ophthalmic solution in patients with open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Expert Rev Ophthalmol.* 3 sept 2019;14(4-5):191-7.
156. Dalvie D, Di L. Aldehyde oxidase and its role as a drug metabolizing enzyme. *Pharmacol Ther.* 1 sept 2019;201:137-80.
157. Sanoh S, Tayama Y, Sugihara K, Kitamura S, Ohta S. Significance of aldehyde oxidase during drug development: Effects on drug metabolism, pharmacokinetics, toxicity, and efficacy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 1 févr 2015;30(1):52-63.
158. Tayama, Y., Sugihara, K., Sanoh, S., Miyake, K., Kitamura, S. & Ohta, S. Developmental Changes of Aldehyde Oxidase Activity and Protein Expression in Human Liver Cytosol. *Drug Metab Pharmacokinet.* 1 janv 2012;27(5):543-7.
159. Garattini E, Terao M. The role of aldehyde oxidase in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 1 avr 2012;8(4):487-503.
160. Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human Liver Aldehyde Oxidase: Inhibition by 239 Drugs. *J Clin Pharmacol.* 2004;44(1):7-19.
161. Ni, J., Rowe, J., Heidelbaugh, T., Sinha, S. & Acheampong, A. Characterization of benzimidazole and other oxidative and conjugative metabolites of brimonidine in vitro and in rats in vivo using on-line H/D exchange LC-MS/MS and stable-isotope tracer techniques. *Xenobiotica.* 2007;37(2):205-20.
162. Acheampong, A.A., Chien, D.S., Lam, S., Vekich, S., Breau, A., Usansky, J., Harcourt, D., Munk, S.A., Nguyen, H., Garst, M. & Tang-Liu, D. Characterization of brimonidine metabolism with rat, rabbit, dog, monkey and human liver fractions and rabbit liver aldehyde oxidase. *Xenobiotica.* 1996;6(10):1035-55.
163. Bowman RJC, Cope J, Nischal KK. Ocular and systemic side effects of brimonidine 0.2% eye drops (Alphagan®) in children. *Eye.* janv 2004;18(1):24-6.
164. © 2010 Allergan, Inc. ALPHAGAN® P (brimonidine tartrate ophthalmic solution) 0.1% and 0.15%. 2010.
165. Danish Medicines Agency. PRODUKTRESUMÉ for Brimonidine/Timolol « Tiefenbacher », øjendråber, opløsning. Lægemiddelstyrelsen,; 2020.
166. Levy Y, Zadok D. Systemic Side Effects of Ophthalmic Drops. *Clin Pediatr (Phila).* 1 janv 2004;43(1):99-101.

167. Enyedi LB, Freedman SF. Safety and efficacy of brimonidine in children with glaucoma. *J Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1 oct 2001;5(5):281-4.
168. Al-Shahwan, S., Al-Torbak, A.A., Turkmani, S., Al-Omran, M., Al-Jadaan, I. & Edward, D.P. Side-Effect Profile of Brimonidine Tartrate in Children. *Ophthalmology*. 1 déc 2005;112(12):2143.e1-2143.e7.
169. European Medicines Agency. SIMBRINZA 10 mg/mL + 2 mg/mL eye drops, suspension. 2019.
170. Schuman JS. Clinical experience with brimonidine 0.2% and timolol 0.5% in glaucoma and ocular hypertension. *Surv Ophthalmol*. 1 nov 1996;41:S27-37.
171. Allergan Inc., L6G 0B5. PrLUMIGAN RC® Bimatoprost Ophthalmic Solution 0.01% w/v Elevated Intraocular Pressure Therapy Prostanoid Analogue. 2016.
172. Danish Medicines Agency. PRODUKTRESUMÉ for Bimatoprost « Pharmathen », øjendråber, opløsning 0,3 mg/ml. *Lægemiddelstyrelsen*; 2019.
173. Food and Drug Administration. LUMIGAN® 0.01% and 0.03% (bimatoprost ophthalmic solution). 2010.
174. Patel SS, Spencer CM. Latanoprost. *Drugs Aging*. 1 nov 1996;9(5):363-78.
175. Fukano Y, Kawazu K, Akaishi T, Bezwada P, Pellinen P. Metabolism and Ocular Tissue Distribution of an Antiglaucoma Prostanoid, Tafluprost, After Ocular Instillation to Monkeys. *J Ocul Pharmacol Ther*. juin 2011;27(3):251-9.
176. Du J. Tafluprost. Dans: *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics* [Internet]. American Cancer Society; 2014 [cité 20 avr 2020]. p. 1-3. Disponible à: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118541203.xen529>
177. Bushee JL, Dunne CE, Argikar UA. An *in vitro* approach to investigate ocular metabolism of a topical, selective  $\beta$  1-adrenergic blocking agent, betaxolol. *Xenobiotica*. 4 mai 2015;45(5):396-405.
178. Volotinen, M., Turpeinen, M., Tolonen, A., Uusitalo, J., Mäenpää, J. & Pelkonen, O. Timolol Metabolism in Human Liver Microsomes Is Mediated Principally by CYP2D6. *Drug Metab Dispos*. juill 2007;35(7):1135-41.
179. Lee, V. H., Chien, D. S. & Sasaki, H. Ocular ketone reductase distribution and its role in the metabolism of ocularly applied levobunolol in the pigmented rabbit. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;246(3):871-8.
180. Gonzalez JP, Clissold SP. Ocular Levobunolol: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy. *Drugs*. déc 1987;34(6):648-61.
181. Argikar, U.A., Dumouchel, J.L., Dunne, C.E., Saran, C., Cirello, A.L. & Gunduz, M. Ocular Metabolism of Levobunolol: Historic and Emerging Metabolic Pathways. *Drug Metab Dispos*. 1 août 2016;44(8):1304-12.
182. Henness S, Harrison TS, Keating GM. Ocular Carteolol. *Drugs Aging*. 1 juin 2007;24(6):509-28.



183. Umehara K, Kudo S, Odomi M. Involvement of CYP2D1 in the metabolism of carteolol by male rat liver microsomes. *Xenobiotica*. janv 1997;27(11):1121-9.
184. Ishii, Y., Nakamura, K., Matsuki, S., Uemura, N., Muraguchi, R., Nakagawa, M., Nakano, S. & Nakatsuka, K. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Differences between Ocular and Nasal Instillation of Carteolol on Intraocular Pressure and Heart Rate in Japanese Men with High CYP2D6 Activity. *J Clin Pharmacol*. 2002;42(9):1020-6.
185. Kudo S, Uchida M, Odomi M. Metabolism of carteolol by cDNA-expressed human cytochrome P450. *Eur J Clin Pharmacol*. 1 sept 1997;52(6):479-85.
186. Acheampong, A.A., Chien, D.S., Lam, S., Vekich, S., Breau, A., Usansky, J., Harcourt, D., Munk, S.A., Nguyen, H., Garst, M. & Tang-Liu, D. Characterization of brimonidine metabolism with rat, rabbit, dog, monkey and human liver fractions and rabbit liver aldehyde oxidase. *Xenobiotica*. janv 1996;26(10):1035-55.
187. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev*. janv 2002;34(1-2):83-448.
188. Martens-Lobenhoffer J, Banditt P. Clinical Pharmacokinetics of Dorzolamide. *Clin Pharmacokinet*. 1 mars 2002;41(3):197-205.
189. Lin, C.W., Sherman, B., Moore, L.A., Laethem, C.L., Lu, D.W., Pattabiraman, P.P., Rao, P.V., deLong, M.A. & Kopczynski, C.C. Discovery and Preclinical Development of Netarsudil, a Novel Ocular Hypotensive Agent for the Treatment of Glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther*. 1 mars 2018;34(1-2):40-51.
190. Ellis PP, Littlejohn K. Pilocarpine hydrolysis: clinical significance. *Invest Ophthalmol*. déc 1973;12(12):931-3.
191. Kimonen T, Juvonen RO, Alhava E, Pasanen M. The inhibition of CYP enzymes in mouse and human liver by pilocarpine. *Br J Pharmacol*. févr 1995;114(4):832-6.
192. Huang DY, Furukawa A, Ichikawa Y. Molecular cloning of retinal oxidase/aldehyde oxidase cDNAs from rabbit and mouse livers and functional expression of recombinant mouse retinal oxidase cDNA in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*. 15 avr 1999;364(2):264-72.
193. Shimada S, Mishima HK, Nikaido H, Kitamura S, Tatsumi K. Metabolism of drugs in the eye. Menadione-dependent reduction of tertiary amine N-oxide by preparations from bovine ocular tissues. *Curr Eye Res*. 1 janv 1989;8(12):1309-13.
194. Waltman S, Sears M. Catechol-O-methyl Transferase and Monoamine Oxidase Activity in the Ocular Tissues of Albino Rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 déc 1964;3(6):601-5.
195. Shanthaveerappa TR, Bourne GH. Monoamine oxidase distribution in the rabbit eye. *J Histochem Cytochem*. 1 avr 1964;12(4):281-7.
196. McAvoy M, Singh AK, Shichi H. In Situ Hybridization of Cyp1a1, Cyp1a2 and Ah Receptor mRNAs Expressed in Murine Ocular Tissues. *Exp Eye Res*. 1 avr 1996;62(4):449-52.
197. Zhao C, Shichi H. Immunocytochemical study of cytochrome P450 (1A1/1A2) induction in murine ocular tissues. *Exp Eye Res*. 1 févr 1995;60(2):143-52.

198. Offord, E.A., Sharif, N.A., Mace, K., Tromvoukis, Y., Spillare, E.A., Avanti, O., Howe, W.E. & Pfeifer, A.M. Immortalized human corneal epithelial cells for ocular toxicity and inflammation studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 mai 1999;40(6):1091-101.
199. Volotinen, M., Mäenpää, J., Kankuri, E., Oksala, O., Pelkonen, O., Nakajima, M., Yokoi, T. & Hakkola, J. Expression of cytochrome P450 (CYP) enzymes in human nonpigmented ciliary epithelial cells: induction of CYP1B1 expression by TCDD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* juill 2009;50(7):3099-105.
200. Attar M, Ling K-HJ, Tang-Liu DD-S, Neamati N, Lee VHL. Cytochrome P450 3A Expression and Activity in the Rabbit Lacrimal Gland: Glucocorticoid Modulation and the Impact on Androgen Metabolism. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 déc 2005;46(12):4697-706.
201. Dias CS, Anand BS, Mitra AK. Effect of Mono- and Di-acylation on the Ocular Disposition of Ganciclovir: Physicochemical Properties, Ocular Bioreversion, and Antiviral Activity of Short Chain Ester Prodrugs. *J Pharm Sci.* mars 2002;91(3):660-8.
202. Lee VH, Chang SC, Oshiro CM, Smith RE. Ocular esterase composition in albino and pigmented rabbits: possible implications in ocular prodrug design and evaluation. *Curr Eye Res.* nov 1985;4(11):1117-25.
203. Ellis PP. Ocular tissue cholinesterases kinetics of enzyme activity and inhibition. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1971;69:358-82.
204. Heikkinen, E.M., del Amo, E.M., Ranta, V.P., Urtti, A., Vellonen, K.S. & Ruponen, M. Esterase activity in porcine and albino rabbit ocular tissues. *Eur J Pharm Sci.* 15 oct 2018;123:106-10.
205. Holmes RS, Vandeberg JL. Ocular NAD-dependent alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the baboon. *Exp Eye Res.* sept 1986;43(3):383-96.
206. Nakamura K, Fujiki T, Tamura H. Age, gender and region-specific differences in drug metabolising enzymes in rat ocular tissues. *Exp Eye Res.* déc 2005;81(6):710-5.
207. Shichit H, Nebertt DW. Genetic differences in drug metabolism associated with ocular toxicity. *Environ Health Perspect.* 1982;11.
208. JB 3rd W, Dp W, Ra S. Comparative study of phase II biotransformation in rabbit ocular tissues. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 1 mai 1991;19(3):708-13.
209. Yuan, H., Yu, M., Yang, Y., Wu, K., Lin, X. & Li, J. Association of CYP2D6 Single-Nucleotide Polymorphism with Response to Ophthalmic Timolol in Primary Open-Angle Glaucoma—A Pilot Study. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1 oct 2010;26(5):497-501.
210. Yang Y, Wu K, Yuan H, Yu M. Cytochrome Oxidase 2D6 Gene Polymorphism in Primary Open-Angle Glaucoma With Various Effects to Ophthalmic Timolol. *J Ocul Pharmacol Ther.* 14 mars 2009;25(2):163-72.
211. McCarty CA, Burmester JK, Mukesh BN, Patchett RB, Wilke RA. Intraocular Pressure Response to Topical  $\beta$ -Blockers Associated With an ADRB2 Single-Nucleotide Polymorphism. *Arch Ophthalmol.* 14 juill 2008;126(7):959-63.

212. Edeki TI, He H, Wood AJJ. Pharmacogenetic Explanation for Excessive  $\beta$ -Blockade Following Timolol Eye Drops: Potential for Oral-Ophthalmic Drug Interaction. *JAMA*. 22 nov 1995;274(20):1611-3.
213. Volotinen, M., Mäenpää, J., Kautiainen, H., Tolonen, A., Uusitalo, J., Ropo, A., Vapaatalo, H. & Aine, E., 2009. Ophthalmic timolol in a hydrogel vehicle leads to minor inter-individual variation in timolol concentration in aqueous humor. *Eur J Pharm Sci*. 15 févr 2009;36(2):292-6.
214. Kim, J., Kudisch, M., Mudumba, S., Asada, H., Aya-Shibuya, E., Bhisitkul, R.B. & Desai, T.A. Biocompatibility and Pharmacokinetic Analysis of an Intracameral Polycaprolactone Drug Delivery Implant for Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. août 2016;57(10):4341-6.
215. Lee SS, Hughes P, Ross AD, Robinson MR. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. *Pharm Res*. oct 2010;27(10):2043-53.
216. Franca, J.R., Foureaux, G., Fuscaldi, L.L., Ribeiro, T.G., Rodrigues, L.B., Bravo, R., Castilho, R.O., Yoshida, M.I., Cardoso, V.N., Fernandes, S.O. & Cronemberger, S. Bimatoprost-Loaded Ocular Inserts as Sustained Release Drug Delivery Systems for Glaucoma Treatment: In Vitro and In Vivo Evaluation. *PLoS ONE* [Internet]. 30 avr 2014 [cité 25 mai 2020];9(4). Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005758/>
217. Zhang X, Cao X, Qi P. Therapeutic contact lenses for ophthalmic drug delivery: major challenges. *J Biomater Sci Polym Ed*. mars 2020;31(4):549-60.
218. Craven, E.R., Walters, T., Christie, W.C., Day, D.G., Lewis, R.A., Goodkin, M.L., Chen, M., Wangsadipura, V., Robinson, M.R. & Bejanian, M. 24-Month phase I/II clinical trial of bimatoprost sustained-release implant (Bimatoprost SR) in glaucoma patients. *Drugs*. 1 févr 2020;80(2):167-79.
219. Singh RB, Ichhpujani P, Thakur S, Jindal S. Promising therapeutic drug delivery systems for glaucoma: a comprehensive review. *Ther Adv Ophthalmol* [Internet]. 13 mars 2020 [cité 25 mai 2020];12. Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7074511/>
220. Šrejber M, Navrátilová V, Paloncýová M, Bazgier V, Berka K, Anzenbacher P, et al. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *J Inorg Biochem*. 2018;183:117-36.
221. Unwalla RJ, Cross JB, Salaniwal S, Shilling AD, Leung L, Kao J, et al. Using a homology model of cytochrome P450 2D6 to predict substrate site of metabolism. *J Comput Aided Mol Des*. mars 2010;24(3):237-56.
222. Don CG, Smieško M. Microsecond MD simulations of human CYP2D6 wild-type and five allelic variants reveal mechanistic insights on the function. *PLoS ONE* [Internet]. 22 août 2018 [cité 23 juin 2020];13(8). Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6104999/>
223. Dong AN, Ahemad N, Pan Y, Palanisamy UD, Yiap BC, Ong CE. Functional and structural characterisation of common cytochrome P450 2D6 allelic variants-roles of Pro34 and Thr107 in catalysis and inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2019;392(8):1015-29.

224. Fukuyoshi S, Kometani M, Watanabe Y, Hiratsuka M, Yamaotsu N, Hirono S, et al. Molecular Dynamics Simulations to Investigate the Influences of Amino Acid Mutations on Protein Three-Dimensional Structures of Cytochrome P450 2D6.1, 2, 10, 14A, 51, and 62. *PloS One*. 2016;11(4):e0152946.
225. Glass SM, Martell CM, Oswald AK, Osorio-Vasquez V, Cho C, Hicks MJ, et al. CYP2D6 Allelic Variants \*34, \*17-2, \*17-3, and \*53 and a Thr309Ala Mutant Display Altered Kinetics and NADPH Coupling in Metabolism of Bufuralol and Dextromethorphan and Altered Susceptibility to Inactivation by SCH 66712. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2018;46(8):1106-17.
226. CYP2D6 - Overview [Internet]. PharmGKB. [cité 7 mars 2021]. Disponible à: <https://www.pharmgkb.org/gene/PA128>
227. Vaz RJ, Nayeem A, Santone K, Chandrasena G, Gavai AV. A 3D-QSAR model for CYP2D6 inhibition in the aryloxypropanolamine series. *Bioorg Med Chem Lett*. 1 sept 2005;15(17):3816-20.
228. Advani P, Joseph B, Ambre P, Pissurlenkar R, Khedkar V, Iyer K, et al. In silico optimization of pharmacokinetic properties and receptor binding affinity simultaneously: a « parallel progression approach to drug design » applied to  $\beta$ -blockers. *J Biomol Struct Dyn*. 2016;34(2):384-98.

## Annexes

---

Annexe 1. Etude statistique sur les différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des 57 médicaments les plus prescrits pour les pathologies oculaires.....	78
Annexe 2. Informations supplémentaires .....	82

## Annexe 1. Etude statistique sur les différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des 57 médicaments les plus prescrits pour les pathologies oculaires.

Tableau 7 : Les principaux médicaments prescrits pour les pathologies oculaires et les enzymes dont ils sont substrats, inhibiteurs, inducteurs.

Drugs	Enzyme	Action
Levofloxacin	CYP1A2	Inhibiteur
Levofloxacin	CYP2C9	Inhibiteur
Lomefloxacin	-	
Ciprofloxacin	CYP1A2	Inhibiteur
Ciprofloxacin	CYP3A4	Inhibiteur
Moxifloxacin	UFT1A1	Substrat
Moxifloxacin	SULT2A1	Substrat
Ofloxacin	-	
Gatifloxacin	-	
Gentamicin	-	
Tobramycin	-	
Neomycin	-	
Azithromycin	CYP3A4	Substrat faible
Chloramphenicol	CYP3A4	Inhibiteur
Chloramphenicol	CYP2C19	Inhibiteur
Chloramphenicol	CYPD6	Inhibiteur faible
Vancomycin	-	
Polymyxin B	-	
Colistin	-	
Oxytetracycline	-	
Fusidic acid	CYP2D6	Substrat
Fusidic acid		Inhibiteur
Fusidic acid	CYP3A4	Substrat
Fusidic acid		Inhibiteur
Fusidic acid	UGT1A1	Substrat
Cefuroxime	-	
Ceftazidime	-	
Trifluridine		
Ganciclovir		
Aciclovir	-	
Bepotastine	-	
Cetirizine	CYP3A4	Substrat
Olopatadine	CYP3A	Substrat
Ketotifen	-	
Azelastine	CYP3A4	Substrat
Azelastine		Inhibiteur (clinically insignificant)
Azelastine	CYP2D6	Substrat
Azelastine	CYP1A2	Substrat
Azelastine	CYP2C9	Inhibiteur (clinically insignificant)

Azelastine	CYP2C19	Inhibiteur (clinically insignificant)
Antazoline	-	
Emedastine	CYP	Substrat
Levocabastine	-	
Cromolyn	-	
Pemiroloast	CYP11A1	Inducteur
Cyclosporine	CYP3A5	Substrat
Cyclosporine	CYP3A4	Substrat
Cyclosporine	CYP3A4	Inhibiteur
Cyclosporine	<i>CYP2C19</i>	<i>Inhibiteur</i>
Cyclosporine	<i>CYP2D6</i>	<i>Inhibiteur</i>
Naphazoline	-	
Difluprednate	de-17-side chain-glucocorticoid metabolite (DF21C)	Metabolite
Loteprednol	Esterases	
Dexamethasone	CYP3A4	Substrat
Dexamethasone	CYP3A4	Inducteur
Dexamethasone	CYP3A5	Inducteur
Dexamethasone	CYP3A7	Inducteur
Dexamethasone	CYP2A6	Inducteur
Dexamethasone	CYP2B6	Inducteur
Dexamethasone	CYP2C19	Inducteur faible
Dexamethasone	CYP2C8	Inducteur faible
Dexamethasone	CYP2C9	Inducteur faible
Dexamethasone	CYP3A43	Inducteur
Dexamethasone	CYP4A11	Inducteur
Dexamethasone	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	Substrat
Dexamethasone	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2	Substrat
Hydrocortisone	CYP3A4	Substrat
Hydrocortisone	CYP3A4	Inducteur
Hydrocortisone	CYP3A5	Substrat
Hydrocortisone	CYP3A7	Substrat
Hydrocortisone	CYP2C8	Inducteur
Hydrocortisone	CYP2A6	Inducteur
Hydrocortisone	CYP1B1	Inducteur
Hydrocortisone	CYP2C9	Inducteur
Hydrocortisone	CYP2C19	Inducteur
Hydrocortisone	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	Substrat
Hydrocortisone	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2	Substrat
Hydrocortisone	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	Substrat
Hydrocortisone	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 2	Substrat
Prednisolone	CYP3A4	Substrat
Prednisolone	CYP3A4	Inducteur
Ketorolac	CYP2C8	Substrat
Ketorolac	CYP2C9	Substrat
Ketorolac	UGT2B7	Substrat
Diclofenac	CYP2C9	Substrat

Diclofenac	CYP2C9	Inhibiteur
Diclofenac	CYP2C19	Substrat
Diclofenac	CYP2C8	Substrat
Diclofenac	CYP3A4	Inhibiteur
Diclofenac	CYP2B6	Substrat
Diclofenac	CYP2C18	Substrat
Diclofenac	UGT2B7	Substrat
Diclofenac	UGT1A3	Substrat
Diclofenac	UGT1A9	Substrat
Diclofenac	UGT2B4	Substrat
Nepafenac	Intraocular hydrolases	Substrat
Bromfenac	UGT2B7	Substrat
Bromfenac	UGT1A4	Substrat
Bromfenac	CYP2C9	Substrat
Bromfenac	CYP1A2	Substrat
Bromfenac	CYP3A4	Substrat
Bromfenac	CYP1A2	Inhibiteur
Bromfenac	CYP3A4	Inhibiteur
Bimatoprost	CYP3A4	Substrat
Travoprost	Hydrolysis (esterases)	
Travoprost	$\beta$ -oxidation	
Latanoprost	Hydrolysis (esterases)	
Latanoprost	$\beta$ -oxidation	
Tafluprost	Hydrolysis (esterases)	
Unoprostone	Hydrolysis (esterases)	
Betaxolol	CYP1A2	Substrat
Betaxolol	CYP2D6	Substrat
Timolol	CYP2D6	Substrat
Timolol	CYP2C19	Substrat
Brimonidine	Aldehyde oxidase	Substrat
Apraclonidine	-	
Acetazolamide	-	
Brinzolamide	CYP3A4	Substrat
Dorzolamide	CYP2C9	Substrat
Dorzolamide	CYP3A2/4	Substrat
Dorzolamide	CYP2B	Substrat
Dorzolamide	CYP2E1	Substrat
Netarsudil	Esterase metabolite (5 fold greater potency than Netarsudil)	
Phenylephrine	Amine-oxidase [flavin-containing] A (MAOA)	Substrat
Phenylephrine	Amine-oxidase [flavin-containing] B (MAOB)	Substrat
Phenylephrine	Sulfotransferase 1A3/1A4	Substrat
Phenylephrine	Glucuronase	Substrat
Phenylephrine	CYP1A2	Inducteur
Pilocarpine	CYP2A6	Inhibiteur
Pilocarpine	CYP2A6	Substrat
Pilocarpine	CYP2A13	Inhibiteur



Pilocarpine	CYP2E1	Inhibiteur
Pilocarpine	CYP3A4	Inhibiteur
Pilocarpine	Esterases	Substrat

## Annexe 2. Informations supplémentaires

Tableau 8 : Inhibiteurs et inducteurs des DMEs impliqués dans le métabolisme des médicaments anti-glaucomeux selon la FDA

	Classe pharmacologique	Médicament
		<b>Inhibiteurs</b>
<b>Esterases</b>		éthanol, flavonoïdes (jus de pamplemousse)
	Anti-hypertenseurs	telmisartan
	Anti-dépresseurs	aripiprazole
	Antipsychotiques	fluoxetine, perphenazine, thioridazine
	Antidiarrhéiques	loperamide
<b>Aldéhyde oxydase</b>	Hormones et analogues	raloxifene, fulvestrant, tamoxifen, oral contraceptives
	Anti-dépresseurs	amitriptyline, clomipramine
	Antipsychotiques	chlorpromazine, quetiapine, loxapine, clozapine, olanzapine
	Anti-histaminiques H1	loratadine, prométhazine
	Anti-hypertenseurs, anti-arythmiques	amlodipine, felodipine, verapamil, propafenone
	Antiémétiques	ondansetron, domperidone, metoclopramide
	Antidiarrhéiques	loperamide
	Antifongiques, Antibiotiques	ketoconazole, erythromycin
<b>CYP1A2</b>		methoxsalen, mexiletine, allopurinol
	Hormones et analogues	oral contraceptives
	Immunomodulateurs	peginterferon $\alpha$ -2a
	Anti-dépresseurs	fluvoxamine
	Antibiotiques, antiviraux	ciprofloxacine, enoxacine, acyclovir
<b>CYP2C19</b>	Antipsychotiques	fluoxetine
	Antiépileptiques	felbamate
	Antithrombotiques	ticlopidine
	Antifongiques	fluconazole, voriconazole
	Anti-acides	omeprazole

<b>CYP2D6</b>	Hormones et analogues	cinacalcet, abiraterone, mirabegron
	Anxiolytiques	clobazam
	Anti-dépresseurs	bupropion, duloxetine, fluvoxamine, escitalopram, sertraline
	Antipsychotiques	fluoxetine, paroxetine, thioridazine
	Anti-hypertenseurs, anti-arythmiques	quinidine, amiodarone, labetalol
	Antifongiques, antiviraux	terbinafine, ritonavir
	Anti-acides	cimetidine
	Antiinflammatoires	celecoxib
<b>CYP3A4</b>		Jus de pamplemousse
		ivacaftor
	Antinéoplasiques	crizotinib, imatinib
	Immunosuppresseurs	cyclosporine
	Anti-dépresseurs	fluvoxamine
	Anti-thrombotiques	ticagrelor
	Anti-hypertenseurs, anti-arythmiques	diltiazem, dronedarone, verapamil, lomitapide
	Antifongiques, antibiotiques, antiviraux	boceprevir, cobicistat, ritonavir, itraconazole, ketoconazole, posaconazole, telaprevir, telithromycin, troleandomycin, voriconazole, ciprofloxacin, erythromycin, fluconazole, chlorzoxazone, clotrimazole
	Antiémétiques	aprepitant, fosaprepitant
	Anti-acides	cimetidine, ranitidine
<b>UGTs</b>		probenecid
	Immunosuppresseurs	tacrolimus
	Antiépileptiques	valproic acid, sodium valproate, felbamate
	Anti-hypertenseurs, anti-arythmiques	propranolol
	Antiinflammatoires	diclofenac, indomethacin, naproxen
	Antiparasitaires, antifongiques	atovaquone, fluconazole
	Anti-acides	cimetidine, ranitidine
<b>Inducteurs</b>		
<b>CYP 1A2</b>		Tabagisme

	Immunomodulateurs	teriflunomide
	Antiépileptiques	phenytoin
	Antibiotiques, antiviraux	rifampin, ritonavir
<b>CYP2C19</b>	Hormones et analogues	apalutamide, enzalutamide
	Antiépileptiques	phenytoin
	Antibiotiques, antiviraux	rifampin, ritonavir, efavirenz
<b>CYP3A4</b>		amodafinil, modafinil
	Hormones et analogues	apalutamide, enzalutamide
	Antineoplasiques	mitotane
	Antiépileptiques	carbamazepine, phenytoin, phenobarbital, primidone, rufinamide
	Antibiotiques, antiviraux	rifampin, efavirenz
<b>UGTs</b>	Hormones et analogues	oral contraceptive steroids
	Antiépileptiques	carbamazepine, phenytoin, phenobarbital
	Antibiotiques, antiviraux	rifampin

## Serment De Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

## **Les méthodes *in silico* dans la recherche pharmaceutique. Exemple d'application pour l'étude pharmacocinétique post-autorisation de mise sur le marché des $\beta$ -bloquants utilisés pour le traitement du glaucome.**

---

Contrairement aux méthodes traditionnelles, au centre de toute stratégie de recherche pharmaceutique actuelle se trouve une population de patients ciblée et non pas une pathologie. L'avantage de cette stratégie est la diminution des effets indésirables ainsi que l'amélioration de l'efficacité du traitement. Les méthodes *in silico* occupent actuellement une place indispensable dans la recherche et le développement pharmaceutique, et ce à toutes les étapes du processus. En prenant le traitement du glaucome comme cas d'étude, cette thèse montre comment les outils *in silico* de modélisation moléculaire trouve une place idéale dans les stratégies de personnalisation des thérapies. Les différentes méthodes de recherche *in silico* basées sur le ligand (dynamique et docking moléculaire) et leurs applications dans la recherche pharmaceutique sont décrites dans la première partie de la thèse. La deuxième partie traite de la physiopathologie et du traitement du glaucome, en se focalisant sur le cas du Timolol. Timolol est en effet le médicament de choix pour le traitement du glaucome, mais il a un profil d'effets indésirables variable qui selon des études est potentiellement dû à son métabolisme par le cytochrome CYP2D6. Dans la dernière partie de la thèse, nous montrons comment des études computationnelles ont permis d'élucider les interactions entre Timolol et CYP2D6 pour participer à l'amélioration du profil de ce médicament.

---

Mots-clés : médicaments du glaucome, CYP2D6, Timolol, dynamique moléculaire, docking moléculaire

## **In silico methods applied in pharmaceutical research. An example of use for the post-authorization pharmacokinetics study of $\beta$ -blockers used for the treatment of glaucoma.**

---

At the center of every strategy in pharmaceutical research is the targeted sample in a population suffering from a given disease. Targeting a specific population aims at minimizing side effects while increasing efficacy. This however had not been the focus of traditional drug discovery, as it had focused on the disease itself, while the patient variability was not taken into consideration. The advent of *in silico* methods in almost all stages of drug discovery, allows a better focus on personalized strategies. Here we show how molecular modeling (*in silico*) tools can support optimization of profiling for drugs currently used in the treatment of glaucoma. The different ligand-based *in silico* methods (molecular dynamics and molecular docking) and their applications in pharmaceutical research are described in the first part of the manuscript. The second part of this thesis presents the physiopathology and treatment of glaucoma focusing on the case of Timolol. Timolol is in fact the first-choice treatment for glaucoma, which has been associated with side-effects for which the frequency and severity is variable. This phenomenon is potentially caused by the highly variable cytochrome, CYP2D6, responsible for Timolol metabolism. The end of the thesis shows computational studies which enable deciphering intermolecular interactions between Timolol and CYP2D6 and how such studies can support the research for optimizing the profile of drugs.

---

Keywords: glaucoma drugs, CYP2D6, Timolol, molecular dynamics, molecular docking

