



ROYAUME DU MAROC
Université Mohammed V - Rabat
Faculté de Médecine et de Pharmacie
RABAT



Année 2022

N° :MM0372022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « Biotechnologie Médicale »

OPTION : « Biomédicale »

Intitulé

Evaluation in silico des effets des mutations ponctuelles sur la protéine BRAF et leur impact sur le choix de traitement

Soutenu par :

JOUHAINA KOUROU

Devant le jury composé de :

Pr. Azeddine Ibrahim, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Président

Pr. Mouna Ouadghiri, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Examinatrice

Pr. Ilham Kandoussi, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Encadrante

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie Allah, tout puissant, de m'avoir donné la force, la patience et le courage pour mener à terme ma formation et pouvoir réaliser ce travail, ainsi que l'audace et la patience pour dépasser toutes les difficultés.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon Maître **Pr. IBRAHIMI Azeddine**, directeur du laboratoire de Biotechnologie Médicale à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, pour ses encouragements, et sa contribution à la progression et l'avancement de la recherche scientifique au Maroc. Sa bonté, sa modestie et son dévouement au travail nous ont énormément marqué et nous servent d'exemple. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Je tiens à exprimer ma gratitude au **Pr. OUADGHIRI Mouna**, coordinatrice du Master Biotechnologie Médicale, qui a contribué au bon déroulement du Master de Biotechnologie Médicale. Veuillez accepter Madame, l'assurance de mon estime et de mon profond respect.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon encadrante **Pr. KANDOUSI Ilham**. Je vous remercie madame pour votre patience, votre encouragement, votre enthousiasme, vos remarques judicieuses et votre suivi tout au long l'élaboration de ce projet. Vous m'avez appris plusieurs choses, ainsi vous m'avez ouvert les yeux sur des nouveaux concepts et techniques, qui vont améliorer mon chemin de recherche scientifique et m'améliorer autant qu'une personne.

Mes sincères remerciements à tous les membres du laboratoire de Biotechnologie médicale, qui sont toujours prêts à aider tout le monde malgré leurs occupations.

Un remerciement chaleureux pour toutes les doctorantes du MedBiotech et mes collègues, qui n'ont jamais cessé de partager leurs connaissances et qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Dédicaces

A ma douce ange décédée,

Je rends hommage par ce projet à ma grand-mère, qui a rendu son âme au demeure céleste, après qu'elle a remué ciel et terre, en essayant de battre le cancer. Durant ma vie, elle a été toujours ma personne confort, elle n'a jamais cessé de me faire sourire et de me soutenir dans ma vie. La voir se transformer d'une belle fleur, pleine d'énergie et enthousiasme, en une fleur fanée à cause de chimiothérapie, m'a donné la peine au cœur, jusqu'à nos jours. Son sourire, sa gentillesse, son support émotionnelle n'a jamais quitté ma vie. Malgré son absence, elle demeure toujours dans nos cœurs.

Que Dieu l'accueille et accueille tous les musulmans dans son vaste paradis.

A mes chers parents,

Je vous remercie de me faire confiance, de me soutenir dans mes choix et de m'encourager dans chacune des étapes de ma vie. Merci maman, merci papa, à tenir ma main en bonheur et en malheur, vous êtes mon étoile brillante qui me guide toujours dans l'obscurité. Votre tendresse, votre œil attentif et compréhensif ont toujours marqué ma vie. Vous serez toujours ma source d'inspiration. Les mots ne suffisent plus à exprimer ma gratitude et mon amour envers vous.

A mes deux frères,

Merci mes deux petits jumeaux, bien qu'étant plus jeune que moi, d'être les premiers à me conseiller et à m'embêter. Je sais très bien que quoiqu'il arrive, vous serez toujours là pour me donner un coup de main. Je peux toujours compter sur vous.

A mes chères amies,

Au nom de l'amitié et des moments agréables que nous avons passé ensemble, je vous remercie du fond de mon cœur d'être toujours là pour moi, de me conseiller et de venir en aide à chaque moment.

Résumé

La voie de signalisation MAPK reste l'une des principales voies de prolifération cellulaire. Celle-ci est essentielle pour la croissance, la différenciation et la survie cellulaire. La voie de MAPK a un complexe unique de phosphorylation « RAS/RAF/MEK/ERK ». Dans cette voie, la protéine BRAF joue un rôle important dans cette cascade. Cette protéine sérine/thréonine kinase, en fonctionnant comme un proto-oncogène, est la cause de plusieurs types de cancer, notamment les mélanomes. L'étude des fonctions de cette protéine est indispensable pour mieux comprendre les mécanismes d'altération oncogénique. Pour cela, plusieurs thérapies ont été développées, ciblant BRAF, afin de traiter le cancer.

Ce travail a pour but de prédire, *in silico*, l'effet de stabilité et de flexibilité des mutations sur la fonction de la protéine, ainsi d'identifier des nouveaux inhibiteurs potentiels de BRAF, en utilisant le criblage virtuel et le Docking.

Lors de notre travail, 491 mutations ont été étudiées, afin de prédire leurs effets sur la stabilité, la flexibilité et la fonction de la protéine. 3 mutations, qui sont respectivement (G469E, L584F, A621S), ont été sélectionnées de différents 3 domaines de la protéine BRAF : ATP-binding, kinase, boucle d'activation.

En outre, 101 composés ont été sélectionnés de Binding dB, ayant un effet inhibiteur contre BRAF. Après une évaluation de toxicité et des règles de Lipinski et Veber, 78 composés sont utilisés en Docking. Les résultats ont été comparés avec les inhibiteurs de référence : Sorafénib, Dabrafénib, Vémurafénib, et Encorafénib. Alors, 1 seul composé « BDBM300299 », ayant des bons résultats, est proposé comme traitement anti-cancéreux.

Mots clés : MAPK, BRAF, inhibiteur, cancer, criblage virtuel, Docking.

Abstract

The MAPK signaling pathway remains one of the major pathways of cell proliferation. It is essential for cell growth, differentiation and survival. The MAPK pathway has a unique "RAS/RAF/MEK/ERK" phosphorylation complex. In this pathway, the BRAF protein plays an important role in this cascade. This protein serine/threonine kinase, by functioning as a proto-oncogene, is the cause of several types of cancer, including melanoma. The study of the functions of this protein is essential to better understand the mechanisms of oncogenic alteration. For this, several therapies have been developed, targeting BRAF, to treat cancer.

The aim of this work is to predict, *in silico*, the effect of stability and flexibility of mutations on the function of the protein, as well as to identify new potential BRAF inhibitors, using virtual screening and docking.

In our work, 491 mutations were studied in order to predict their effects on the stability, flexibility and function of the protein. 3 mutations, that are respectively (G469E, L584F, A621S), were selected from different 3 domains of the BRAF protein : ATP-binding, kinase, activation loop.

In addition, 101 compounds were selected from Binding dB, having an inhibitory effect against BRAF. After an evaluation of toxicity and Lipinski and Veber rules, 78 compounds are used in Docking. The results were compared with the reference inhibitors : Sorafenib, Dabrafenib, Vemurafenib, and Encorafenib. Then, only 1 compound "BDBM300299", having good results, is proposed as an anti-cancer treatment.

Key words : MAPK, BRAF, inhibitor, cancer, virtual screening, Docking.

ملخص:

يظل مسار إشارات MAPK أحد المسارات الرئيسية لتكاثر الخلايا. هذا ضروري لنمو الخلايا والتميز والبقاء على قيد الحياة. يحتوي مسار MAPK على مجمع فسفرة فريد "RAS / RAF / MEK / ERK". في هذا المسار ، يلعب بروتين BRAF دورًا مهمًا في هذه السلسلة. هذا البروتين سيرين / ثريونين كيناز ، من خلال العمل كجينات سرطانية أولية ، هو سبب عدة أنواع من السرطان ، ولا سيما سرطان الجلد. تعتبر دراسة وظائف هذا البروتين ضرورية لفهم آليات التغيير السرطاني بشكل أفضل. لهذا ، تم تطوير العديد من العلاجات التي تستهدف BRAF ، من أجل علاج السرطان. يهدف هذا العمل إلى التنبؤ ، في السيليكو ، بتأثير استقرار ومرونة الطفرات على وظيفة البروتين ، بالإضافة إلى تحديد مثبطات محتملة جديدة لـ BRAF ، باستخدام الفحص الافتراضي ورسو السفن. خلال عملنا ، تمت دراسة 491 طفرة ، من أجل التنبؤ بآثارها على استقرار ومرونة ووظيفة البروتين. تم اختيار 3 طفرات ، وهي على التوالي (G469E ، L584F ، A621S) من ثلاثة مجالات مختلفة لبروتين BRAF: ربط ATP ، كيناز ، حلقة تنشيط.

بالإضافة إلى ذلك ، تم اختيار 101 مركبًا من Binding dB ، والتي لها تأثير مثبط ضد BRAF. بعد تقييم السمية وقواعد Lipinski و Veber ، يتم استخدام 78 مركبًا في Docking. تمت مقارنة النتائج مع مثبطات مرجعية: Sorafenib و Dabrafenib و Vemurafenib و Encorafenib. لذلك ، تم اقتراح مركب واحد فقط "BDBM300299" ، بنتائج جيدة ، كعلاج مضاد للسرطان.

الكلمات الرئيسية: MAPK ، BRAF ، المانع ، السرطان ، الفحص الافتراضي ، الإرساء.

Liste des figures

Figure 1: le processus de communication cellulaire	19
Figure 2 : les différents modules des cascades de kinases	22
Figure 3: le module de la voie de signalisation MAP kinase	23
Figure 4: un schéma des différentes voies de MAPK	24
Figure 5: la voie de MAP kinase	25
Figure 6: le rôle de la protéine d'échafaudage KSR dans la voie de MAPK, ainsi sa liaison des signaux provenant de RTK et GPCR envers la voie MAPK	26
Figure 7: les modifications post-traductionnelles de RAS.....	27
Figure 8: les effecteurs de la voie de MAPK	30
Figure 9: les maladies causées par les mutations RAS et BRAF.....	31
Figure 10 : un schéma d'altération oncogénique en cascade de MAPK.....	32
Figure 11: la structure de la protéine BRAF	36
Figure 12: le signal médié par BRAF dans les cellules normales et dans les cellules maligne	37
Figure 13 : le spectre des mutations BRAF en cancer	38
Figure 14: les types des mutations divisés en classes	38
Figure 15: la fréquence d'expression de chaque type de cancer par la protéine BRAF	45
Figure 16: une représentation du workflow de CADD	54
Figure 17: la séquence en acides aminés de BRAF	63
Figure 18 : le cristal 4XV9	65
Figure 19: le cristal 4XV9 en forme pdb.....	72
Figure 20: le fichier grid de la protéine.....	74
Figure 21: le fichier de configuration.....	75
Figure 22: la commande de chemin du dossier	75
Figure 23: la commande d'exécution de vina	76
Figure 24: le processus du Docking moléculaire	76
Figure 25: le processus d'identification, in silico, des inhibiteurs ciblant 4XV9 et les mutations A621S, G469E, et L584F.	77
Figure 26: la distribution globale des mutations délétères et des mutations neutres en 4XV9	79
Figure 27: le pourcentage des différents effets des mutations en domaine ATP binding	81
Figure 28: le pourcentage des différents effets des mutations en domaine kinase	82

Figure 29: le pourcentage des différents effets des mutations en domaine de boucle d'activation.....	86
Figure 30: visualisation des résultats pour le type sauvage 4XV9.....	95
Figure 31: visualisation des résultats pour la mutation A621S.....	96
Figure 32: visualisation des résultats pour la mutation G469E.....	97
Figure 33: visualisation des résultats pour la mutation L584F	98

Liste des tableaux

Tableau I: les différentes mutations de BRAF, leurs classes et leurs dépendances en RAS ...	37
Tableau II: les types de mutations regroupées en classes 1,2, et 3 observés chez 114,662, ainsi le taux des cas et le nombre d'apparition pour chaque mutation	41
Tableau III : les différentes maladies de BRAF, et le nombre des cas pour chaque maladie ..	42
Tableau IV: les sites primaires de BRAF et le nombre des cas trouvés pour chaque site	43
Tableau V: les différentes maladies liées aux mutations BRAF	44
Tableau VI: les inhibiteurs RAF, MEK, ERK, leur utilité clinique et leur statut durant le développement	47
Tableau VII: un exemple des différents acides aminés (en code de 1 lettre) et la position de leurs substitutions ainsi l'acide aminé avec lequel est remplacé.	64
Tableau VIII: l'identifiant de cristal choisi et ses informations.....	65
Tableau IX: les différents inhibiteurs à étudier et leurs caractéristiques	65
Tableau X: les différentes mutations incluses dans l'intervalle des acides aminés du cristal 4XV9	69
Tableau XI: les caractéristiques des 4 inhibiteurs de référence	71
Tableau XII: les statistiques de l'impact des différentes mutations, au niveau des trois domaines, sur la fonction, la flexibilité et la stabilité.....	78
Tableau XIII: les effets des différentes mutations de BRAF au niveau du domaine de liaison à l'ATP 'ATP binding' sur : la fonction de la protéine (délétère ou neutre), la stabilité (stabilisante $DDG > 0$ ou déstabilisante $DDG < 0$), la flexibilité (augmentée $DDS > 0$ ou réduite < 0)	79
Tableau XIV: les effets des différentes mutations de BRAF au niveau du domaine kinase sur : la fonction de la protéine (délétère ou neutre), la stabilité (stabilisante $DDG > 0$ ou déstabilisante $DDG < 0$), la flexibilité (augmentée $DDS > 0$ ou réduite < 0).....	81
Tableau XV: les effets des différentes mutations de BRAF au niveau du domaine de boucle d'activation sur : la fonction de la protéine (délétère ou neutre), la stabilité (stabilisante $DDG > 0$ ou déstabilisante $DDG < 0$), la flexibilité (augmentée $DDS > 0$ ou réduite < 0).....	83
Tableau XVI: les mutations choisies pour le processus de Docking	87
Tableau XVII: les différents composés finaux utilisés pour notre étude	87
Tableau XVIII: les résultats de Docking, en terme d'affinité des 4 inhibiteurs de référence ..	90
Tableau XIX: les inhibiteurs potentiels ciblant le type sauvage 4XV9 et leurs affinités.....	90

Tableau XX: les inhibiteurs potentiels ciblant la mutation A621S et leurs affinités	91
Tableau XXI: les inhibiteurs potentiels ciblant la mutation G469E et leurs affinités.....	91
Tableau XXII: les inhibiteurs potentiels ciblant la mutation L584F et leurs affinités	91
Tableau XXIII: l'inhibiteur BDBM200399 présentant les meilleures affinités au niveau des 4 protéines	92
Tableau XXIV: les résultats des interactions entre les différents ligands et le récepteur 4XV9	92
Tableau XXV: les résultats des interactions entre les différents ligands et le récepteur A621S	93
Tableau XXVI: les résultats des interactions entre les différents ligands et le récepteur G469E	93
Tableau XXVII: les résultats des interactions entre les différents ligands et le récepteur L584F	94

Liste des abréviations

3D	Three-dimension
ADME	Absorption, distribution, métabolisme et excréation
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARAF	A-type RAF proto-oncogène
ARN	Ribonucleic acid
B2M	β2-microglobuline
Bag1	Associated Athano-Gene 1
BDB	Binding data base
BIM	Bcl-2 Interacting Mediator + 1 Oncology
BRAF	B-type Raf proto-oncogene
CADD	Computer aided drug design
C-Jun	AP-1transcription factor subunit c
C-Myc	C-myelocytomatosis oncogene
CR1	Conserved region 1
CR2	Conserved region 2
CR3	Conserved region 3
CRAF	Proto-oncogene ser/thr protein kinase
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DGF	Delayed graft function
DUSP	Dual specificity phosphatases
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELK1	ETS like 1 protein
ERK	Extracellular signal regulated kinase3
ETS	E26 transformation-specific
Ets-1	E26 homolog-1
FASTA	Text-based format for representing either nucleotide sequences or amino acid (protein) sequences
FDA	Food and drug administration
FGFR	Fibroblastic growth factor receptor
FOS	Fos Proto-Oncogène
FZD6	Frizzled Class Receptor 6
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	GUANINE nucleotide exchange factor
GRB2	Growth factor receptor-bond protein 2
GTP	Guanosine triphosphate
HER3	Human epidermal growth factor receptor 3
HGF	Hepatocyte growth factor
HGV	Hepatitis G virus.
HLA-A	Human leukocyte antigen A
HLA-B	Human leukocyte antigene B
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
Hsp70	70 heat shock proteins
Indel	Insertion-deletion
JNK	JUN N-terminal kinase
SAPK	Stress activated protein kinase

JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
KIAA	Domain gliome
KRAS	Kristen RAS
KSR	Kinase suppressor of RAS1
LBDD	Ligand based drug design
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
MAP2K	Mitogen activated protein kinase kinase
MAP3K	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
MAPK	Mitogen-activated protéin kinase
MAPKK	Mitogen activated protein kinase kinase
MD	Molecular dynamic
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MITF	Melanocyte inducing transcription factor
MK	MAP activated protein kinase
MNK	MAP kinase interacting proteins
MPK	Mitogen protein kinase
MYC	MYC Proto-Oncogene
NF1	Neurofibromatosis type 1
NF-kB	Nuclear factor kappa B
NMR	Nuclear magnetic resonance
NRAS	Neuroblastoma ras viral oncogene homolog
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OMIM	Online mendelian inheritance in man
P38	Mitogen activated protein kianse
PDB	Protein data bank
Pdb	Protein data bank format file
Pdbqt	Protein data bank partial charge (Q) atom type (T) format
Provean	Protein variation effect analyzer
QSAR	Quantitative structure activity relationship
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	RAT sarcoma
RASGAP	RAS GTPase activating protein
RBD	RAS binding domain
RSK	Ribosomal S6 protein kinase
RTK	Receptor tyrosine kinase
SBDD	Structure based drug design
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
SOS1	Son of sevenless homolog 1
SP1	Stimulatory protein 1
TAP1	Transporter associated with antigen processing type 1
TEY	Thr-glu-Tyr
TCGA	The cancer genome atlas
TPSA	Total prostate-specific antigen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WNT	Wingless-type ouse mammary tumor

Table des matières

Introduction.....	16
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Principes généraux de la signalisation cellulaire.....	18
1. Définition.....	18
2. De récepteur aux effecteurs.....	18
3. Signalisation cellulaire et cancer	20
II. Voie de MAP kinase.....	22
1. Définition.....	23
2. Mécanisme	24
a. RAS.....	26
b. RAF.....	28
c. MEK.....	28
d. ERK.....	29
e. Les effecteurs	29
3. Altérations oncogéniques.....	30
4. Cibles pharmacologiques	32
III. Protéine BRAF.....	34
1. Biologie de BRAF.....	34
2. BRAF étant un proto-oncogène :.....	36
3. Différentes mutations et classes de BRAF.....	38
a. Mutations de classe 1 :.....	38
b. Mutations de classe 2 :.....	39
c. Mutations de classe 3 :.....	40
4. Maladies causées par BRAF.....	42
5. Inhibiteurs de BRAF	45
a. Inhibiteurs de RAF de type 1	45
b. Briseurs de paradoxe.....	46
c. Perturbateurs des dimères.....	46
d. Inhibiteurs des MEK.....	46
e. Inhibiteurs des ERK	47
6. Résistance aux inhibiteurs.....	48
a. Types de résistance	48
b. Mécanismes de résistance	48
c. Stratégies pour diminuer la résistance.....	49
IV. Modélisation moléculaire.....	50

1.	Structure des protéines.....	50
a.	Structure primaire:.....	50
b.	Structure secondaire:.....	50
c.	Structure tertiaire:.....	50
d.	Structure quaternaire:.....	50
2.	Détermination de la structure:.....	50
3.	Analyse de flexibilité, de stabilité:.....	51
a.	Stabilité de la protéine.....	51
b.	Flexibilité de la protéine.....	52
c.	Relation entre la stabilité et la flexibilité avec la fonction.....	53
V.	Conception de médicaments assistée par ordinateur (CADD).....	53
1.	Conception de médicaments structurée (SBDD).....	54
a.	Détermination de la structure protéique.....	55
b.	Modélisation par homologie.....	55
c.	Reconnaissance des plis (filetage).....	55
d.	Modélisation <i>ab initio</i> (<i>de novo</i>).....	55
e.	Identification du site de liaison.....	56
f.	Fonction d'amarrage.....	56
2.	Conception des médicaments à ligand (LBDD).....	56
a.	Recherche de similarité.....	57
b.	Relations quantitatives structure-activité (QSAR).....	57
c.	Modélisation pharmacophorique.....	57
d.	Evaluation de l'ADME et de la toxicité.....	57
	PARTIE PRATIQUE.....	58
I.	Matériel et méthodes.....	59
A.	Matériel	59
1.	Bases de données.....	59
2.	Serveurs de web.....	61
3.	Logiciel.....	61
B.	Méthodes	63
1.	Construction de la base des données.....	63
2.	Prédiction des effets mutationnels.....	69
a.	Les effets des mutations sur la fonction des protéines.....	69
b.	Les effets des mutations sur la stabilité et la flexibilité des protéines.....	69
3.	Criblage moléculaire.....	69
a.	Filtration des mutations.....	69

b.	Filtration des ligands	70
c.	Inhibiteurs de référence.....	70
4.	Préparation des structures.....	71
a.	Préparation des cibles	71
b.	Préparation des ligands.....	73
c.	Définition d'espace de recherche	73
d.	Préparation de fichier de configuration	74
e.	Docking moléculaire	75
f.	Visualisation des interactions.....	76
II.	Résultats et discussions.....	78
A.	Résultats	78
1.	Prédiction des effets des mutations.....	78
2.	Filtrage des mutations.....	86
3.	Docking moléculaire	87
4.	Visualisation par Pymol	92
B.	Discussion.....	99
	Conclusion et perspectives.....	104
	Bibliographie	105

Introduction

La signalisation cellulaire représente des cascades de communication entre cellules, tout en transmettant une messagerie d'une cellule à une autre. Par conséquent, ceci va mettre en œuvre plusieurs actions, impliquées dans les mécanismes cellulaires(1).

En effet, parmi les voies de signalisation cellulaire, il existe la voie de MAPK. Celle-ci joue un rôle important dans la signalisation cellulaire de la membrane au noyau. Toutefois, cette voie recrute plusieurs acteurs RAS/RAF/MEK/ERK, formant un complexe dont l'un phosphoryle et active l'autre(2). Dans cette voie, il existe une protéine nommée RAF dont elle joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, et le déclenchement du cancer. Ceci est dû par plusieurs mutations de la famille RAF, notamment BRAF. Ce dernier provoque des altérations oncogéniques dans les différents tissus du corps humain(3). De ce fait, plusieurs recherches ont été fait pour l'étude de la protéine BRAF, dans l'intention de développer un médicament ciblant cette protéine, en inhibant sa capacité à induire les altérations oncogéniques(4). Malgré l'existence de plusieurs inhibiteurs de BRAF, celui-ci performe une résistance spécifique. Alors que, plusieurs recherches sont encore mises en œuvre pour déterminer quelques fonctions de BRAF, une partie de sa structure qui est inconnue, ainsi le développement des médicaments ayant une grande puissance pour inhiber les mutations de BRAF(5).

Néanmoins, la recherche et le développement classique des médicaments est un processus extrêmement long, très complexe et coûteux. Ce qui fait, l'utilisation du processus de conception des médicaments assisté par ordinateur permet la prédiction des résultats possibles, ce qui facilite la recherche(6).

Dans cette étude, nous avons utilisé les outils de prédiction des effets mutationnels des différentes mutations de BRAF sur la stabilité, la flexibilité, et la fonction de chaque domaine spécifique de BRAF, dans le but de déterminer les mutations les plus délétères. Ainsi, nous avons réalisé un criblage virtuel et le Docking moléculaire afin d'identifier des nouveaux inhibiteurs potentiels de BRAF, pouvant surmonter la résistance aux traitements.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Principes généraux de la signalisation cellulaire

1. Définition

La signalisation cellulaire représente l'ensemble des voies de communication entre cellules. Ceci est par la transmission des messages d'une cellule à une autre en réalisant plusieurs actions, directes ou indirectes, passant notamment par la transcription du gène exécutant des fonctions précises (7). En outre, celle-ci est indispensable à la vie des organismes pluricellulaires, performant 6 grands types d'actions à exécuter, allant deux à deux : se reproduire ou se différencier, demeurer attaché ou migrer, survivre ou mourir. Ceci montre la nécessité d'échange des informations pour la coordination des actions (8).

En transduction de signal, il y a un modèle unique étant « un ligand, un récepteur, un message, une action physiologique ». Cependant, le même ligand peut reconnaître plusieurs récepteurs apparentés, et reçoit également des messages provenant des différents ligands ; les messages intracellulaires transmis après activation du récepteur sont multiples et les actions physiologiques variables d'un tissu à l'autre(9).

2. De récepteur aux effecteurs

Les principes de communication cellulaires sont universels : des molécules de signalisation sont émises par une cellule, reconnues par une autre, provoquant une voie de transduction du signal reçu aboutissant à un système effecteur (9).

La signalisation cellulaire peut s'exercer à des distances très variables ; tel que le système endocrinien, dans lequel un organisme spécifique (glande, endocrine) secrète dans le courant sanguin des molécules (hormones) destinées à des cellules très éloignées.

A côté de la signalisation entre cellules existe, bien sûr une signalisation intracellulaire. Les deux types de communication sont enchevêtrés et difficilement séparables. Cette signalisation intracellulaire est, en particulier, véhiculée non seulement par les seconds messagers, mais aussi par le nombre de protéines synthétisées en réponse à toutes sortes de sollicitations (figure1). Par ailleurs, c'est à l'intérieur de la cellule que convergent les multiples informations reçues de l'extérieur et que doit se faire l'intégration de toutes ces informations, qui peuvent être synergiques ou au contraire divergentes (9)

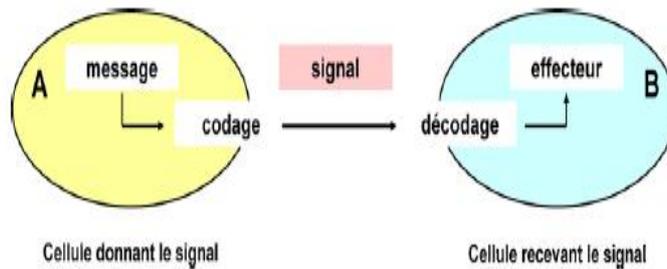


Figure 1: le processus de communication cellulaire (10)

Des molécules de signalisation sont émises par une cellule (étape de codage), reconnues par une autre, qui met alors en œuvre une voie de transduction de signal reçu (étape de décodage), qui aboutit à un système effecteur, en considérant le signal (8).

En ce qui concerne la 1^{ère} étape, la réception, les mécanismes sont dépendants de la nature chimique des messagers :

- Les messagers de nature ne peuvent entrer dans les cellules, donc il existe un récepteur membranaire capable de recevoir le message, à le comprendre, et à transduire l'information,
- Les messagers de nature lipidique et les composés de structure très simple sont capables de diffuser à travers les membranes et d'atteindre directement leurs cibles,
- Les messagers de nature ionique sont capables d'induire l'ouverture ou la fermeture transitoire de canaux ioniques permettant la génération de courants transmembranaires (9).

Par ailleurs, la transduction des signaux perçus par les récepteurs fait intervenir de multiples processus, les principaux sont :

- Le « recrutement » de protéines capables de contracter des interactions avec d'autres : il existe ainsi de très nombreuses protéines « adaptatrices »,
- Les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation par des kinases et des phosphatases, en modifiant la conformation tridimensionnelle des protéines, donc leur réactivité,

- La mise en jeu de petites protéines G selon un mécanisme quasi constant d'échange et d'hydrolyse de nucléotides guanyliques,
- La production de « seconds messagers » intracellulaires relayant l'information apportée au niveau de la membrane (9).

Enfin, les effecteurs sont également très divers, on cite parmi eux :

- ✓ Les régulateurs transcriptionnels, couramment appelés « facteurs de transcription », qui commandent la transcription de gènes cibles,
- ✓ Les régulateurs traductionnels, qui sont directement mis en jeu dans quelques voies de signalisation, intervenant sur le niveau de synthèse protéique,
- ✓ Les protéines du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire, qui commandent les phénomènes d'adhésion, de motilité et de dispersion cellulaires,
- ✓ Les canaux ioniques(9).

3. Signalisation cellulaire et cancer

Une cellule cancéreuse est une cellule génétiquement instable, capable d'explorer les fonctions de l'ensemble du génome, et de mettre à profit tout avantage prolifératif ou migratoire pour le sélectionner et le transmettre à sa descendance. De même, une tumeur est une néoformation nécessitant une multiplication cellulaire toujours active et migratoire, car le support de la malignité des cancers est lié à leur aptitude à voyager dans l'organisme (9). D'ailleurs, la capacité de survie est une nécessité pour les cellules tumorales. Toutes les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et dans la différenciation, dans l'adhésion et la migration, dans la survie et dans la mort, pourront servir de support à des altérations oncogéniques. On peut considérer le cancer est une maladie de signalisation cellulaire (7).

Toutefois, les mécanismes de l'oncogenèse sont :

- Autosuffisance en facteurs de croissance,
- Insensibilité aux facteurs de croissance,
- Evasion de l'apoptose,
- Néo-angiogenèse,
- Invasion et métastase,
- Potentiel réplicatif illimité.

On peut inclure l'instabilité génétique dans les mécanismes de l'oncogenèse (9).

Pour les 5 premiers de ces mécanismes, on trouvera presque toujours une anomalie dans la transmission de l'information, une mutation dans une protéine de transduction des signaux, une « maladie de la signalisation », car le déclenchement de la réactivation de télomérase de cancer n'est pas encore connu(9).

Cependant, la connaissance des mécanismes de l'oncogenèse et celle des perturbations des voies de signalisation dans les cancers a permis l'émergence du concept de thérapie ciblée. Alors que les médicaments de la chimiothérapie classique ont pour cible les mécanismes impliqués dans la multiplication cellulaire, qu'elle soit normale ou néoplasique, les thérapies ciblées s'adressent aux mécanismes mêmes de l'oncogenèse et devraient donc avoir une spécificité importante pour les cellules cancéreuses. En thérapies ciblées, on cible les protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire, c'est-à-dire celle qui causent le cancer(9).

II. Voie de MAP kinase

la transmission des signaux extracellulaires envers leurs cibles intracellulaires est médiée par un grand réseau des interactions des protéines, régulant plusieurs processus cellulaires (11). Parmi ces voies de signalisation, il existe la voie des MAPK. Dans les cellules mammaliennes, trois familles MAPK (figure2) qui ont été caractérisées : ERK, JNK/SAPK et p38 MAPK(12).

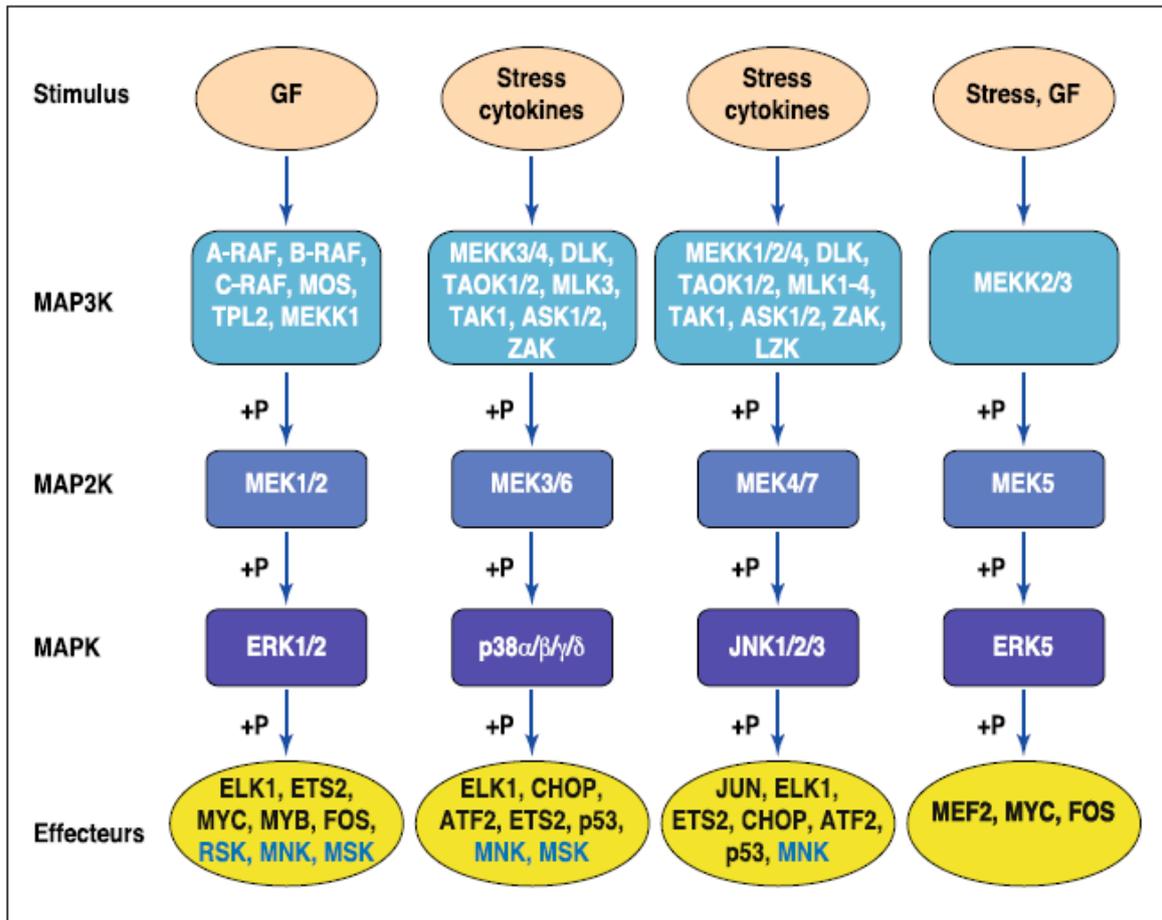


Figure 2 : les différents modules des cascades de kinases(13)

Ceux-ci jouent un rôle important dans les fonctions cellulaires, tel que la prolifération, la différenciation, le développement, la transformation et l'apoptose. De plus, chaque voie de MAP kinase utilise au moins trois acteurs : MAP3K, MAP2K et MAPK (14). Ceux-ci présentent le core de la voie de MAPK (figure3), qui sont activés séquentiellement par phosphorylation(15)

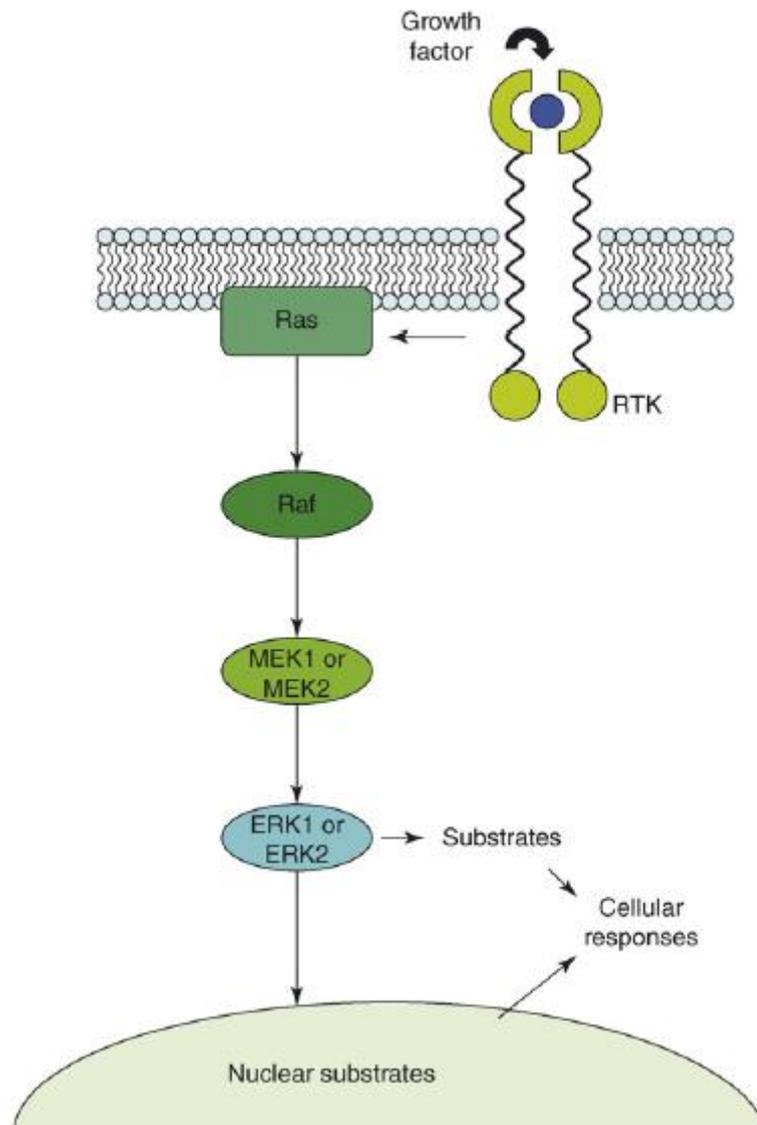


Figure 3: le module de la voie de signalisation MAP kinase(16)

1. Définition

La voie de MAPK « Mitogen-activated protein kinase », est une sérine-thréonine kinase, qui a pour rôle la médiation des signaux intracellulaires associés avec plusieurs activités cellulaires y compris : la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie, la mort et la transformation (14). Cependant, parmi toutes les voies de transduction MAPK, La voie RAS/RAF/MEK/ERK (figure4) reste la cascade de signalisation la plus importante, et joue un rôle majeur dans la survie et le développement des cellules malignes (17) ainsi la prolifération cellulaire sont celles des altérations oncogéniques sont les plus recherchées (9) .

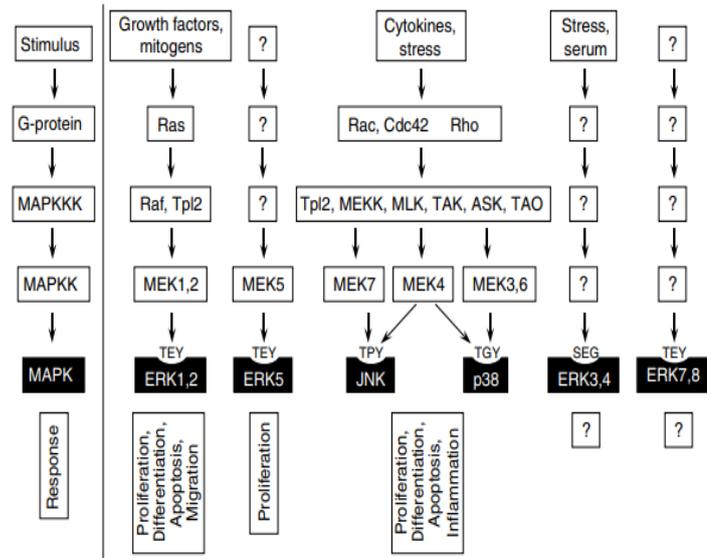


Figure 4: un schéma des différentes voies de MAPK(18)

2. Mécanisme

La voie de MAPK est une voie de signalisation, permettant l'activation et la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription, ce qui permet l'expression des gènes qui sont impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération (19).

Cette voie de signalisation peut être divisée schématiquement en phases membranaires et cytoplasmiques (figure5) (11).

En effet, La voie de MAP kinase est un système de 3 niveaux de signalisation : RAF (MAP3K, MAPKK), MEK (MAP2K), ERK (20).

La protéine GRB2 est une protéine adaptatrice, dotée des domaines SH2 et SH3. Son domaine SH2 reconnaît des tyrosines phosphates du RTK activé. Cela permet le recrutement à la membrane, un facteur d'échange GTP-GDP nommé SOS1. Celui-ci performe une action dans l'intention de fixer, sur la protéine RAS, un GTP à la place du GDP ; ceci est la fonction d'une famille de protéine que l'on appelle les GEF (21).

Ceci provoque un changement de conformation de la protéine G, qui lui permet d'exercer une action en aval. En outre, Les petites protéines G ont une activité GTPasique, afin d'éliminer le phosphate en gamma du nucléotide et de revenir à leur forme première liée à GDP (22). Cette activité GTPasique est stimulée par un facteur activateur GAP. Par la suite, et en réponse à

l'activation RTK, le GEF est la protéine SOS1, pendant que GAP est une protéine nommée RASGAP (23).

Par ailleurs, un ancrage membranaire de RAS est indispensable pour son activation, ceci est dû par le recrutement de SOS1 à la membrane, qui grâce à son affinité pour GRB2, permet la rencontre de la protéine d'échange avec son substrat, et par la suite l'activation de RAS (24). Lors de la liaison à GTP, et en subissant une modification conformationnelle, RAS cible directement une protéine sérine-thréonine kinase qui est RAF (25).

Toutefois, en aval de RAF, il se situe des kinases MEK1 et MEK2, et en aval de ces dernières se situent des kinases ERK1 et ERK2 (26). De même, Raf, à son tour, phosphoryle et active une protéine MEK, qui phosphoryle et active une protéine ERK, qui phosphoryle et active un facteur de transcription comme ELK1 ou une kinase de la famille MK (27).

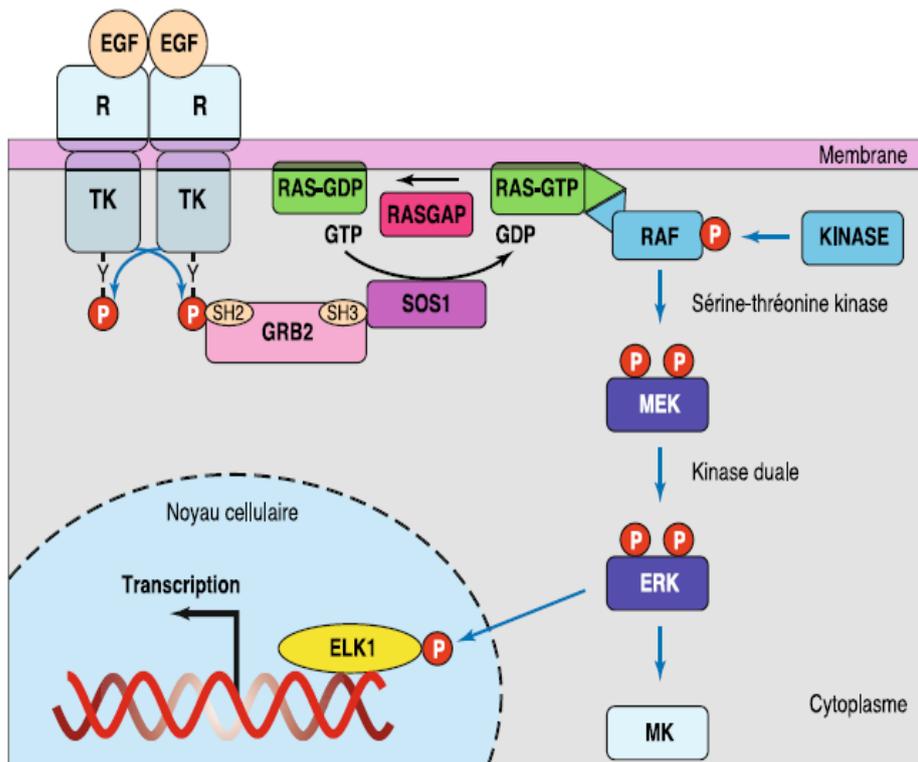


Figure 5: la voie de MAP kinase (9)

Néanmoins, la spécificité de l'action des kinases de chaque niveau sur celle de niveau inférieur provient, principalement, des interactions différentes entre domaines de reconnaissance protéine-protéine, que de l'action catalytique elle-même (7).

Cependant, les 3 niveaux successifs des kinases ne sont pas dispersés dans le cytoplasme, du fait qu'il existe des protéines d'échafaudage « Scaffold proteins », permettant la maintenance des 3 kinases dans un complexe associatif (28).

Pour le cas de RAS-RAF-MEK-ERK, la protéine d'échafaudage est KSR (figure6). Celle-ci intervient au niveau de la membrane plasmique. Il existe également d'autres protéines d'échafaudage en MAPK, ayant une activité au niveau des endosomes, de l'appareil de Golgi ou des plaques d'adhésion focale(29).

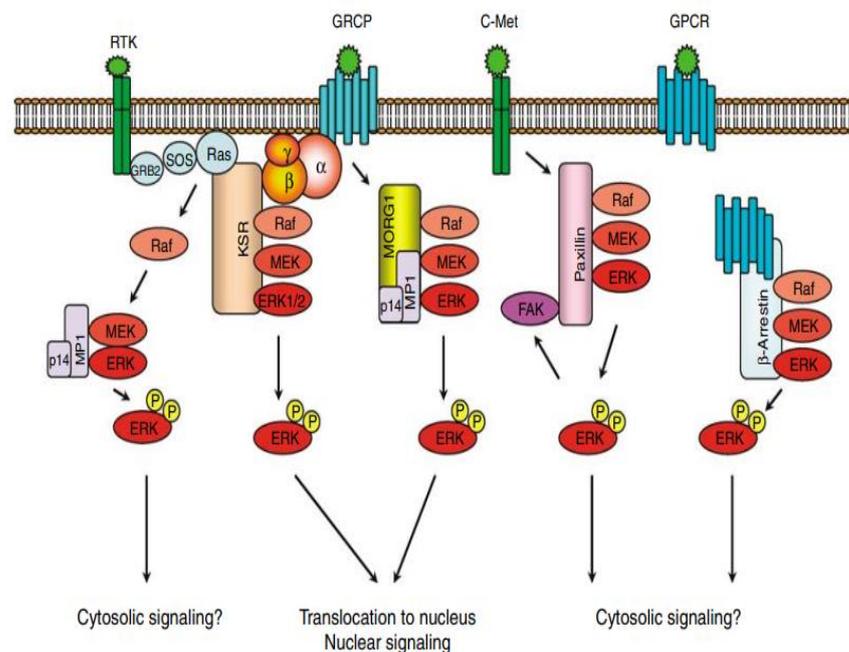


Figure 6: le rôle de la protéine d'échafaudage KSR dans la voie de MAPK, ainsi sa liaison des signaux provenant de RTK et GPCR envers la voie MAPK (28).

Enfin, il existe les MPK et les DUSP, qui sont des phosphatases duales, dont ils se considèrent des régulateurs négatifs de la voie de MAPK. Celles-ci exercent leur activité au niveau de thréonines comme des tyrosines phosphates, avec une spécificité de substrat variable (30). Notamment, les DUSP déphosphorylent, à la fois, les résidus thréonine/sérine et tyrosine de leur substrat. Tous les DUSP possèdent en commun un domaine phosphatase, contenant des résidus conservés (Asp, Cys, Arg) formant le site catalytique (31).

a. RAS

Il existe trois protéines homologues de RAS : KRAS, HRAS, et NRAS (32). Ces trois protéines se différencient par leur spécificité tissulaire (9). Autrement, elles appartiennent à la famille des petites protéines G, ayant le même mécanisme : un facteur d'échange GEF

remplace le GDP par du GTP, pour lequel elles montrent une grande affinité. Ce remplacement induit un changement de conformation de la protéine G, lui permettant ainsi d'exercer son action en aval (33).

Cependant, les protéines RAS sont ancrées dans la membrane plasmique des cellules par l'intermédiaire d'une liaison covalente, ajoutée de façon post-traductionnelle au niveau du réticulum endoplasmique, avec un groupement hydrophobe ramifié « prényl », en comptant 15 atomes de carbone « farnésyl » ou 20 atomes de carbone « géranylgeranyl »(34). Ceux-ci sont des groupements intermédiaires de la voie de biosynthèse de cholestérol (9).

En fait, cet ancrage se réalise par l'intermédiaire d'une cystéine de la chaîne polypeptidique, au niveau du motif -CAXX (C pour cystéine, A pour tout acide aminé aliphatique, et X pour tout acide aminé) dont les trois acides aminés AAX sont éliminés, et ce sont remplacés par un groupement acétyl en C-terminal (figure7). C'est une protéine RAS ayant subi ces deux modifications post-traductionnelles, pouvant être insérée dans la membrane plasmique (35).

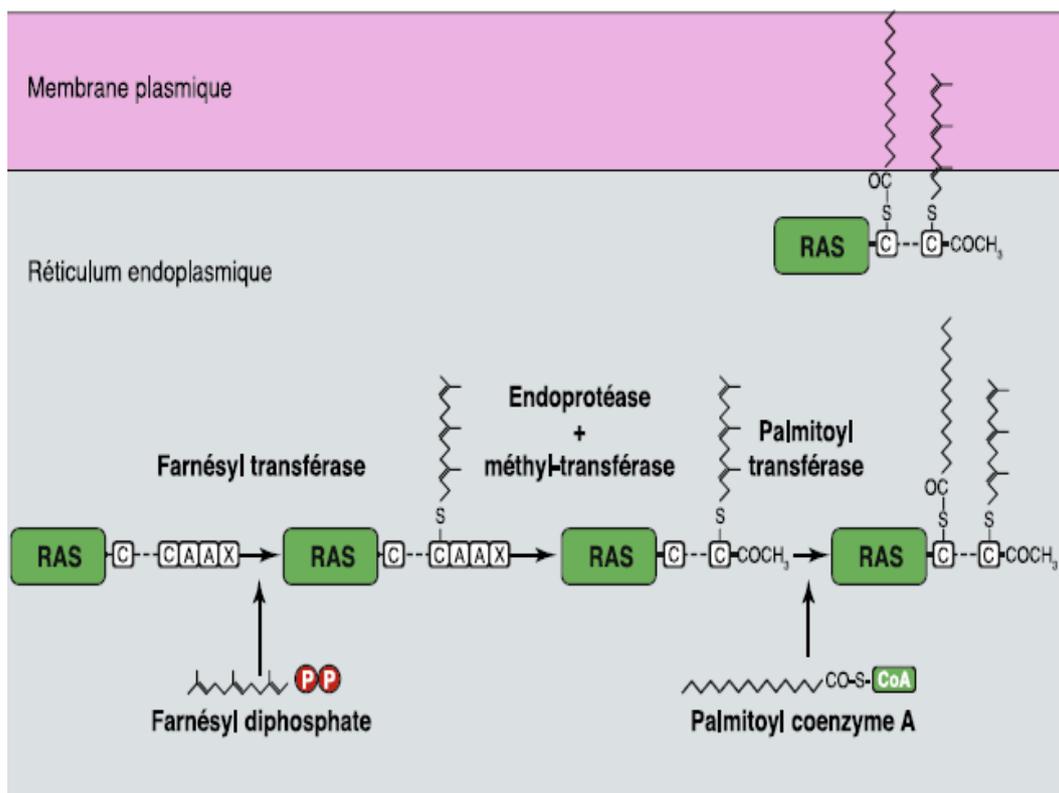


Figure 7: les modifications post-traductionnelles de RAS (9)

b. RAF

En effet, il existe trois isomères de RAF : ARAF, BRAF, et CRAF. Pourtant, la kinase la plus active de la voie MAPK est BRAF, puis CRAF ainsi que ARAF ayant une très faible activité kinase(36).

Ainsi, RAF subit un changement de conformation, à cause de leur liaison avec RAS-GTP. Ceci dévoile une boucle d'activation, en les rendant capables d'être phosphorylées et activées (37). Par ailleurs, la protéine RAF est activée par une série d'événements, en y incluant :

- Le recrutement à la membrane plasmique, qui est médiée par une interaction avec RAS (38,39),
- La dimérisation des protéines RAF (40,41),
- La phosphorylation en niveau de différents domaines(42,43).

De plus, l'activité de RAF est modulée grâce aux protéines adaptatrices, telles que : Bag1, Hsp70, et 14-3-3 (44,45).

Cependant, plusieurs phosphorylations de RAF doivent être mises en œuvre :

- 2 phosphorylations, du côté N-terminal, sur un motif SSYY, où la première sérine et la deuxième tyrosine doivent être phosphorylées(46) .
- 2 phosphorylations, du côté C-terminal, sur une thréonine et une sérine ; respectivement T598 et S601 pour le cas de BRAF (47).

Pourtant, dans le cas de CRAF et ARAF, 4 phosphorylations sont indispensables pour leur activation(9).

c. MEK

MEK est une kinase duale capable de phosphoryler, à la fois, une thréonine et une tyrosine d'ERK, ce dernier étant le seul substrat de MEK. Cette phosphorylation prend place au niveau de la boucle d'activation. La thréonine et la tyrosine sont disposées de cette manière : TEY (thr-glu-tyr) (48,49).

Toutefois, la séquence N-terminal de MEK contient un alphaA-hélice ; celui-ci est impliqué dans les interactions auto-inhibitrices, dans la séquence nucléaire exporte (NES), ainsi le domaine de liaison ERK. D'ailleurs, L'A-hélice de MEK, étant identifiés, pour la première fois, lors d'une analyse structurale de MEK1, a un rôle auto-inhibiteur, du fait qu'il effectue

des contacts extensifs avec le domaine kinase, donc de ce fait, il peut stabiliser la conformation inactive « alphaC-hélice out »(50).

d. ERK

Dans la voie de MAPK, il existe deux ERK en aval de MEK1/2 : ERK1 et ERK2(51).

Les ERK sont des sérine/thréonine kinases, dont leurs activités sont régulées, positivement, par une phosphorylation médiatisée par MEK1/2. En outre, les ERK peuvent, directement, phosphoryler plusieurs facteurs de transcription y compris : Ets-1, c-Jun, et c-Myc(21).

Certes, ERK possède plusieurs cibles, et peut entrer dans le noyau afin de phosphoryler plusieurs facteurs de transcription. Non seulement, cette protéine peut phosphoryler plusieurs protéines incluses dans le cycle de régulation cellulaire, mais aussi peut activer le facteur de transcription NF-kB (52,53).

Autrement, ERK2 est associé positivement dans la prolifération, tandis que ERK1 peut inhiber les effets de ERK2 dans certaines cellules(54).

e. Les effecteurs

Les MAPK ont une propriété de phosphoryler et d'activer de nombreux facteurs de transcription, tels que : ELK1, ETS, FOS, JUN, MYC et SP1 (figure8). Ceux-ci engendrent l'expression de nombreux gènes, étant impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération (55–61).

Du même, les MAPK sont capables de phosphoryler une famille d'une dizaine de kinases, possédant des propriétés biologiques diverses, en citant : MK, RSK, MNK. Ceux-ci exercent des effets nombreux dans la cellule, dont la prolifération et l'adhésion cellulaire font parties (62–64).

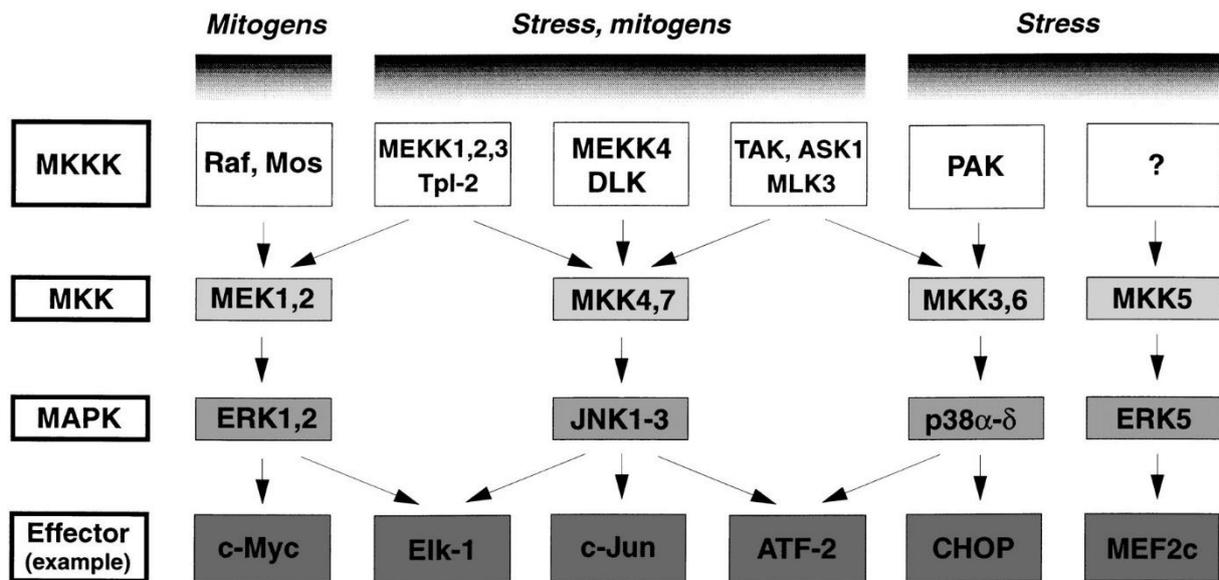


Figure 8: les effecteurs de la voie de MAPK(9)

3. Altérations oncogéniques

La voie de MAPK active et phosphoryle les facteurs de transcription, l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération ; dont la plupart d'eux sont identifiés comme étant proto-oncogène. De plus, il est connu que la cascade de signalisation MAPK est une voie de l'oncogenèse, de plus qu'étant une voie des plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs Y(65).

Vu que la protéine adaptatrice GRB2 et le facteur d'échange GDP-GTP, ne peuvent pas subir de mutations oncogéniques, ceci n'est pas le cas pour RAS, dont ses trois isoformes sont mutées dans nombreux cancers(66).

En effet, les mutations activatrices ont pour siège les codons 12 et 13, où elles remplacent deux glycines par d'autres acides aminés. la protéine mutée conserve plusieurs propriétés : la liaison au GDP, l'échange GDP-GTP, la reconnaissance et le recrutement de la protéine RAF ; or elle devient incapable d'effectuer sa fonction enzymatique intrinsèque de cliver le GTP en GDP : ce qui fait, elle reste active en permanence pour transmettre un signal de prolifération (67). Cependant, des mutations, plus rares, au niveau du codon 61, entravent la stimulation de l'activité GTPasique par le facteur GAP ; ceci performe les mêmes conséquences, soit que l'activité enzymatique intrinsèque de RAS restant insuffisante pour une désactivation rapide (9,68). Pour les mêmes raisons, des mutations, désactivant le système de stimulation de l'activité GTPasique de RAS, auront un effet oncogénique. Néanmoins, les facteurs GAP, ou les facteurs qui leur sont associés comme la protéine NF1, sont des

suppresseurs de tumeurs, ce qui rend l'altération germinale de NF1 responsable de la neurofibromatose et entre dans l'oncogénèse (figure9) (69).

Du même, la protéine BRAF constitue un point d'appel pour l'oncogénèse, dont la mutation BRAF V600 est la plus connue(70).

Certes, on ne connaît pas de mutations activatrices d'ARAF et exceptionnellement de CRAF. Cela est à cause de la nécessité de plusieurs mutations induites sur deux protéines afin de les activer (71–74). Tandis que, BRAF nécessite seulement l'introduction d'une charge négative à proximité des acides aminés 599-602, dans l'intention d'imiter la présence d'un groupement phosphate. La seule mutation qui performe cette action est V600E, ceci est par l'introduction d'un acide glutamique environ des sites de phosphorylation du domaine catalytique. En outre, ces mutations sont souvent rencontrées dans les mélanomes, et les cancers thyroïdiens ; ainsi dans d'autres cancers comme ceux de l'ovaire et de côlon (figure9) (5,75,76).

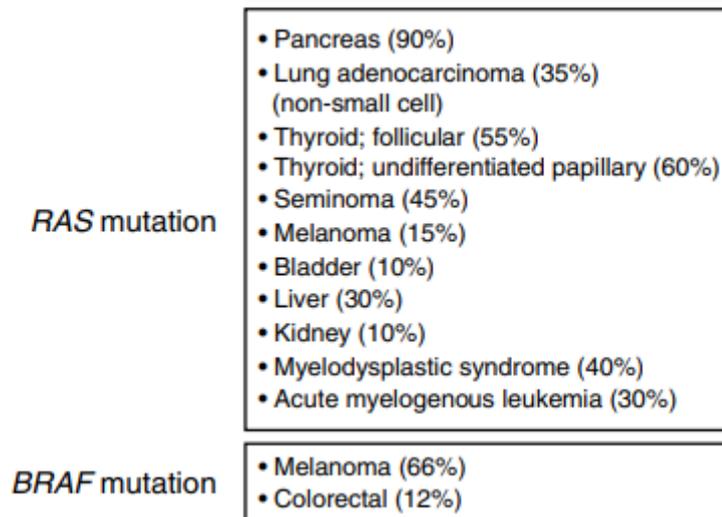


Figure 9: les maladies causées par les mutations RAS et BRAF(18)

Tandis que, Les protéines MEK et ERK ne subissent plus une mutation activatrice, pourtant , elles sont surexprimées dans les cancers (figure10), en apportant une grande contribution à l'oncogénèse (77).

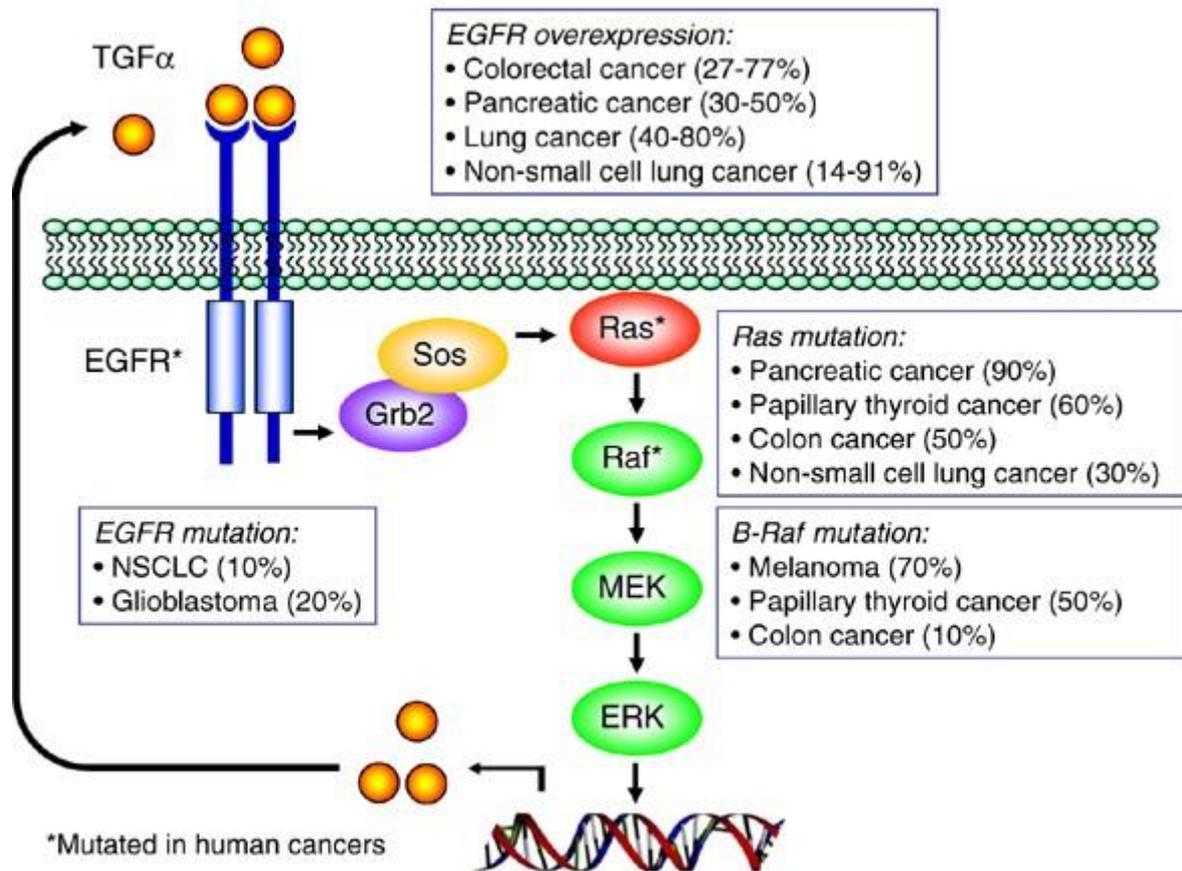


Figure 10 : un schéma d'altération oncogénique en cascade de MAPK(78)

4. Cibles pharmacologiques

Afin de découvrir des molécules capables d'inhiber la voie de l'altération oncogénique, tous les niveaux de la cascade de MAPK ont été explorés en plan pharmacologiques. Ceci a pour but d'avoir des propriétés antiprolifératives utilisées dans le traitement de cancer (79–81).

Tout d'abord, Les protéines adaptatrices, dotées de domaines SH2, pourraient, théoriquement être inhibées par des composés imitant les interactions protéine-protéine. Ceci est du fait que les peptides galèrent pour s'intégrer dans la cellule, par la suite, ceci présente un mal développement pharmacologique(82).

Par ailleurs, Les protéines RAS sont orientées vers l'inhibition de leur insertion membranaire. En effet, en des conditions normales, l'identification des molécules, pourvues d'activités inhibitrices de la farnésyl transférase ou de la géranylgeranyl transférase, sont développées. Il existe quatre classes d'inhibiteurs :

- Les analogues du farnésyl diphosphate,
- Le substrat de la farnésyl transférase,
- Les peptidomimétiques de la boîte CAAX,

➤ les inhibiteurs bi-substrats et les produits naturels obtenus par criblage(34).

Malgré, leurs actions inhibitrices, ces molécules dévoilent une grande toxicité (83).

Autrement, Un inhibiteur de RAF appelé le Sorafénib était identifié d'être un inhibiteur puissant contre les récepteurs VEGF, en empêchant ainsi la prolifération oncogénique. Celui-ci peut inhiber l'activité kinase de RAF, en entrant en compétition son substrat qui est l'ATP(84).

Plusieurs inhibiteurs de MEK sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase I et II(9). En fait, les inhibiteurs allostériques MEK montre une faible capacité pour l'inhibition d'activité kinase MEK, en présence d'une signalisation en amont très élevée. Cependant, CH5126766 est un inhibiteur MEK, qui a pour action l'inhibition de MEK et RAF, à cause de sa liaison à MEK, en résultant un changement conformationnel, qui interfère avec la phosphorylation MEK par RAF, ce qui le libère du complexe RAF-MEK(85,86). Du même, des data cliniques suggèrent que cet inhibiteur de MEK peut avoir une activité élevée contre les tumeurs des mutants RAS, surtout en NSCLC(86). Enfin, il existe un nouveau inhibiteur MAP855, étant ATP-compétitif, qui se lie au site catalytique(87).

Par ailleurs, il existe un inhibiteur ERK, SCH772984, qui conduit à une faible activité kinase ERK, puis à une réduction de phosphorylation ERK médiée par MEK(88). Pourtant, les inhibiteurs ERK ne sont pas très capables de la réactivation de la voie MAPK, à cause du signal en amont élevé, qui est associé aux inhibiteurs MEK(88,89).

III. Protéine BRAF

1. Biologie de BRAF

Dans les cellules mammaliennes, il existe trois protéines RAF : ARAF, BRAF, CRAF. Les familles de RAF possèdent trois domaines conservés : CR1, CR2, et CR3. Chacun de ces domaines performe des actions spécifiques :

- Le domaine CR1 est un domaine auto-régulateur de RAS GTP-binding,
- Le domaine CR2 est une région charnière, qui est très riche en sérine,
- et enfin le domaine CR3 qui est un domaine catalytique de la protéine sérine/thréonine kinase, phosphorylant une séquence consensus sur les substrats de protéine(90,91).

Dans sa forme active, BRAF forme un dimère et fonctionne comme une protéine ser/thr kinase spécifique. Le domaine régulateur N-terminal de BRAF, quand est inactif, auto-inhibe le domaine kinase C-terminal. Ainsi, ces dimères sont stabilisés par des protéines hétérodimères 14-3-3(91). Etant activée par RAS GTPases, RAF est recrutée à la membrane plasmique. Ceci est régulé par l'interaction RAS-GTP, ainsi par une série de phosphorylation sur la protéine RAF(92).

Etant donné, la protéine BRAF se situe sur le chromosome 7q34(93).

Par ailleurs, la protéine BRAF contient 766 acides aminés. Du même, la protéine BRAF est divisée en trois régions conservées CR , dont chacune a sa propre fonction (figure 11) :

- CR1, ayant 120-280 acides aminés, auto-inhibe le domaine kinase CR3 de BRAF, en protégeant les cellules de décharger des substrats kinases inappropriés des réactions kinétiques. Celui-ci a deux domaines :
 - Les acides aminés 155-227 constituent le domaine de liaison de RAS « RAS binding domain » (RBD). Lors de la liaison RAS-GTP, cette région libère l'interaction auto inhibitrice CR1-CR3, afin de libérer CR1 et de cesser l'inhibition kinase.
 - Les acides aminés 234-280 constituent un motif de liaison de phorbol ester (diacylglycérol) zinc doigt « zinc finger » ; celui-ci participe dans le Docking dans la membrane RAF après la liaison RAS-GTP.
- CR2, ayant 314-343 acides aminés, et en étant flexible, se comporte comme une charnière pour CR1 et CR2.

- CR3, une structure en double lobe, contenant 457-717 acides aminés, qui possède le domaine kinase de la protéine. Dans cette région, on a deux domaines :
 - Domaine de liaison à ATP 'ATP binding' avec des acides aminés 463-483,
 - Domaine kinase catalytique avec des acides aminés 572-584(94,95).

Cependant, le lobe le plus petit de N-terminal lie l'ATP, tandis que le lobe de C-terminal lie les substrats des protéines. Un motif DGF existe également dans le C-terminal à la fin de CR3, dont sa fonction est le blocage de la liaison ATP, lors de l'inactivation de BRAF, capable ainsi de stabiliser la conformation ouverte. Sans oublier la boucle d'activation (596-600aa), qui forme de fortes interactions hydrophobes avec la boucle P, au niveau de la conformation inactive de la kinase, en bloquant ainsi la kinase dans son état inactif jusqu'à ce que la boucle d'activation soit phosphorylée, tandis que la présence d'une charge négative déstabilise ces interactions. Cela déclenche le passage à l'état actif de la kinase (4,70). Ces deux lobes flanquent la fente active de kinase avec le résidu D576, en faisant face à l'intérieur de celle-ci. Par ailleurs, le lobe de N-terminal contient aussi une boucle 'P' « P-Loop », qui a pour fonction la stabilisation de la liaison ATP, grâce à des interactions électrostatiques avec un groupement phosphate chargé négativement. Il existe, également, des interactions hydrophobiques qui ont pour but la stabilisation des interactions avec le nucléoside ATP (figure11) (94).

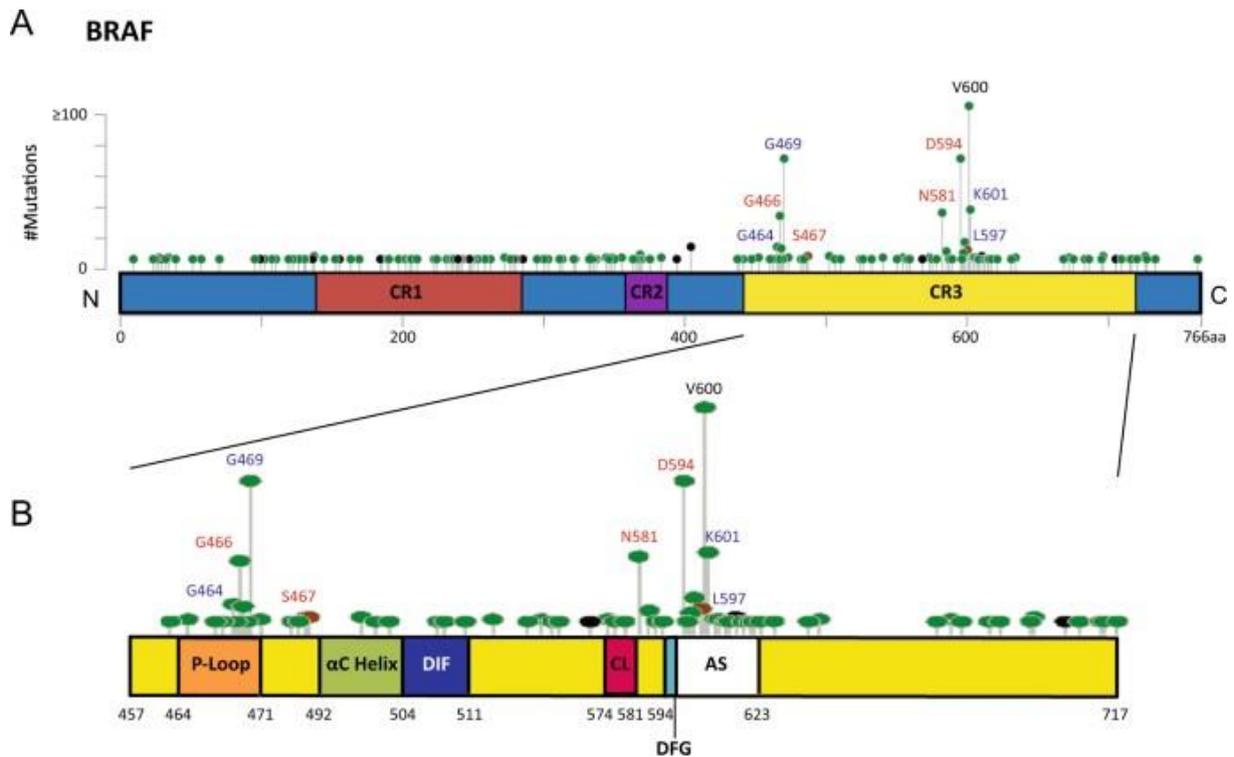


Figure 11: la structure de la protéine BRAF(4)

2. BRAF étant un proto-oncogène :

BRAF est un proto-oncogène, sérine/thréonine kinase qui représente les mutations les plus communes et les meilleures caractérisées des oncogènes chez les humains en oncologie. De plus, des tumeurs qui abritent les mutations BRAF, touchent la plupart des organes des différents systèmes et représentent une grande malignité(96).

Approximativement, il existe 200 allèles des mutants BRAF dans les tumeurs humaines. En plus, 30 mutations distinctes de BRAF est caractérisées dans le plan fonctionnel (97).

La plupart des mutations ont été identifiées dans le domaine kinase (CR3), avec une seule substitution d'un acide aminé, V600E, qui compte à 90% des mutations(97).

Un seul coup sur la voie MAPK est suffisant pour l'oncogénèse, tant que, couramment, data montre un peu de chevauchement de BRAF et les mutations actives de RAS dans les échantillons de cancer(98)

Cependant, les mutations de BRAF peuvent être divisées en trois catégories ou classes, basées sur leurs effets en activité de BRAF (tableauI). Les mutations de classe 1 sont RAS-indépendantes et fonctionnent comme un monomère actif. Or, les mutations de classe 2 fonctionnent comme un dimère actif.

Tableau I: les différentes mutations de BRAF, leurs classes et leurs dépendances en RAS(99)

Class	RAS Dependent	Missense Mutations
Class 1	No	V600E, V600K, V600D, V600R, V600M, etc.
Class 2	No	K601E, K601N, K601T, L597Q, L597V, G469A, G469V, G469R, G464V, etc.
Class 3	Yes	D287H, V459L, G466V, G466E, G466A, S467L, G469E, N581S, N581I, D594N, D594G, D594A, D594H, F595L, G596D, etc.

Ces deux classes des mutants BRAF deviennent largement indépendante de signal en amont régulateur de RAS-GTPases pour leurs activités. Ceci résulte en une activation constitutive de BRAF, étant indépendante de stimuli externe pour la croissance et la prolifération cellulaire. Cependant, pour les mutations de la classe3, elles dépendent de la signalisation par RAS pour son activation optimale (figure 12,13) (100).

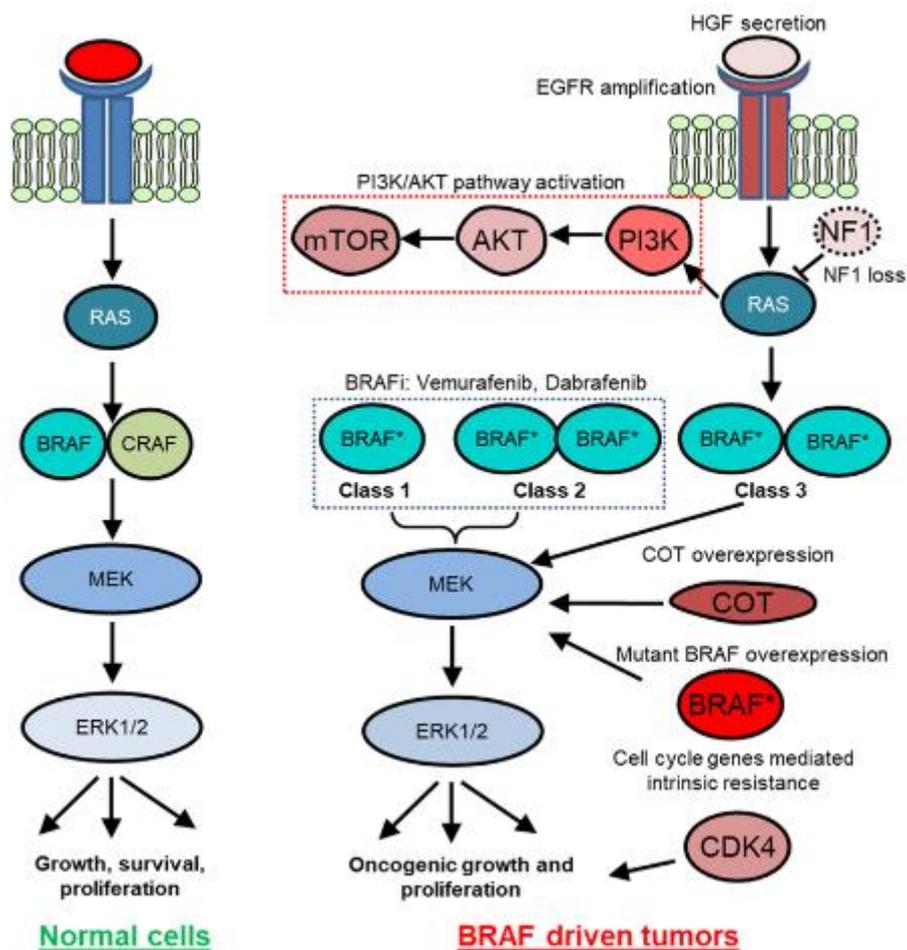


Figure 12: le signal médié par BRAF dans les cellules normales et dans les cellules malignes(99)

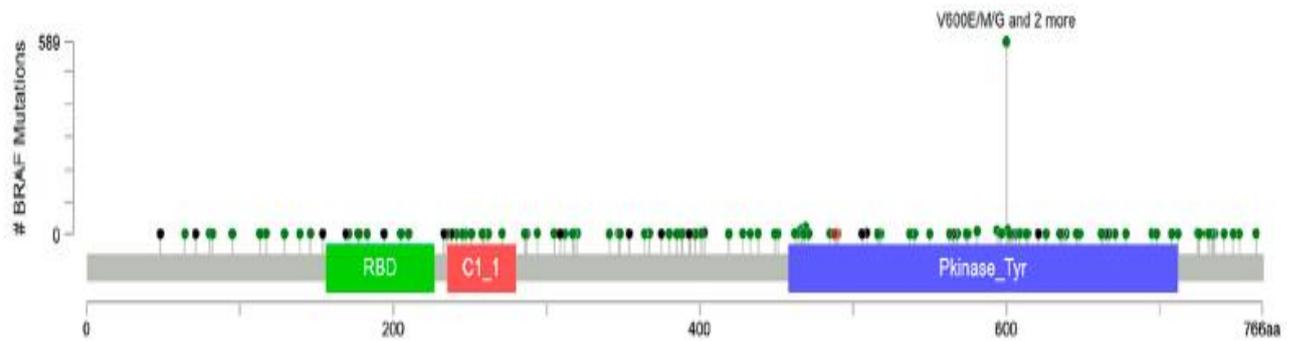


Figure 13 : le spectre des mutations BRAF en cancer(101)

Par ailleurs, les mutations de ces classes présentent une signalisation MAPK élevée, dû à l'activation RAS. Or, l'activité des mutations de classe 3 dépendent de niveau de RAS-GTP. Cependant, le blocage du signal en amont de RAS est une cible thérapeutique potentielle contre les mutations BRAF de classe 3, par opposition des classes 1 et 2 (97,100,102).

3. Différentes mutations et classes de BRAF

Les mutations de BRAF sont regroupées en trois classes (figure 14) basées sur :

- Leur activité kinase,
- Leur dépendance en RAS,
- et leur statut de dimérisation (3).

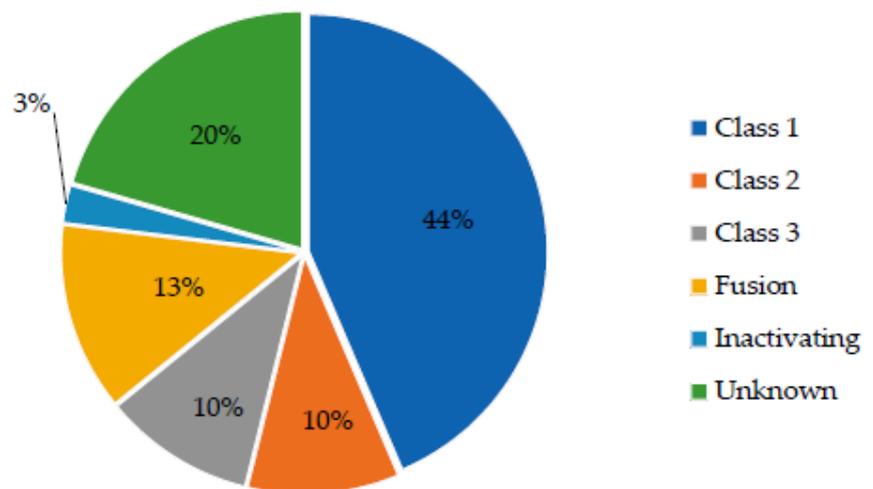


Figure 14: les types des mutations divisés en classes(3)

a. Mutations de classe 1 :

Ces mutations sont identifiées en les tumeurs chez les humains(103). On les nomme les mutations BRAF V600, du fait que c'est la mutation la plus connue de cette classe. Celle-ci

est formée par une substitution de valine en acide glutamique en position 600. Cependant, elle a, pour action, la libération du domaine auto-inhibiteur du site actif, par le changement de conformation, permettant aux monomères BRAF, à adopter une configuration active et ouverte. Ainsi, ceci permet aux monomères BRAF V600 mutés d'activer le signal en aval MEK1/2 indépendamment de la dimérisation(104,105).

Les mutations V600E(tableau2) activent fortement les signaux en aval ERK, conduisant à la suppression de celui-ci en amont de l'activité RAS, par une réponse négative d'ERK actif ; ceci résulte par une faible activité RAS basale de ces cellules(106).

Autrement, BRAF V600D/E/K/R mutations sont référées à la classe 1 mutants, du fait qu'elles sont dotées d'une grande activation de l'activité kinase de BRAF et une autre constitutive de la voie MAPK. *In vitro*, les essais ont démontré que BRAF V600D/E mutants ont élevé l'activité kinase avec à peu près 500-700-fold par rapport au type sauvage BRAF en COS cellules(107).

Cependant, un feedback négatif en RAS, comme un résultat de l'activation constitutive de MAPK, prévient la dimérisation de BRAF et facilite un environnement où le signal de V600 mutant BRAF protéines joue comme monomère (108–111). En terme de structure, la mutation V600E élève l'activité BRAF en formant un pont de sel avec K507 en C-terminal portion de alpha C hélice. Ceci force l'activation de segment pour se replier en inverse vers une conformation active (107,112).

L'interaction entre V600E et K507 imite le changement de conformation, qui arrive lors de la dimérisation, ce qui explique la raison pourquoi V600E ne dépend pas de la dimérisation de l'activité kinase élevée(108,112–114).

b. Mutations de classe 2 :

En effet, des mutations non-V600E de BRAF activent MEK par la dimérisation mais sans l'activation de RAS. La dimérisation RAS-indépendante conduit à l'élévation de l'activation ERK avec une activité RAS basse à basse feedback(97), mais expose moins l'engagement de la voie relatif aux mutants BRAF V600D/E(107).

L'activité kinase intermédiaire de classe 2 (tableau2) est associée avec une activation basse de la voie MAPK, comparé au signal induit par RAS oncogénique. Néanmoins, les mutations de classe 2 demeurent au niveau de la boucle P « P-Loop » et fonctionnent réciproquement à celles dans le segment d'activation(112).

D'une autre part, les fusions BRAF fonctionnent comme les mutations de classe 2. La fusion la plus commune est KIAA1549-BRAF. Celle-ci était identifiée en gliome, et composée d'une dimérisation N-terminal du domaine KIAA, et C-terminal du domaine kinase de BRAF(93). Pendant cette fusion, le domaine régulateur de BRAF est perdu, conduisant à une augmentation d'affinité de dimérisation, ce qui laisse l'activité indépendante kinase de BRAF de régulation du signal en amont (115).

Les mutants de classe 2 sont identifiés par avoir soit une moyenne, soit une grande activité kinase, et sont subdivisées en classe 2a et en classe 2b.

- Classe 2a, comme K601E et L597Q, qui apparaît en segment d'activation de BRAF, qui a une activité kinase très grande due au fait d'enlever les interactions avec la boucle P (P-Loop), ce qui conduit à un niveau modéré de l'activation de la voie MAPK,
- Classe 2b, comme G464 et G469, apparaît dans la boucle P riche en glycine. En comparaison, les mutants de classe 2b activent la voie de MAPK en un bas degré, mais restent augmentés en comparaison avec le type sauvage BRAF(116)

c. Mutations de classe 3 :

Les mutations ont une activité kinase altérée et parfois absente, ces mutations sont dépendantes de RAS, et de l'apport en amont des récepteurs tyrosines kinases pour leur activité(107,117–119).

Les mutations de classe 3 (tableauII) se lient fortement aux RAS activés contrairement au type sauvage de BRAF, en conduisant à une augmentation de l'activation de liaison du partenaire type sauvage (BRAF, CRAF, ARAF) en dimérisation(107).

Ces amplificateurs de signalisation ERK se produisent en conjonction avec les autres mutations qui augmentent le signal en amont d'activité RAS, comme les mutations RAS, la perte NF1, ou les mutations RTK ou amplification(102).

Tableau II: les types de mutations regroupées en classes 1,2, et 3 observés chez 114,662, ainsi le taux des cas et le nombre d'apparition pour chaque mutation (116)

Mutation	Class	N occurrences	% of cases				
CLASS 1 TOTAL		2847	2.5	G464R	2	13	0
V600E/V600E(2)	1	2544	2.2	V471F	2	10	0
V600K	1	251	0.2	K601Q	2	3	0
V600R	1	42	0	Q257R	2	3	0
V600L	1	3	0	T599R	2	3	0
V600D	1	1	0	V487_P492delinsA	2	3	0
CLASS 2 TOTAL		746	0.7	L597S	2	3	0
G469A	2	160	0.1	G464A	2	2	0
K601E	2	132	0.1	K499E	2	2	0
G469V	2	84	0.1	L505H	2	2	0
G469R	2	63	0.1	K601T	2	2	0
G464V	2	38	0	V600_K601delinsEN	2	1	0
L597R	2	34	0	V600_S605delinsEISRWR	2	1	0
K601N	2	30	0	L505F	2	1	0
E586K	2	20	0	L485_P490delinsY	2	1	0
T599dup	2	19	0	I463S	2	1	0
L597Q	2	19	0	CLASS 3 TOTAL		801	0.7
V600_K601delinsE	2	18	0	D594G	3	159	0.1
L485F	2	16	0	D594N	3	139	0.1
N486_P490del	2	14	0	G466V	3	94	0.1
G464R	2	13	0	N581S	3	61	0.1
V471F	2	10	0	G466E	3	67	0.1
K601Q	2	3	0	G596R	3	46	0
Q257R	2	3	0	N581I	3	43	0
T599R	2	3	0	G466R	3	33	0
V487_P492delinsA	2	3	0	G466A	3	28	0
L597S	2	3	0	S467L	3	18	0
G464A	2	2	0	G469E	3	17	0
K499E	2	2	0	N581Y	3	16	0
L505H	2	2	0	K483E	3	14	0
K601T	2	2	0	D594A	3	10	0
V600_K601delinsEN	2	1	0	D594E	3	10	0
V600_S605delinsEISRWR	2	1	0	D594H	3	8	0
L505F	2	1	0	F595L	3	5	0
L485_P490delinsY	2	1	0	D287H	3	4	0
				D594V	3	3	0
				G596C	3	3	0
				T599A	3	2	0
				N581K	3	1	0
				Other Pathogenic/ Presumed Pathogenic		129	0.1
				Total		4517	3.9

En effet, les mutations, causant du cancer, ne sont pas seulement responsables de perte de fonction, ce qui fait, il existe trois types de mutations, qui contribuent à la progression du cancer :

- Les mutations activatrices ou « gain de fonction » comme BRAF, responsables de la conversion des gènes normaux en oncogènes,
- Les mutations de « perte de fonction », qui sont capables d'inactiver les suppresseurs des tumeurs,
- Les mutations de « résistance aux médicaments », comme la classe 2 et 3 de BRAF, qui surmontent l'effet inhibiteur d'un médicament sur la protéine ciblée(120) (121).

4. Maladies causées par BRAF

BRAF est la cause principale de nombreuses maladies dans le corps humain.

En effet, les mutations BRAF de la lignée germinale, à l'aide du domaine CR1 et le domaine protéine tyrosine kinase, peuvent induire le syndrome cardio-facio-cutané, dont il est associé avec un dysmorphisme facile, un retard mental, et un défaut cardiaque. Les gens ayant ce syndrome, rarement développent un cancer (122,123).

En outre, les mutations somatiques en BRAF sont parmi les altérations oncogéniques les plus communes chez l'homme. Les mutations oncogéniques de BRAF présentent environ 6% des tumeurs humaines, et sont localisées le plus souvent au niveau de la région conservé CR3(4)

Cependant, les mutations BRAF sont associées avec un grand nombre des proliférations bénignes, ainsi les tumeurs de néoplasme avec un faible potentiel prolifératif, en touchant tous les organes du corps humain. Ceci va inclure : endosalpingéose(124), adénome métanéphrique et tumeurs métanéphriques stromales(125), craniopharyngiomes papillaires(126), ganglioglioma, adénome pituitaire, adénomes bronchiales/ cancer de poumon papillaire muconodulaire cilié, maladie Erdheim-Chester(127).

Par ailleurs, les mutations oncogéniques en BRAF ont reporté +40% des mélanomes cutanées, qui est causée par la mutation V600 de BRAF(128).

Selon le cancer génome atlas 'TCGA', plusieurs maladies sont reportées(tableauIII), dans différents types d'organes(tableauIV) , dont la cause principale est la protéine BRAF(129).

Tableau III : les différentes maladies de BRAF, et le nombre des cas pour chaque maladie (130)

Maladies	Cas
adenomas and adenocarcinomas	467
melanomas	242
plasma cell tumors	72
cystic, mucinous and serous neoplasms	35
squamous cell neoplasms	34
gliomas	16
transitional cell papillomas and carcinomas	13
ductal and lobular neoplasms	11
mature b-cell lymphomas	3
soft tissue tumors and sarcomas	3
complex epithelial neoplasms	2
neoplasms	2

acinar cell neoplasms	1
complex mixed and stromal neoplasms	1
epithelial neoplasms	1
mesothelial neoplasms	1
paragangliomas and glomus tumors	1
thymic epithelial neoplasms	1

TableauIV: les sites primaires de BRAF et le nombre des cas trouvé pour chaque site (130)

Primary site	Cases
thyroid gland	287
skin	243
colon	79
hematopoietic and reticuloendothelial systems	72
bronchus and lung	64
corpus uteri	33
stomach	29
brain	16
bladder	13
breast	9
prostate gland	8
rectum	8
kidney	5
ovary	5
cervix uteri	4
larynx	4
pancreas	3
esophagus	2
liver	2
lymph nodes	2
tonsil	2
uterus	2
adrenal gland	1
heart	1
hypopharynx	1
thymus	1

En plus, la database OMIM ‘Online Mendelian Inheritance in Man’, qui est une database contenant un catalogues des maladies liées à n’importe quel gène, identifie plusieurs maladies causées par les mutations BRAF (tableau V) (131).

TableauV: les différentes maladies liées aux mutations BRAF (132)

Phénotype	Mutation
MELANOMA, MALIGNANT, SOMATIC ; COLORECTAL CANCER, SOMATIC, INCLUDED ; THYROID CARCINOMA, PAPILLARY, SOMATIC, INCLUDED ; NONSEMINOMATOUS GERM CELL TUMORS, SOMATIC, INCLUDED ; ASTROCYTOMA, LOW-GRADE, SOMATIC, INCLUDED	BRAF, VAL600GLU
COLON CANCER, SOMATIC	BRAF, ARG462ILE
COLORECTAL CANCER, SOMATIC	BRAF, ILE463SER
COLORECTAL CANCER, SOMATIC	BRAF, GLY464GLU
COLORECTAL CANCER, SOMATIC ; THYROID CARCINOMA, FOLLICULAR, SOMATIC, INCLUDED	BRAF, LYS601GLU
ADENOCARCINOMA OF LUNG, SOMATIC	BRAF, GLY466VAL
ADENOCARCINOMA OF LUNG, SOMATIC	BRAF, LEU597ARG
NONSMALL CELL LUNG CANCER, SOMATIC	BRAF, LEU597VAL
LYMPHOMA, NON-HODGKIN, SOMATIC	BRAF, GLY469ARG
LYMPHOMA, NON-HODGKIN, SOMATIC	BRAF, GLY469ALA
LYMPHOMA, NON-HODGKIN, SOMATIC	BRAF, ASP594GLY
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, ALA246PRO
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, GLN257ARG
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, GLY469GLU
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, LEU485PHE
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, LYS499GLU
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, GLU501LYS
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, GLU501GLY
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, ASN581ASP
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, GLY534ARG
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1	BRAF, ASP638GLU
NOONAN SYNDROME 7	BRAF, THR241MET
NOONAN SYNDROME 7	BRAF, THR241ARG
CARDIOFACIOCUTANEOUS SYNDROME 1 ; LEOPARD SYNDROME 3, INCLUDED	BRAF, THR241PRO
NOONAN SYNDROME 7	BRAF, TRP531CYS
NOONAN SYNDROME 7	BRAF, LEU597VAL
LEOPARD SYNDROME 3	BRAF, LEU245PHE

Autrement, la data base OncoMX où elle permet la présentation des différentes mutations cancéreuses, ainsi que leurs différentes expressions(133). Du même, cette data base montre les types de cancer causés par les mutations BRAF (figure15).

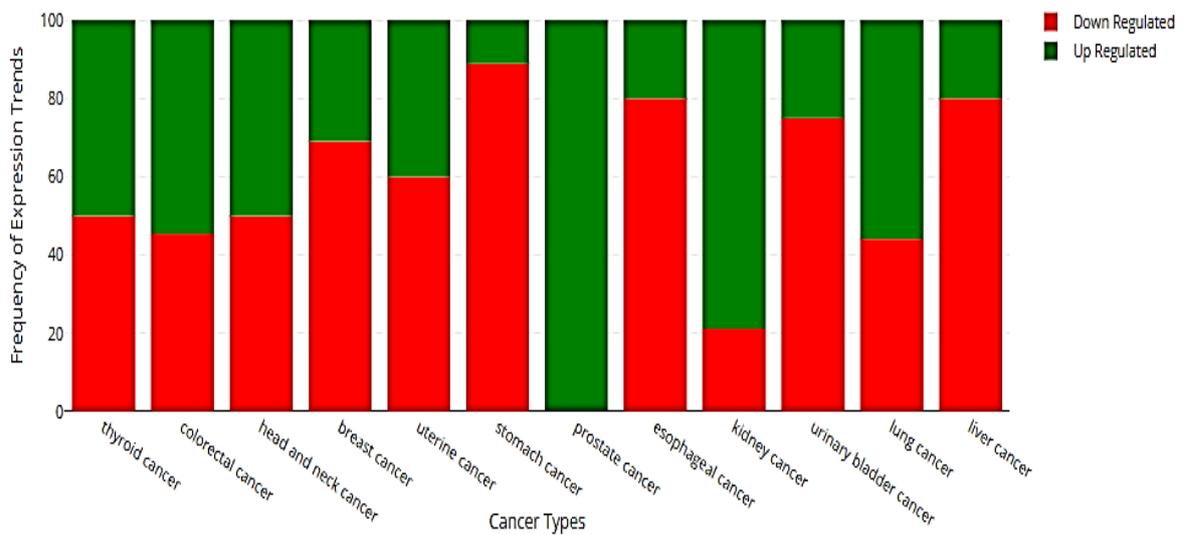


Figure 15: la fréquence d'expression de chaque type de cancer par la protéine BRAF(134)

5. Inhibiteurs de BRAF

a. Inhibiteurs de RAF de type 1

Les inhibiteurs de RAF de type 1 sont des petites molécules ATP-compétitifs qui, par sélection, se lient et inhibent non seulement les BRAF V600E mais tous les monomères RAF(135). Ceux-ci sont efficaces en inhibition de ERK dans les cellules, où le signal ERK est conduit par BRAF V600E. En outre, il y a trois inhibiteurs approuvés par FDA dans cette classe pour les cancers : Vémurafenib, Dabrafenib, et Encorafenib(136,137).

Les inhibiteurs RAF de type 1 cause une augmentation du signal ERK, dans les cellules avec le type sauvage RAF et les mutations non-V600E, par faciliter la formation des dimères RAF, spécialement, les hétérodimères BRAF-CRAF(135,138,139). Lors de liaison avec RAF, ces inhibiteurs activent également le domaine catalytique du partenaire de liaison du RAF. Ceci mène à une croissance du signal en aval et peut même accélérer la croissance des tumeurs chez les patients, dont les tumeurs ne sont pas dirigées par les mutations de classe 1. Pour cette raison, les inhibiteurs RAF de type 1 doivent seulement être utilisés contre les mutations BRAF V600E (tableau VI). Même si dans ce groupe sélectionné, la plupart des tumeurs développent une résistance envers la monothérapie par les inhibiteurs RAF, il est nécessaire de réaliser une combinaison avec la thérapie avec les inhibiteurs MEK (140).

b. Briseurs de paradoxe

C'est la troisième génération des inhibiteurs RAF (tableau VI) qui inhibent BRAF sans favoriser la dimérisation, empêchant ainsi la régulation paradoxale en amont du signal ERK(141–143).

Ils ont le potentiel d'être efficace contre les mutations V600E, les variantes d'épissure, et les mutations RAS du signal en amont(144). Ainsi, un briseur de paradoxe nommé PLX8394, est efficace contre les mutations BRAF de classe 1 et 2, et perturbe la formation dimère comme un outil pour inhiber le signal ERK(145)

c. Perturbateurs des dimères

Ces perturbateurs (tableau VI) fonctionnent en bouleversant les homos ou les hétérodimérisations, par la prévention de l'activation du signal en aval MEK. Ceux-ci sont des inhibiteurs puissants car ils peuvent interférer avec la signalisation de type sauvage RAF, et également les mutants RAF. Ceux-ci sont efficaces contre les mutations de classe 2, les deux sont des dimères-indépendants, en activant les mutations points ainsi les fusions dans les tests précliniques(97,146).

Cependant, Deux sont en évaluation dans les premières phases cliniques : TAK-580 et BGB-283(141,145).

d. Inhibiteurs des MEK

La réactivation de signal ERK est un mécanisme commun de résistance contre les inhibiteurs RAF. Les inhibiteurs RAF sont combinés avec les inhibiteurs MEK (tableau VI) chez les patients souffrant des tumeurs BRAF-V600E mutées. Tandis que, Les inhibiteurs MEK fonctionnent comme des inhibiteurs allostériques, en prévenant le changement conformationnel de MEK en sa forme active par la phosphorylation RAF. Ce qui empêche MEK de phosphoryler le signal en aval ERK. La monothérapie par les inhibiteurs MEK conduit aux réponses non-durables chez les patients avec un mélanome contenant une mutation BRAF V600E(147)

Le traitement des patients avec les tumeurs BRAF mutées par les inhibiteurs RAF est déjà inefficace. La thérapie par combinaison de RAF/MEK, retarde l'apparition de résistance en inhibant plusieurs cibles dans la même voie simultanément, et en prévenant la réactivation de rebond et en produisant une inhibition profonde de ERK ; ceci est approuvé par FDA pour plusieurs types de cancer (148–150).

TableauVI: les inhibiteurs RAF, MEK, ERK, leur utilité clinique et leur statut durant le développement (3)

RAF Inhibitors			
Generation	Drug Name	Manufacturer	FDA Phase
1st	Sorafenib (Nexavar)	Bayer/Onyx Pharmaceuticals	Approved for hepatocellular and renal cell carcinoma
2nd	Vemurafenib (Zelboraf)	Genentech	Approved for BRAF V600E advanced melanoma and Erdheim-Chester Disease
2nd	Dabrafenib (Tafinlar)	Novartis	Approved for BRAF V600E/K melanoma or metastatic non-small cell lung cancer
2nd	Encorafenib (Braftovi)	Array BioPharma	Approved for BRAF V600E/K advanced melanoma
3rd	TAK-580	Millennium Pharmaceuticals	Phase I/II ongoing
3rd	PLX8394	Plexikon	Phase I/IIa ongoing
3rd	BGB283	BeiGene	Phase 1 ongoing
3rd	LY3009120	Eli Lilly	Phase I terminated
3rd	BAL3833 (CCT3833)	Basilea	Phase 1 completed
MEK Inhibitors			
	Drug Name	Manufacturer	FDA Phase
	Cobimetinib (Cotellic)	Genentech	Approved for BRAF V600E advanced melanoma
	Trametinib (Mekinist)	Novartis	Approved for BRAF V600E/K melanoma or metastatic non-small cell lung cancer
	Binimetinib (Mektovi)	Array BioPharma	Approved for BRAF V600E/K advanced melanoma
	Selumetinib	AstraZeneca	Breakthrough Therapy Designation; Phase II trials ongoing
	RO5126766	Chugai Pharmaceutical	Phase I ongoing
	HL-085	Shanghai Kechow Pharma	Phase I ongoing
ERK Inhibitors			
	Drug Name	Manufacturer	FDA Phase
	Ulixertinib	Merck	Phase I/IIa completed
	LY3214996	Eli Lilly & Company	Phase I ongoing
	LTT462	Novartis	Phase Ib ongoing

Par ailleurs, Les inhibiteurs MEK peuvent être efficaces contre les autres mutations causant le signa ERK hyperactif. En tenant compte que MEK est le signal en aval de RAF, les inhibiteurs MEK ont le potentiel d'efficacité contre les tumeurs avec les mutations RAS, les mutations BRAF de type ou 2, les amplifications ou les mutations RTK, la perte NF1, et enfin l'excès de l'expression de EGFR(151).

e. Inhibiteurs des ERK

Un autre mécanisme potentiel, pour empêcher la résistance émergente contre les inhibiteurs RAF, est de cibler ERK lui-même. Les inhibiteurs ERK (tableau VI) ont le potentiel d'inhiber

le signal ERK conduit par les mutations de classe 1, 2 et 3 ; également comme les autres événements génomiques, en raison de leur inhibition directe de son nœud central lors de signalisation. Cette stratégie évite le potentiel pour l'activation paradoxale, et peut décroître la possibilité de la résistance émergente où une combinaison avec les inhibiteurs RAF est utilisée. Le risque des inhibiteurs ERK est le fait qu'ils possèdent un index thérapeutique bas et une toxicité élevée(152).

6. Résistance aux inhibiteurs

Malgré le succès remarquable et la progression des effets chez les patients, il se rencontre toujours une résistance contre les thérapies ciblant RAF/MEK(153–155)

a. Types de résistance

En effet, la résistance à la thérapie peut être classifiée en trois catégories :

- Une résistance intrinsèque,
- Une résistance adaptative,
- Une résistance acquise(156).

La résistance intrinsèque indique une absence de réponse initiale au traitement. Cependant, la résistance ciblant l'inactivation RAF/MEK, peut aussi arriver à cause d'une adaptation de novo de l'épigénétique cellulaire et les programmes de transcription, conduisant à une résistance adaptative, ainsi une réponse partielle à la thérapie(157–159).

En outre, la résistance acquise s'effectue, du fait d'une pression sélective imposée par la thérapie envers les cellules malignes, ce qui consiste des altérations génétiques hétérogènes, qui sont sélectionnées en dehors et/ou à cause de l'acquisition d'une thérapie-induite de novo des altérations(121).

b. Mécanismes de résistance

En effet, la résistance intrinsèque peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes. La signalisation de facteur de croissance est un mécanisme de la résistance intrinsèque contre l'inactivation de BRAF(160). Ainsi, la résistance peut être effectuée à travers les altérations de la voie MAPK, dans les tumeurs-conducteurs de BRAF(118). Également, la perte des régulateurs négatifs de signalisation RAS/MAPK, NF1 médiatise la résistance contre BRAF et les inhibiteurs MEK, à travers l'activation de la voie MAPK(161). Du même, cette résistance peut être médiatisée par l'effecteur YAP de la voie de transduction Hippo(159).

Cependant, le recâblage transcriptionnel et épigénétique est un autre mécanisme de résistance adaptative(162). On cite quelques mécanismes contre la résistance lors de l'inactivation de BRAF : une surexpression adaptative de la sécrétion stromale HGF et une sous-expression de CTLA4, BIM, ainsi les gènes présentant des antigènes (B2M, HLA-A, HLA-B, et TAP1)(163–170).

Tandis que, Les mécanismes de résistance acquise dans les tumeurs mutantes BRAF passent par la réactivation de la voie MAPK(171). De plus, une surexpression de BRAFV600E et des variantes d'épissage de BRAF ont été observées dans le mélanome ou le cancer du poumon lors de la résistance acquise(156,171,172). Près d'un tiers des cas de résistance acquise se produisent de manière indépendante de la voie MAPK(173). Ainsi, des exemples de mécanismes de résistance acquise à l'inactivation de la voie MAPK qui ne fonctionnent pas uniquement via la réactivation de la voie MAPK sont MITF, la signalisation WNT (LEF1, FZD6,WNT11, et WNT10A), et les amplifications et/ou l'hyperactivation des RTK (par exemple, MET, AXL, EGFR,HER2, HER3, FGFR)(163,169,173–177).

c. Stratégies pour diminuer la résistance

En raison des processus de résistance, le traitement ciblant BRAF n'a pas permis d'obtenir des avantages durables en termes de survie en tant qu'agent unique(178,179). Comme la résistance se produit souvent par la réactivation de la voie MAPK, les associations d'inhibiteurs de MEK et d'inhibiteurs de BRAF ont acquis de l'intérêt(152).

Pourtant, un ciblage continu et prolongé peut intensifier l'émergence de mécanismes de résistance et comporte le risque d'une augmentation de l'efficacité du traitement. L'émergence de mécanismes de résistance comporte le risque d'une toxicité médicamenteuse continue, en permettant aux cellules BRAF mutantes de repousser et d'induire des tumeurs résistantes aux médicaments(180,181)

De façon intrigante, il a été démontré que les cellules résistantes au Vémurafénib deviennent dépendantes de la présence du médicament lui-même et que, par conséquent, le retrait du médicament lui-même était suffisant pour la régression de la tumeur(180,182).

En outre, des études indiquent que le blocage vertical de la signalisation MAPK par les inhibiteurs de BRAF en combinaison avec les inhibiteurs de MEK offre des possibilités thérapeutiques inexploitées pour une polythérapie spécifique à la classe(87,183)

IV. Modélisation moléculaire

La protéine présente plusieurs structures, dont chacune présente des caractéristiques qui lui sont propres. Cependant, la dynamique de la protéine contribue à la stabilité de sa structure, sa flexibilité et sa fonction biologique(184) .

1. Structure des protéines

Dans la plupart des processus biologiques, au niveau des molécules, des cellules et des organismes, les protéines sont les acteurs de tous les processus de vie(185).

a. Structure primaire:

La structure primaire des protéines est représentée par la séquence d'acides aminés qui se lient pour former une chaîne polypeptidique. On a 20 acides aminés au total.

b. Structure secondaire:

La chaîne linéaire d'acides aminés se tordent et replient sur elle-même: c'est la structure secondaire. Elle se divise en 2: une structure d'hélice alpha et une structure feuillet Béta.

c. Structure tertiaire:

Dans une structure tertiaire, des régions hélicoïdales ou plissées de la chaîne polypeptidique se replient les unes sur les autres. Celle-ci est maintenue par des liaisons entre des acides aminés souvent très éloignés sur la chaîne primaire.

d. Structure quaternaire:

Cette structure correspond à l'association spécifique de plusieurs chaînes peptidiques(186).

2. Détermination de la structure:

En effet, afin de déterminer la structure d'une protéine, plusieurs méthodes sont utilisées, on cite, parmi ceux-ci:

- La cristallisation par les rayons X ou la diffraction par les neutrons,
- La microscopie électronique,
- Les techniques spectroscopiques comme NMR,
- La spectroscopie Mossbauer,
- La spectroscopie par la perturbation angulaire,
- Les études des échanges hydrogènes...(187)

3. Analyse de flexibilité, de stabilité:

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer la relation entre la flexibilité et la stabilité des protéines. Ces méthodes utilisent une perturbation externe telle que: pH, température, ou le site dirigé de mutagenèse; ceci est afin de moduler la stabilité et la flexibilité tout en mesurant les aspects de structure de leurs actions et en comparant leurs réponses respectives. Cependant la méthode d'échange d'hydrogènes isotope reste la meilleure fournissant des preuves convaincantes en ce qui concerne la relation entre flexibilité et stabilité(188).

a. Stabilité de la protéine

La stabilité est une propriété fondamentale, qui affecte la fonction, l'activité, et la régulation des biomolécules. Les changements de stabilité sont souvent trouvés chez les protéines mutées causant des maladies(189).

Plusieurs forces peuvent contribuer à la stabilisation des protéines, on cite parmi eux : les effets de l'entropie conformationnel, les effets hydrophobiques, les bonds hydrogènes, les forces de dispersion, les interactions électrostatiques, et la stabilisation par les hélices(190).

La fluctuation des protéines change avec la température, conduisant à une conclusion que les protéines avec des replis stables ont souvent une petite large fluctuations(191)

Le solvant aqueux joue un rôle significatif dans la fluctuation et la stabilité de la protéine(192). Plusieurs recherches ont montré la corrélation des fluctuations des solvants, ce qui est un déterminant majeur de la stabilité de plusieurs protéines. L'hydratation de la coque de la protéine et les résidues de surface polaire couplent la macromolécule à son environnement moléculaire voisin, conduisant à des fluctuations en enthalpie (192–195)

La stabilité de la protéine est le résultat de plusieurs interactions stabilisantes et déstabilisantes, qui ont à la somme de 5-20kcal/mol d'énergie de différence entre l'état natif et déplié. Plusieurs forces rentrent dans le repliement de la protéine, en incluant les liaisons d'hydrogène, les interactions des charges, les interactions de van der Waals, ainsi les effets hydrophobiques. L'énergie libérée de déploiement peut être large, seulement si ces forces sont impliquées dans la stabilisation(196).

Les interactions électrostatiques jouent aussi un rôle important dans la stabilité. Cette stabilité, en tenant compte des charges de résidus, dépend de la distribution spatiale de charge, de

l'effet des résidus chargés voisins, de la formation et la puissance du pont de sel, ainsi de la géométrie et la distance d'interaction(197).

b. Flexibilité de la protéine

La flexibilité de la protéine facilite l'adaptation et la reconnaissance en plusieurs événements moléculaires. En effet, la flexibilité de la protéine joue un rôle important dans la catalisation et la liaison (197).

Par ailleurs, la spectroscopie par la résonance nucléaire magnétique de résonance "NMR" reste la méthode de choix pour les investigations sur les processus dynamiques de la protéine. Celle-ci analyse plusieurs processus dynamiques à partir des bandes de vibrations jusqu'aux transitions conformationnelles ralenties (198,199). Dans un autre contexte, les stimulations de la dynamique moléculaire "MD" sont utilisées en études de dynamique des protéines. Cette approche computationnelle nous présente un aperçu concernant les mouvements et l'évolution par temps des processus de plusieurs protéines. De plus, MD permet la résolution des équations des mouvements propres, dans le but de décrire le système particulier d'intérêt, en utilisant les fonctions sélectionnées ayant un potentiel énergétique (200,201). Pourtant, il est nécessaire de différencier entre les termes flexibilité et dynamique moléculaire. La dynamique est associée avec l'échelle de temps, l'amplitude et le sens des mouvements, or la flexibilité est décrite en terme des événements de thermodynamie, fluctuations, et équilibre (197)

Ces méthodes apportent plusieurs informations sur la dépendance du temps ainsi la magnitude de fluctuations en terme de position et vitesse(202).

Par ailleurs, une protéine dans une solution peut être vue, comme une distribution statistique des micro-états avec des degrés différents de flexibilité. En plus, la flexibilité statique de la protéine peut être définie comme un nombre, une diversité, une magnitude des fluctuations conformationnelles, basées en équilibre d'indépendance en temps qui est décrit par une simple distribution de probabilité Boltzmann (191,203–205).

L'ensemble des conformations des protéines en état natif et en déploiement a des effets directs sur la flexibilité et la dynamique. Ces états sont dans lesquels les protéines sont destinées pour optimiser la structure native, en améliorant les interactions et en déstabilisant la structure non-native qui favorise les phénomènes(206).

c. Relation entre la stabilité et la flexibilité avec la fonction

En effet, la fonction des protéines est déterminée par leurs structures. Comme la plupart des protéines sont capables de se lier avec les autres protéines, l'ADN, l'ARN et avec d'autres molécules, il est nécessaire qu'elles forment et maintiennent une organisation spatiale de leurs groupements fonctionnels (207). Par contre, la plupart des protéines, possédant une conformation bien-définie, ne sont pas rigides. Ce qui explique la raison pour laquelle les types variés de flexibilité conformationnels sont nécessaires pour leurs fonctions (185).

En outre, la stabilité physicochimique et les fonctions biologiques des protéines sont associées avec leur flexibilité globale, leurs fluctuations, ainsi avec plusieurs processus dynamiques. Pour une reconnaissance moléculaire, un équilibre entre la rigidité et la flexibilité doit être atteint pour le maintien de la fonction et la stabilité (197).

La stabilité et les fonctions biologiques des protéines ont une relation avec la flexibilité globale, les fluctuations intramoléculaires, et plusieurs processus dynamiques. Un équilibre doit-être atteint entre rigidité et flexibilité, pour le maintien de la fonction et la stabilité. En outre, les protéines avec un stable replies ont la tendance d'avoir des larges fluctuations. Plusieurs études ont montré qu'il y a une relation inverse entre les fluctuations moléculaires décroissantes et la stabilité croissante. En outre, les fluctuations locales et globales conformationnelles, ainsi la flexibilité sont les deux importantes pour la fonction et la stabilité des protéines (197).

V. Conception de médicaments assistée par ordinateur (CADD)

Le processus de découverte et de développement des médicaments, étant une science, entoure essentiellement le patient, où les chercheurs s'efforcent d'améliorer les médicaments existants, ou d'inventer une molécule chimique complètement nouvelle, celle-ci doit idéalement être plus puissante que n'importe quel médicament existant dans une classe similaire. Si non, alors au moins, il doit être plus sûr que ceux existants. D'ailleurs, ce processus est une activité très longue et coûteuse, qui nécessite l'expertise de nombreux chercheurs éminents. Il faut environ de 12 à 14 ans de recherche intensive, et un investissement financier énorme pour la découverte d'un seul médicament.

Cependant, le cycle de développement d'un médicament, va de la synthèse chimique au développement Clinique, afin de la formuler sous une forme appropriée. Pourtant, l'échec à n'importe quelle étape signifie une perte énorme pour l'entreprise. Par conséquent,

beaucoup de planification est nécessaire avant que le projet soit mis en cours. Récemment, avec l'utilisation de la technologie, le processus devient une activité moins risqué, en raison de la capacité des ordinateurs à effectuer des prédictions des résultats possibles (6).

En outre, les méthodes CADD sont des outils mathématiques, permettant de manipuler et de quantifier les propriétés des médicaments candidats potentiels, mis en œuvre dans un certain nombre de programmes (figure 16). Il s'agit notamment d'une gamme de logiciels accessibles au public et au commerce (208).

Les approches générales de conception de médicaments assistée par ordinateur (CADD), qui existent actuellement, sont : la conception de médicaments fondée sur la structure (SBDD) et la conception de médicaments fondée sur le ligand (LBDD) (208).

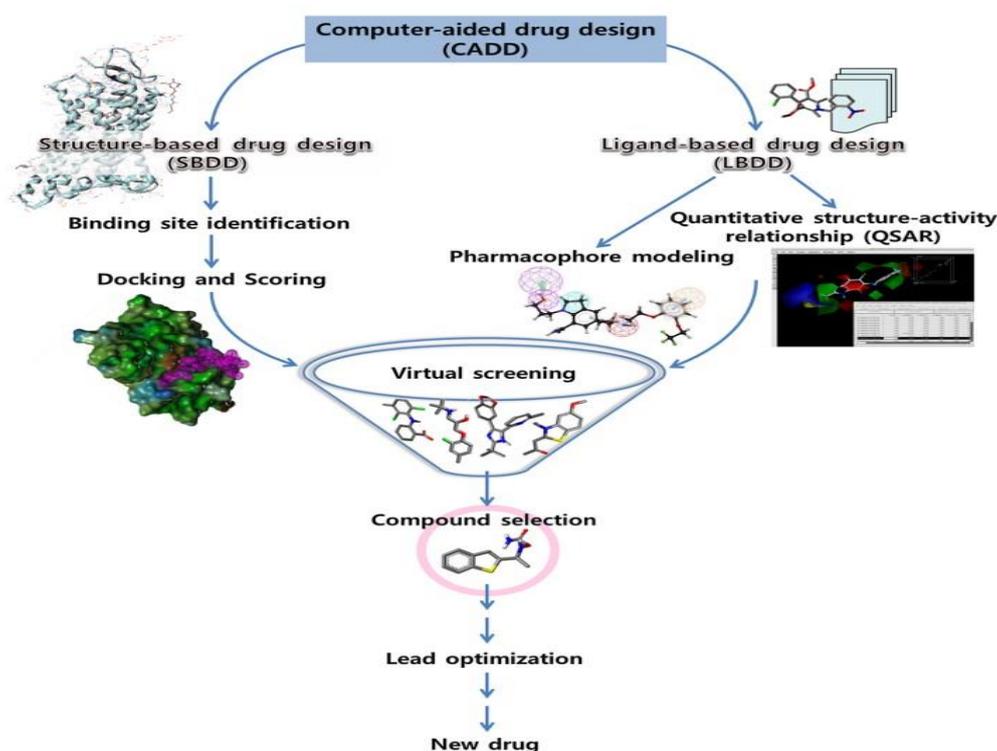


Figure 16: une représentation du workflow de CADD(209)

1. Conception de médicaments structurée (SBDD)

Pour concevoir un médicament afin de traiter une maladie ou d'atténuer un symptôme, il est essentiel de bien comprendre la voie de la maladie, et les processus pertinents, pour choisir une cible thérapeutique (6).

L'approche nommée 'Structure Based Drug Design' ou SBDD, est une approche relativement simple, basée sur la connaissance et l'analyse appropriée des données structurales tridimensionnelles de la cible macromoléculaire avec laquelle les petits ligands chimiques

moléculaires interagissent, afin de déterminer les principaux sites et interactions qui sont importants pour leurs fonctions biologiques (210). Ces structures 3D sont obtenues à l'aide de: la cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie cryoélectronique (EM), la modélisation d'homologie et ainsi les simulations de dynamique moléculaire (MD) (211).

a. Détermination de la structure protéique

Pour déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine, plusieurs méthodes sont utilisées, la plus courante est la cristallographie aux rayons X, et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (212).

b. Modélisation par homologie

C'est une technique clé dans la modélisation moléculaire. Elle consiste à prédire la structure 3D inconnue de la protéine cible, en utilisant comme modèle une structure 3D connue d'une autre protéine homologue. L'idée derrière cette technique, est du fait que les protéines évolutives partagent souvent des structures similaires. Par ailleurs, le fait de connaître les structures qui ont des séquences d'acides aminés similaires à la séquence d'intérêt cible peut aider à prédire la structure cible, sa fonction, et même les sites de liaison possibles de la structure (213,214).

c. Reconnaissance des plis (filetage)

La reconnaissance des plis est basée sur le fait que, lors de l'évolution des protéines, une divergence de séquence considérable a été observée, mais aux plis, seuls de légers changements sont observés (215). Les protéines ne peuvent pas avoir des séquences similaires, mais elles peuvent avoir des plis similaires. La séquence d'une structure protéique connue est remplacée par la séquence de la cible d'intérêt dont la structure n'est pas connue. La nouvelle structure "filtrée" est ensuite évaluée à l'aide de différentes méthodes de notation. Ce processus est répété pour toutes les structures 3D, expérimentalement déterminées dans une base de données jusqu'à ce que la structure qui convient le mieux à la séquence souhaitée soit obtenue (216).

d. Modélisation *ab initio* (de novo)

La modélisation *ab initio* ou de *novo* est utilisée lorsqu'il n'y a pas de structure suffisamment homologue pour la modélisation comparative. Ainsi, la modélisation de novo n'est pas basée sur une structure de modèle; or elle modélise la structure de la cible par fonction de séquence

seulement. La modélisation ab initio mise en œuvre dans Rosetta, comme étant une technique qui utilise une "fonction de notation basée sur la connaissance", pour guider une recherche Monte Carlo basée sur fragment dans l'espace conformationnel. Cette méthode génère une structure de type protéine avec des atomes centroïdes pour représenter les chaînes latérales. Afin d'affiner cette structure centroïde, une fonction de "raffinement tout-atome" est utilisée pour détendre la structure (217).

e. Identification du site de liaison

Le site de liaison est une petite région, une poche de bosses, où les molécules de ligand peuvent mieux s'adapter ou se lier pour activer le récepteur ou la cible et produire l'effet désiré. Ainsi, la reconnaissance du site de liaison ou des résidus du site actif dans la structure cible est d'une grande importance dans les SBDD. Étant donné que les protéines sont capables de subir des changements conformationnels, il est difficile de reconnaître avec précision les résidus de site de liaison (218). Les cibles et leur site de liaison ayant été définis, la prochaine étape cruciale de la SMDD est la découverte de la cible, ce qui aboutit probablement à une bibliothèque de composés qui peuvent interagir avec la cible (219).

f. Fonction d'amarrage

L'amarrage, un processus de prédiction de la conformation du ligand et de son orientation à l'intérieur de la structure cible, joue un rôle vital dans le SBDD. L'interaction ou l'ajustement entre le ligand et la structure protéique est mieux représenté comme le modèle « main et gant » (220). L'amarrage est souvent effectué en deux parties. La première comprend la recherche efficace de l'espace conformationnel par un mécanisme de « pose », où le ligand est placé à l'intérieur du récepteur dans différentes orientations, afin de faciliter l'identification du mode de liaison réel des molécules de ligand. Un score basé sur l'énergie est fourni pour chaque pose en termes d'interactions avec le récepteur. Les fonctions de notation sont des caractéristiques qui aident à étudier les interactions entre la petite molécule et la cible biologique, fournissant ainsi le contexte de l'activité biologique. La deuxième partie du processus d'amarrage est le classement des poses en fonction de leurs scores calculés (221).

2. Conception des médicaments à ligand (LBDD)

C'est une approche plutôt indirecte, où l'analyse dépend entièrement de l'information sur d'autres molécules, qui se lient au composé d'intérêt cible. Ces autres molécules peuvent être utilisées pour élaborer un modèle de pharmacophore qui définit les caractéristiques structurelles minimales qu'une molécule doit posséder pour réussir à se lier à la cible (222).

L'ensemble de composés devrait englober un large éventail de concentrations (au moins 4 ordres de grandeur) afin de générer un modèle de dépistage fiable fondé sur les ligands. Les techniques de conception basées sur les ligands sont les relations quantitatives structure-activité (RQSA) et les méthodes basées sur la pharmacophore (222).

a. Recherche de similarité

Cette approche est basée sur la sélection de nouveaux composants, qui ont une similarité chimique et physique avec les médicaments connus. Le principe est simple et efficace, basé sur le fait que des molécules structurellement similaires ont tendance à avoir des propriétés de liaison similaires. Cependant, ces similitudes ne donnent pas d'informations sur l'activité connue des ligands d'une cible (208).

b. Relations quantitatives structure-activité (QSAR)

Ses études reposent sur l'hypothèse, selon laquelle les changements de bioactivité sont associés à des variations structurelles et moléculaires dans un ensemble de composés (222,223). Un modèle statistique est généré à partir de cette corrélation pour développer et prédire mathématiquement la propriété biologique de nouveaux composés (222).

c. Modélisation pharmacophorique

Il vise à identifier les composés contenant différents échafaudages, mais avec une disposition 3D similaire des principaux groupes fonctionnels en interaction(224) L'information sur le site de liaison peut être intégrée au modèle de pharmacophore en exploitant la conformation bioactive des composés candidats. La modélisation pharmacophorique est souvent effectuée au niveau de l'alignement moléculaire des études de modélisation QSAR (222).

d. Evaluation de l'ADME et de la toxicité

Les composés de plomb, dans la découverte de médicaments, doivent être optimisés pour leur efficacité et leur innocuité. Son optimisation consiste à obtenir les profils pharmacologiques souhaités pour atteindre l'affinité requise, les propriétés pharmacocinétiques, l'innocuité des médicaments et les propriétés ADME. L'énergie de liaison libre reflète la puissance du médicament par rapport à la cible d'intérêt, et son calcul est effectué par des simulations moléculaires dynamiques. Ce processus se fait progressivement en convertissant un atome du ligand en un autre et en mesurant l'affinité (225).

PARTIE PRATIQUE

I. Matériel et méthodes

A. Matériel

Ce projet a été réalisé pour comprendre comment les mutations peuvent avoir un impact sur la flexibilité, la stabilité et la fonction de la protéine BRAF, tout ceci en utilisant des logiciels de prédiction des effets mutationnels. Ainsi, des études *in silico* et des criblages virtuels basés sur les ligands et sur la structure ont été réalisés afin de proposer des inhibiteurs potentiels de BRAF.

1. Bases de données

a. The Cancer Genome Atlas

Le Cancer Genome Atlas (TCGA) (1), est un programme historique de génomique du cancer. Cette base de données a caractérisé moléculairement plus de 20 000 cancers primitifs, et a comparé des échantillons normaux couvrant 33 types de cancer. Cet effort conjoint entre le NCI et l'Institut national de recherche sur le génome humain a débuté en 2006, réunissant des chercheurs de diverses disciplines et de plusieurs institutions.

Au cours des douze années suivantes, TCGA a généré plus de 2,5 pétaoctets de données génomiques, épigénomiques, transcriptomiques et protéomiques. Les données, qui ont déjà permis d'améliorer notre capacité à diagnostiquer, traiter et prévenir le cancer, resteront accessibles au public et pourront être utilisées par tous les membres de la communauté de la recherche (2).

b. Uniprot

Universal Protein Resource (UniProt) (3), est une ressource complète pour les séquences de protéines et les données d'annotation. Les bases de données UniProt sont la base de connaissances UniProt (UniProtKB), les clusters de référence UniProt (UniRef) et l'archive UniProt (UniParc).

UniProt est une collaboration entre l'Institut Européen de Bio-informatique (EMBL-EBI), le SIB Institut Suisse de Bio-informatique et le Protein Information Resource (PIR). Dans les trois instituts, plus de 100 personnes sont impliquées dans différentes tâches telles que la conservation de bases de données, le développement de logiciels et le support (4).

c. ClinVar

ClinVar (5) est une archive publique librement accessible aux rapports sur les relations entre les variations humaines et les phénotypes, avec des preuves à l'appui. Cette base de données

facilite ainsi l'accès et la communication sur les relations affirmées entre la variation humaine et l'état de santé observé, et l'historique de cette interprétation. De plus, celle-ci traite les soumissions signalant les variantes trouvées dans les échantillons de patients, les affirmations concernant leur signification clinique, les informations sur le demandeur et d'autres données à l'appui. Les allèles décrits dans les soumissions sont mappés sur des séquences de référence et rapportés conformément à la norme HGVS. Du même, elle présente ensuite les données pour les utilisateurs interactifs ainsi que ceux qui souhaitent utiliser ClinVar dans les flux de travail quotidiens et d'autres applications locales (6).

d. PDB

RCSB PDB (7) est le centre de données américain, pour l'archive mondiale de la banque de données sur les protéines (PDB) des données de structure 3D pour les grandes molécules biologiques (protéines, ADN et ARN), étant essentielles pour la recherche et l'éducation en biologie fondamentale, santé, énergie, et la biotechnologie. Ainsi, les données sont obtenues par la cristallographie en X-ray, la spectroscopie NMR, ou, la microscopie Cryo électron ; en étant déposés par des biologistes et biochimistes autour du globe. Cette base de données est ouverte pour tout le public (8).

e. BDB

Binding DB est une base de données, publique accessible sur le Web, des affinités de liaison mesurées, se concentrant principalement sur les interactions des protéines considérées comme des cibles médicamenteuses avec de petites molécules de type médicament (9).

f. Pubchem

PubChem (10) est la plus grande collection au monde d'informations chimiques librement accessibles, dont le but est de rechercher des produits chimiques par nom, formule moléculaire, structure et autres identifiants ; ainsi de trouver des propriétés chimiques et physiques, des activités biologiques, des informations sur la sécurité et la toxicité, des brevets, des citations de littérature et plus encore (11).

g. DrugBank Online

DrugBank Online (226) est une base de données en ligne complète et gratuite, contenant des informations sur les médicaments et les cibles médicamenteuses. En tant que ressource bio-informatique et chimio informatique, cette base présente des données détaillées sur les

médicaments avec des informations complètes sur les cibles médicamenteuses. Celle-ci est une ressource avec accès libre (227).

2. Serveurs de web

a. Provean

Provean (Protein Variation Effect Analyzer) (12), est un outil logiciel qui prédit si une substitution d'acide aminé ou un indel (insertion et délétion) a un impact sur la fonction biologique d'une protéine. Provean est utile pour filtrer les variants de séquence afin d'identifier les variants non synonymes ou indel dont on prédit qu'ils sont importants sur le plan fonctionnel (13).

b. Dynamut

DynaMut (14), un serveur Web mettant en œuvre deux approches en mode normal distinctes et bien établies, qui peuvent être utilisées pour analyser et visualiser la dynamique des protéines en échantillonnant les conformations et évaluer l'impact des mutations sur la dynamique et la stabilité des protéines résultant des changements d'entropie vibrationnelle. DynaMut intègre des signatures basées sur des graphes ainsi que la dynamique des modes normaux pour générer une prédiction consensuelle de l'impact d'une mutation sur la stabilité des protéines (15).

3. Logiciel

a. AutoDock Tools

AutoDock (16) est une suite d'outils d'amarrage automatisés. Il est conçu pour prédire comment de petites molécules, telles que des substrats ou des candidats-médicaments, se lient à un récepteur de structure 3D connue. Au fil des ans, il a été modifié et amélioré pour ajouter de nouvelles fonctionnalités, et plusieurs moteurs ont été développés.

Les distributions actuelles d'AutoDock consistent en deux générations de logiciels : AutoDock 4 et AutoDock vina. Plus récemment, AutoDock-GPU a été développé, qui est une version accélérée d'AutoDock4 qui est des centaines de fois plus rapide que le code d'accueil original à processeur unique (17).

b. AutoDock vina

AutoDock Vina est un programme open-source pour faire de l'amarrage moléculaire. Il a été conçu et mis en œuvre à l'origine par le Dr Oleg Trott du Molecular Graphics Lab du Scripps Research Institute. De plus, AutoDock Vina est l'un des moteurs d'amarrage d'AutoDock Tools. Ce logiciel présente plusieurs avantages, on cite parmi eux : la précision, la facilité d'utilisation, la qualité de la mise en œuvre, la rapidité et le fait qu'il un accès libre pour tout le monde (18).

c. Pymol

Pymol (19), est un système de visualisation moléculaire utilisé par plusieurs utilisateurs, donc c'est une base à source ouvert, maintenu et distribué par Schrödinger (20).

d. Open Babel

Open Babel (21) est une boîte à outils chimique conçue pour parler les nombreux langages des données chimiques. Il s'agit d'un projet collaboratif ouvert permettant à quiconque de rechercher, convertir, analyser ou stocker des données issues de la modélisation moléculaire, de la chimie, des matériaux à l'état solide, de la biochimie ou de domaines connexes (22).

e. Mcule

Mcule (23) est une plateforme de découverte de médicaments en ligne. Il offre une solution unique aux entreprises pharmaceutiques et biotechnologiques en fournissant une base de données de composés acheteables et des outils de modélisation moléculaire de la plus haute qualité (24).

B. Méthodes

1. Construction de la base des données

On a construit une base de données basées contenant le cristal utilisé, comme : le type sauvage, les mutants de notre travail, les inhibiteurs de référence, ainsi les inhibiteurs potentiels

a. Séquence des acides aminés de BRAF

La base de données TCGA ‘the cancer genome atlas’ est utilisée afin de mieux comprendre les altérations oncogéniques de notre protéine BRAF, ainsi d’identifier toutes les maladies causées par BRAF et leurs localisations en corps humain.

En effet, on a utilisé Uniprot afin de fournir les informations nécessaires sur la séquence en acides aminés de BRAF. Dans notre cas, la protéine BRAF contient 766 acides aminés au total. Nous avons téléchargé le total de cette séquence sous la forme de fichier FASTA (figure17).

```
>sp|P15056|BRAH_HUMAN Serine/threonine-protein kinase B-raf OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BRAF PE=1 SV=4
MAALSGGGGGGAEPGQALFNGDMEPEAGAGAGAAAASSAADPAIPEEVWNIKQMIKLTQEHI
IEALLDKFGGGEHNPPSIYLEAYEYTSKLDALQQREQQLLES LGNGTDFSVSSASMDTV
TSSSSSSLSVLPSSLSVFNPTDVARSNPKSPQKPIVRVFLPNKQRTVVPARCGVTVRDS
LKKALMMRGLIPECCAVYRIQDGEKKPIGWDTDISWLTGEE LHVEVLENVPLTTHNFVRK
TFFTLAFCDFCRKL LFQGFRCQTCGYKFHQRCEVPLMCMVNDQLDLLFVSKFFEHHPI
PQEEASLAETALTSGSSPSAPASDSIGPQILTSPSPSKSIPQPFRPADEDHRNQFGQR
DRSSAPNVHINTIEPVNIDDLIRDQGFGRDGGSTTGLSATPPASLPGSLTNVKALQKSP
GPQREKSSSSSEDRNRMKTLGRRDSSDDWEIPDGQITVGGQRIGSGSFGTVYKGWKMGDV
AVKMLNVTAPTQQQLQAFKNEGVLRKTRHVNILLFMGYSTKPLAIVTQWCEGSSLYHH
LHIIETKFEMIKLIDIRQT AQGMDYLHAKSIIHRDLKSNNIFLHEDLTVKIGDFGLATV
KSRWSGSHQFEQLSGSILWMAPEVIRMQDKNPYSFQSDVYAFGIVLYELMTGQLPYSNIN
NRDQIIFMVGGRGYLSPDLSKVRSNCPKAMKRLMAECLKKRDERPLFPQILASIELLARS
LPKIHRSAEPSLNRAGFQTEDFSLYACASPKTPIQAGGYGAFPVH
```

Figure 17: la séquence en acides aminés de BRAF (228)

b. Mutations de BRAF

Dans cette étape, et comme étant une base de données qui fournit les variations alléliques et phénotypes, on a utilisé ClinVar, dans l’intention d’obtenir toutes les mutations de BRAF, sans oublier les maladies causées par ces mutations. Dans notre cas, on a trouvé 491 mutations de BRAF, dont chacune est responsable d’une maladie ou plusieurs maladies à la fois.

En passant à l'étape suivante, on a filtré ce tableau et on a juste laissé les mutations de substitutions, dont le nombre est 322 mutations. Ensuite, on a donné le nom à trois lettres de chaque acide aminé et l'autre avec lequel il va subir une substitution et le numéro de position dans la séquence. Après, on a converti le code de 3 lettres en celui d'une seule lettre, dont chacune correspond à son propre acide aminé, tout ceci en y conservant la position de substitution bien sûr. Ainsi, on les a triés par ordre alphabétique (TableauVII).

N.B : on a fait cette étape à toutes les 322 mutations.

TableauVII: un exemple des différents acides aminés (en code de 1 lettres) et la position de leurs substitutions ainsi l'acide aminé avec lequel est remplacé.

A712V	D594N	F109I	G28C	G534R	I554M	K601I	L541F	N378S	P731S	R252Q	S133L	T241M	V600A
A91G	D594V	F138S	G28S	G596C	I554T	K601N	L567V	N580D	Q16H	R260H	S147G	T241P	V600D
A91S	D638E	F247L	G30D	G596D	I556T	K601N	L584F	N581D	Q257K	R271H	S215F	T241R	V600E
A91V	D677N	F247L	G390S	G596R	I592M	K601Q	L597P	N581H	Q257R	R347P	S319F	T244P	V600E
C173R	D742N	F247S	G393R	G596S	I592T	K601R	L597Q	N581K	Q262K	R354Q	S323L	T310I	V600G
C532Y	E13D	F247V	G397C	G596V	I592V	K601T	L597R	N581S	Q262P	R360Q	S323P	T332I	V600K
D22N	E13K	F357S	G397D	G672V	I659T	K630R	L597S	N581T	Q262R	R384G	S325C	T470P	V600L
D22V	E204D	F468C	G464A	G69A	I665M	L18V	L597V	N660S	Q344L	R389C	S337L	T589P	V600L
D352E	E24D	F468L	G464E	G759E	I714V	L245F	L721V	P14L	Q356E	R389H	S36F	T599I	V600M
D352G	E24K	F498Y	G464R	G9A	I755M	L245F	M186I	P14R	Q386R	R426T	S394P	T599R	V600R
D381N	E26D	F548L	G464R	H223Y	I755S	L331P	M23I	P25S	Q461R	R437Q	S399F	V111F	V624I
D565E	E26K	F548S	G464V	H353R	I77V	L382F	M23K	P25T	Q496H	R444Q	S419F	V120I	V765L
D576Y	E275D	F595L	G466A	H539N	K483E	L382M	M23V	P301S	Q653H	R444W	S428L	V157I	W531C
D587A	E275K	F595L	G466E	H574Q	K483I	L406F	M484I	P334L	Q664E	R462I	S467A	V175F	W531C
D587E	E303Q	F595L	G466R	H574Q	K483N	L416S	M53I	P341L	Q709E	R558Q	S605F	V238I	W531L
D587E	E351Q	F595S	G466V	H574Y	K483Q	L485F	M564V	P341Q	Q709K	R682Q	S605N	V276L	W531S
D587N	E501A	G106A	G469A	I208V	K483R	L485F	M650I	P343S	Q94K	R701G	S607F	V413M	Y472C
D594A	E501G	G106E	G469E	I326T	K483T	L485S	M693T	P402H	Q94R	R719H	S87G	V471F	Y633C
D594E	E501K	G106R	G469L	I326V	K499E	L485W	N20D	P402L	R146Q	R735W	S87N	V471I	Y633H
D594E	E501Q	G10S	G469R	I342V	K499N	L505F	N236K	P402R	R166K	S122F	T107P	V482L	Y647C
D594G	E501V	G21R	G469R	I457F	K499N	L525P	N236K	P403A	R178Q	S122Y	T176I	V487E	Y647H
D594H	E586K	G21R	G469S	I463S	K499Q	L525Q	N236T	P44L	R188T	S125F	T218S	V487G	Y760C
D594N	E648G	G265R	G469V	I463V	K601E	L525R	N368S	P676S	R252P	S127G	T241K	V528L	Y85C

c. Structure 3D

En effet, pour avoir le cristal de notre protéine BRAF, on va sur Uniprot pour analyser les différents cristaux. Puis, on fait une première filtration sur la méthode utilisée, en laissant seulement les cristaux formés par X-ray. Ensuite, on fait une deuxième filtration selon la résolution. En ce qui concerne la résolution, on choisit seulement celle qui a la résolution la plus petite. Donc, le seul cristal qui correspond à ces conditions est un cristal nommé 4XV9

(figure18). Ce cristal se compose de 442-705 acides aminés. Cependant, ce cristal, en se situant au niveau de la région conservée 3 (CR3), ce qui fait, il contient les domaines suivants : kinase catalytique, liaison à ATP, et boucle d'activation (tableauVIII) (24).

TableauVIII: l'identifiant de cristal choisi et ses informations

ID de cristal	Méthode	Résolution	Chaîne	Position	Domaine
4XV9	X-ray	2.00 Å	A	442-705	Kinase catalytique (572-584aa) Liaison à ATP 'ATP binding' (463-483aa) Boucle d'activation (596-600aa)

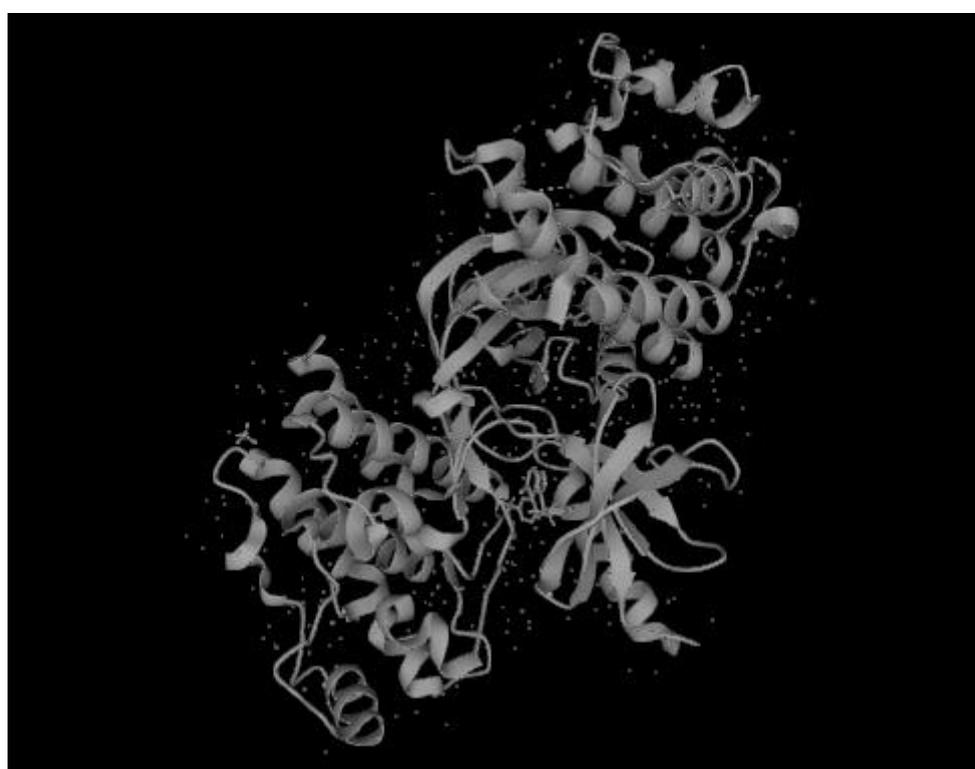


Figure 18 : le cristal 4XV9 (25)

d. Inhibiteurs potentiels

Dans cette étape, on va sur la base de données Binding dB, où on peut trouver les différents inhibiteurs potentiels à inhiber notre protéine BRAF. En outre, dans notre cas, on a trouvé 101 inhibiteurs à étudier (tableauIX)

TableauIX: les différents inhibiteurs à étudier et leurs caractéristiques

PubChem CID	IC50 (nM)	b_1rotN	Poids	a_acc	a_don	TPSA	logP(o/w)
117876697	1	6	632.97699	6	1	106.26	4.7902899

117892661	1.5	7	587.05499	6	1	106.26	4.7105298
117892665	1.7	6	563.992	5	1	93.370003	5.8405299
117876838	2	7	576.02802	6	2	113.6	4.72153
117889832	2.4000001	5	546.00598	5	1	112.05	4.5425301
117876565	2.5999999	6	544.56201	6	1	106.26	3.6005299
117892680	2.5999999	7	595.00598	7	2	126.49	3.3335299
117892681	2.7	5	549.96899	5	1	112.05	4.0025301
117889814	2.7	6	541.58698	6	1	121.28	3.9065299
117876805	3	5	546.00598	5	1	112.05	4.4675298
117890259	3	5	560.008	6	0	92.75	4.8885298
117876640	3.5999999	5	561.01697	4	1	106.58	4.5205302
117890386	3.7	6	561.01697	6	1	106.26	4.35953
117876846	3.7	6	541.56201	7	0	101.98	3.99353
117876780	3.8	5	561.01697	4	1	106.58	4.59553
117889796	4.3000002	6	561.01697	6	1	106.26	4.4345298
117890474	4.3000002	5	529.55096	5	1	112.05	4.0285301
117876236	4.5	4	562.005	5	1	118.94	3.2415299
117876207	4.5999999	6	527.56	6	1	121.28	3.6475301
117889915	4.6999998	6	579.00696	6	1	106.26	4.1535301
90647159	5	6	564.97998	6	1	106.26	3.8945301
117876861	5.3000002	5	531.979	5	1	112.05	4.2835302
117876252	5.6999998	7	560.56097	7	1	115.49	3.2585299
117892668	6.1999998	6	596.99701	6	1	106.26	4.3035302
117892668	6.1999998	6	596.99701	6	1	106.26	4.3035302
117876853	7	6	590.05499	5	1	100.79	4.8745298
117876620	7.0999999	6	546.98999	6	1	106.26	4.1005301
117876823	7.3000002	6	579.00696	6	1	106.26	4.3565302
117876803	8.5	6	576.02802	5	1	100.79	4.4125299
117892682	8.5	7	595.99396	7	1	128.38	3.16153
117876240	9	7	579.00696	6	0	95.260002	4.5065298
117890298	9.1999998	5	529.55096	5	1	112.05	4.1035299
117890054	10	5	562.005	5	1	118.94	4.5005298
117876806	10	7	591.04297	6	1	115.49	4.83253
117892658	10	6	564.97998	6	1	106.26	4.6585302
117876740	11	6	566.97101	5	0	86.029999	4.7035298

117876865	11	6	591.01801	6	0	95.260002	4.7175298
117892679	11	5	545.98102	6	0	92.75	4.62953
117892659	11	6	579.00696	6	1	106.26	4.5095301
117876808	11	5	531.979	5	1	112.05	4.2085299
117892667	12	5	585.03497	6	0	103.1	3.9725299
117876558	13	5	515.52399	5	1	112.05	3.8445301
117890064	13	7	542.61499	7	1	98.419998	4.3515301
117892654	15	6	593.08301	6	0	103.1	4.8315301
117890467	16	6	547.034	6	1	89.190002	4.9875302
117876228	18	8	645.04297	9	3	149.63	3.58953
117876577	18	5	567.02802	7	0	116.54	4.8635302
117876642	19	6	575.04401	6	1	106.26	4.8215299
117876643	19	6	575.04401	6	1	106.26	4.8215299
122238741	19	5	560.008	6	0	92.75	4.8885298
117889891	21	7	556.59796	7	1	115.49	3.7985301
117876241	22	5	527.99097	6	0	92.75	4.8355298
117892676	22	7	576.03198	7	2	132.28	3.1775301
117876710	25	5	548.98096	5	0	86.029999	4.71453
117890104	26	6	547.034	6	1	89.190002	4.9125299
117889659	28	6	575.04401	6	1	106.26	4.8965302
117876336	28	6	546.98999	6	1	106.26	4.17553
117889803	32	5	581.07196	6	0	103.1	4.43753
117876863	32	6	548.52496	6	1	106.26	3.4555299
117876334	39	6	544.56201	6	1	106.26	3.9205301
117876814	40	7	579.00696	6	1	106.26	3.9825301
117876733	40	6	548.98096	5	0	86.029999	4.9095302
117892657	40	5	525.58801	5	1	112.05	4.1735301
117876255	40	5	567.04498	6	0	103.1	4.1785302
117876847	45	6	577.01599	6	1	113.15	4.39253
117876735	47	6	544.56201	6	1	106.26	3.9955299
117892677	47	4	538.00299	6	0	99.860001	4.6305299
117876237	53	7	575.04401	6	0	95.260002	4.97153
117876730	59	6	547.034	6	1	89.190002	5.11553
117876269	59	6	577.01599	6	1	113.15	4.4675298
117876866	60	6	563.008	5	0	86.029999	5.3715301

117876832	62	6	561.01697	6	1	106.26	4.56253
117876726	73	6	561.01697	6	1	106.26	4.6375299
117876248	80	6	540.599	6	1	106.26	4.0655298
117876637	85	7	561.01697	6	0	95.260002	4.7125301
117876830	88	6	561.01697	6	1	106.26	4.56253
117876332	93	6	533.00696	6	1	89.190002	4.7285299
117892649	103	6	595.099	6	0	103.1	5.3255301
117876813	104	6	533.00696	6	1	89.190002	4.6535301
117876809	113	5	558.01697	6	0	99.639999	5.1275301
117892675	138	6	564.97998	6	1	106.26	3.8945301
117889964	157	7	570.625	7	1	115.49	4.26053
117889770	179	6	526.57196	6	1	106.26	3.7325301
117876630	186	6	560.03296	6	1	112.05	4.1375299
117876718	191	6	614.00299	5	1	98.059998	5.3272901
122238742	211	6	541.56201	7	0	101.98	3.99353
117876848	212	5	530.99097	5	0	86.029999	4.9205298
117876253	213	6	596.08698	6	0	106.34	3.7265301
117876571	232	7	607.01697	6	0	112.33	4.48353
117876807	280	4	507.92798	5	0	74.949997	5.1825299
117892651	309	6	573.07196	6	0	78.190002	5.5995302
117890479	322	8	577.06	7	2	109.42	4.2465301
117876589	333	7	528.58801	7	1	98.419998	4.0925298
117876593	455	6	546.00598	6	1	112.05	3.87853
117876839	468	6	547.034	6	1	89.190002	5.11553
117876328	515	6	546.00598	6	1	112.05	4.1185298
117876866	547	6	563.008	5	0	86.029999	5.3715301
117890186	655	6	559.04498	6	0	78.190002	5.2005301
117876568	726	7	547.034	6	0	78.190002	5.2655301
117876855	1346	8	591.04297	7	2	126.49	3.3515301
117876725	2350	6	560.03296	5	0	89.269997	4.7615299

2. Prédiction des effets mutationnels

a. Les effets des mutations sur la fonction des protéines

Le serveur web « PROVEAN » accepte la séquence de la protéine et les variations des acides aminés comme un input, ainsi il analyse l'effet de ces variations sur la fonction de la protéine. En se basant sur le score calculé par PROVEAN, la mutation est dite neutre, si le score calculé est supérieur à (-2.5), ou elle est dite délétère quand ce score est inférieur à (-4.1).

b. Les effets des mutations sur la stabilité et la flexibilité des protéines

Le serveur web DynaMut va effectuer des prédictions des changements potentiels sur la stabilité (DDG) et la flexibilité de la protéine (DDS). Cet outil nécessite la structure 3D de la protéine, la liste des variations des acides aminés, sans oublier la chaîne. Ainsi, les mutations sont regroupées avec la structure 3D correspondante à leurs positions.

3. Criblage moléculaire

a. Filtration des mutations

Tout d'abord, on sélectionne toutes les mutations qui sont incluses dans l'intervalle des acides aminés de notre cristal, c'est-à-dire on élimine toutes les mutations qui ne se situent pas entre 442 et 705 acides aminés, ce qui nous donne les résultats suivantes de 129 mutations (tableauX).

TableauX: les différentes mutations incluses dans l'intervalle des acides aminés du cristal 4XV9

A481E	E501Q	G469L	I592T	L567V	Q653H	Y633H
A481K	E501V	G469R	I592V	L584F	Q664E	Y647C
A497T	E586K	G469S	I659T	L597P	R462I	Y647H
A621S	E648G	G469V	I665M	L597Q	R558Q	
C532Y	F468C	G534R	K483E	L597R	R682Q	
D565E	F468L	G596C	K483I	L597S	R701G	
D576Y	F498Y	G596D	K483N	L597V	S467A	
D587A	F548L	G596R	K483Q	M484I	T470P	
D587E	F548S	G596S	K483R	M564V	T589P	
D587N	F595L	G596V	K483T	M650I	V471F	
D594A	F595S	G672V	K499E	M693T	V471I	
D594E	G464A	H539N	K499N	N580D	V482L	
D594G	G464E	H574Q	K499Q	N581D	V487E	
D594H	G464R	H574Y	L485F	N581H	V487G	
D594N	G464V	I457F	L485S	N581K	V528L	

D594V	G466A	I463S	L485W	N581S	V624I
D638E	G466E	I463V	L505F	N581T	W531C
D677N	G466R	I554M	L525P	N660S	W531L
E501A	G466V	I554T	L525Q	P676S	W531S
E501G	G469A	I556T	L525R	Q461R	Y472C
E501K	G469E	I592M	L541F	Q496H	Y633C

b. Filtration des ligands

En effet, la filtration des ligands se fait selon deux critères : les lois de Lipinski et de Veber, et la toxicité.

Tout d'abord, la règle de Lipinski consiste qu'un médicament, actif par voie orale, ne doit pas violer plus d'une des critères suivants :

- Pas plus de 5 liaisons hydrogène donneurs,
- Pas plus de 10 accepteurs de liaisons hydrogène,
- Une masse moléculaire <500 daltons,
- un coefficient de partage octanol-eau (logP) ne dépasse pas 5 (229).

En outre, les règles de Veber limite le seuil de poids en 500Da. Cependant, il faut que les composés aient une grande biodisponibilité orale, et en même temps répondent à ces deux conditions :

- 10 liaisons rotatives ou moins,
- Et une surface polaire <140 Å (230).

La vérification de toxicité est indispensable, afin d'éliminer tous les composés toxiques. Pour cela on a utilisé Mcule toxicity checker.

Ces deux étapes ont été appliqué sur 101 composés.

c. Inhibiteurs de référence

Par l'utilisation de la base de données DrugBank Online et en se servant de la littérature, on a pu prendre 4 inhibiteurs de référence contre BRAF, ceux-ci sont : Sorafénib, Encorafénib, Vémurafénib, et Dabrafénib.

Sorafénib ou BAY 43-9006 est un anticancéreux, inhibant la tyrosine kinase BRAF, en se liant au domaine kinase catalytique, ce qui stabilise la conformation inactive et empêche l'apparition du cancer. Celui-ci est un inhibiteur qui a une bonne efficacité sur les mélanomes, en ciblant spécifiquement les mutations V600 (231).

Encorafénib ou LGX818 est un inhibiteur de BRAF de 2ème génération, qui est en cours d'évaluation dans les essais cliniques. Celui-ci inhibe sélectivement les effets prolifératives de des mutants BRAF (232).

Dabrafénib ou GSK2128436 est un inhibiteur ATP-compétitif de la protéine BRAF. Cet inhibiteur a montré ses effets sur les mélanomes (233).

Vémurafénib ou PLX4720 est un inhibiteur de la sérine/thréonine kinase de BRAF, ciblant le domaine ATP-binding. Cet inhibiteur a montré sa haute performance en empêchant l'apparition des mélanomes(234).

En utilisant la base des données DrugBank Online, on a pu regrouper toutes les données sur ces inhibiteurs, cela va être un point de plus dans notre analyse (tableauXI).

TableauXI: les caractéristiques des 4 inhibiteurs de référence (235–238).

Nom	Poids (Da)	Acc d'H	Don d'H	LogP	Liaison rotative	Surface polaire	Solubilité dans l'eau	Règle de 5	Veber	Toxicité
Sorafénib	464.825	3	3	4,12	6	92.35 Å ²	Insoluble	Oui	Non	Non
Encorafénib	540,01	7	3	4,16	9	140,13Å ²	Pas disponible	Non	Non	Oui
Vémurafénib	489.922	4	2	4,95	6	91,92Å ²	<1mg/ml	Oui	Non	Non
Dabrafénib	519,562	6	2	5,44	5	110,68Å ²	<1mg/ml	Non	Non	Non

4. Préparation des structures

Avant d'initier le Docking, il faut préparer nos ligands et nos récepteurs.

a. Préparation des cibles

Tout d'abord, on utilise la base de données PDB pour télécharger notre cristal sous forme de pdb. Ce qui fait, on a téléchargé notre pdb de cristal 4XV9 (figure19), mais ce cristal était déjà lié avec deux ligands ; pour résoudre ce problème, on a supprimé ces ligands, en laissant seulement notre cristal.

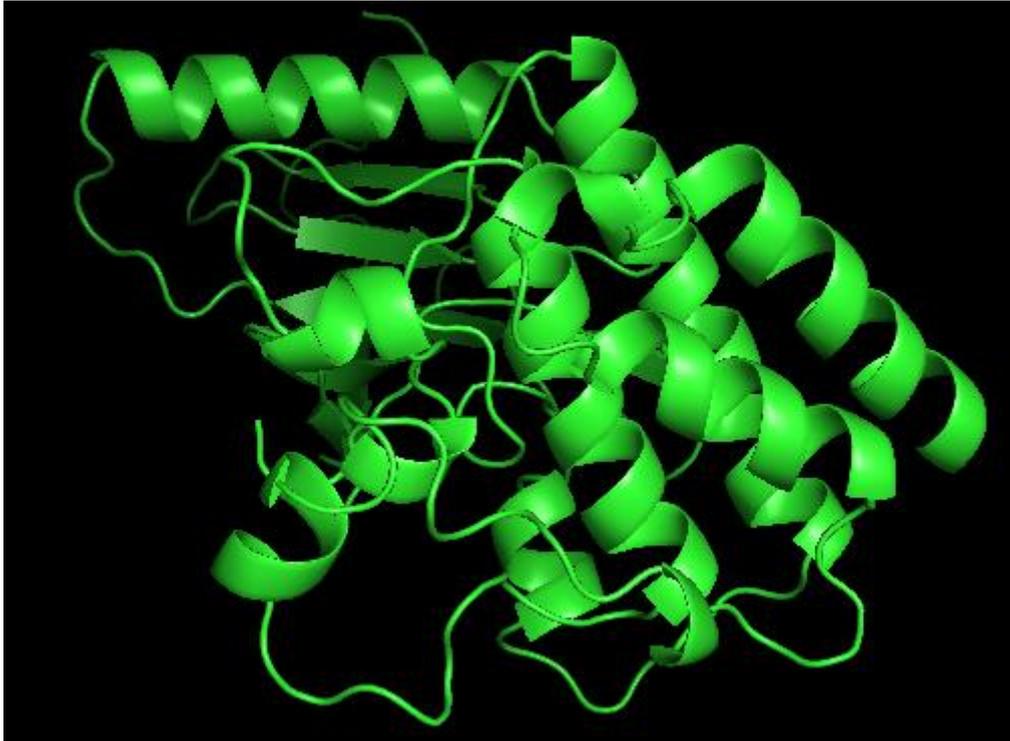


Figure 19: le cristal 4XV9 en forme pdb

Pour les mutations, on les a créés par Pymol. On ouvre Pymol, puis on télécharge notre fichier sauvage sous forme pdb, pour notre cas c'est le cristal 4XV9. Ensuite, on va sur l'option « wizard », et on sélectionne mutagenèses, puis on sélectionne l'option protéine. Après, un petit message va apparaître « Pick a residue », pour cela on va aller sur l'option « display » et sélectionner « sequence » pour afficher les séquences des acides aminés du cristal. Ainsi, on cherche notre résidu puis, à droite dans la barre « no mutation », on clique sur le résidu par lequel on va faire la conversion. Une fois réalisé, on clique sur « apply » et on enregistre notre fichier. De cette manière les trois mutations sont préparées (voir la partie 'résultats' pour plus d'informations).

Pour le processus de Docking, il faut que tous nos fichiers soient en format pdbqt. Pour cela, on utilise le logiciel AutoDock tools pour les préparer

Tout d'abord, on ouvre AutoDock tools, on clique sur file, puis « read molecule » et on sélectionne notre molécule WT4XV9.pdb, par ceci notre molécule apparaît dans l'écran. A la suite, on élimine les molécules d'eau et on ajoute les hydrogènes. Après, on enregistre notre molécule sous format pdbqt (WT4XV9.pdbqt).

N.B : on répète ces étapes pour les mutations aussi.

b. Préparation des ligands

Après l'évaluation selon les règles de Lipinski et Veber, et selon la toxicité, on a pu avoir 78 composés, sans oublier les 4 inhibiteurs de référence.

On copie la formule chimique de molécule, et on la cherche sur PubChem. Puis, on télécharge notre fichier en structure 3D et sous format sdf. Comme il nous faut le fichier sous format pdb, on utilise Open Babel pour la conversion de fichier sdf en pdb.

Par la suite, on prépare le premier ligand par AutoDock Tools. On va sur ligand, puis on sélectionne input, et on télécharge notre fichier 1.pdb (on a juste renommé le fichier pour faciliter le travail mais on a gardé dans un fichier les noms des composés par ordre). Puis, on a une barre de dialogue qui s'affiche et on clique sur Ok. Après cela, on clique sur ligand, et on choisit torsion tree, puis on sélectionne torsion tree. A la fin, on reclique sur ligand, on clique sur output et on enregistre notre ligand sous format pdbqt « 1.pdbqt ». On répète ce processus pour tous les composés, y compris les inhibiteurs de référence.

c. Définition d'espace de recherche

Tout d'abord, on clique sur « Grid > macromolecule > choose ». On choisit WT4XV9, et on appuie sur select « molecule ». Après un dialogue de « Warning » s'affichera et on clique sur OK.

En littérature, on a trouvé que les résidus de site actif de la protéine BRAF sont : Ile463, Val471, Ala481, Ile527, Lys483, Leu514, Thr529, Trp531, Cys532, Phe583, Gln530 et Glu534 (239).

Ce grid Box contourne le domaine kinase et le domaine de liaison à ATP, contenant respectivement les mutations I584F et G469E (voir résultat pour plus d'informations).

Après coup, on fait une double-clique sur la macromolécule, puis la chaîne, une liste des résidus s'affiche. On sélectionne les résidus de site actif, ceux-ci vont être marqués en jaune.

Postérieurement, on clique sur « Grid>Grid Box ». Ainsi, le widget de Grid s'ouvre. Maintenant, il faut régler les paramètres. On commence par ajuster le « spacing » (en angström) en 1.000.

Puis, on ajuste le nombre des points en 20, 20, 20. On ajuste par la suite les dimensions de Grid Box, jusqu'au point où on peut plus voir les résidus en jaune. Dès fait, on va sur les options de Grid, on clique sur « file> output and dimensions file », et on enregistre un fichier

grid.txt dans le dossier Docking ; puis, on clique sur « close saving current » (figure 20). Ceci est valable pour les 2 mutations au niveau du domaine kinase et ATP-binding, ayant les mêmes résidus de site actif.

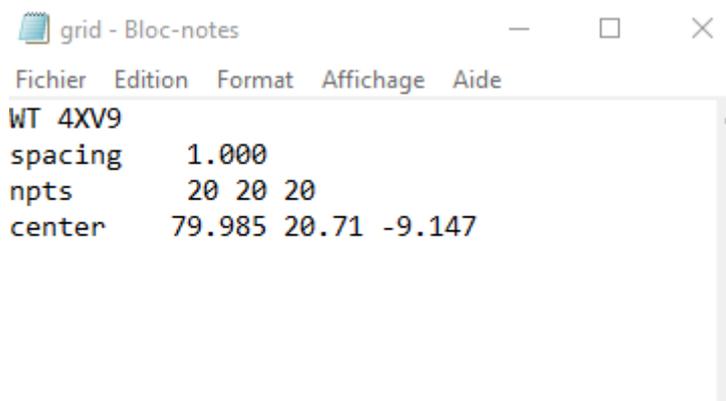
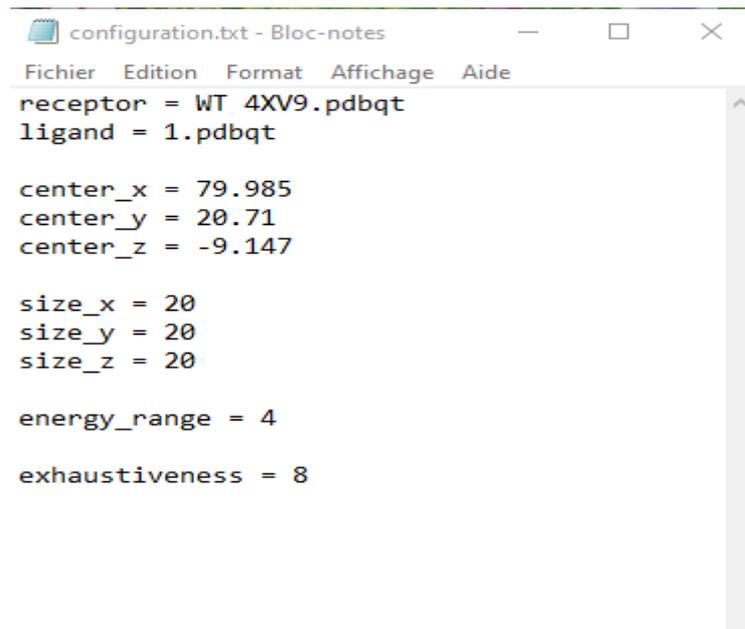


Figure 20: le fichier grid de la protéine

d. Préparation de fichier de configuration

En ayant les protéines et les ligands préparés, on va commencer le Docking moléculaire. Pourtant, il faut préparer un fichier de configuration. Pour ceci, on va utiliser AutoDock vina. Ce dernier nécessite un fichier d'entrée, contenant toutes les données des paramètres qui vont être utilisées pour le Docking moléculaire. Par ailleurs, vina a un paramètre appelé « exhaustiveness » qui est défini par 4. Par la suite, on doit ajouter un autre paramètre, est celui de nombre de poses générés lors du Docking. A l'aide, de fichier grid.txt, on va ajouter le nom de récepteur (WT 4XV9.pdbqt) et le ligand (1.pdbqt), puis les coordonnées center_x,y,z ; sans oublier les sizes_x,y,z du grid box. Enfin, on enregistre le fichier sous le nom de « configuration.txt » (figure 21).

N.B : le nom du récepteur et du ligand vont être modifiés à chaque fois, tout en gardant les coordonnées intactes.



```
configuration.txt - Bloc-notes
Fichier Edition Format Affichage Aide
receptor = WT 4XV9.pdbqt
ligand = 1.pdbqt

center_x = 79.985
center_y = 20.71
center_z = -9.147

size_x = 20
size_y = 20
size_z = 20

energy_range = 4

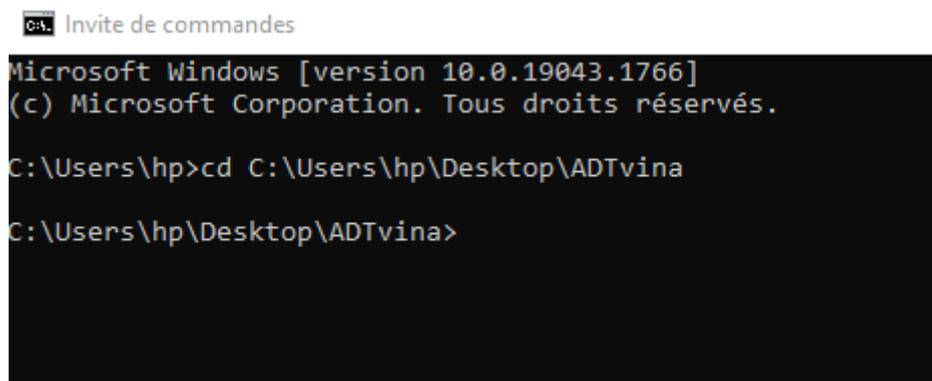
exhaustiveness = 8
```

Figure 21: le fichier de configuration

e. Docking moléculaire

Pour cette étape, tous nos fichiers doivent exister dans un dossier, que l'on a nommé ADTvina.

Puis, on va copier le chemin de ce dossier. On ouvre le terminal, en saisissant 'cmd.exe', par la suite, on saisit cd 'nom de notre chemin'(figure22).



```
Invite de commandes
Microsoft Windows [version 10.0.19043.1766]
(c) Microsoft Corporation. Tous droits réservés.

C:\Users\hp>cd C:\Users\hp\Desktop\ADTvina

C:\Users\hp\Desktop\ADTvina>
```

Figure 22: la commande de chemin du dossier

Si cela est affiché, ça veut dire que nous sommes dans notre dossier. Ce qu'il faut faire, c'est exécuter la commande suivante (figure23).

```
Invite de commandes
Microsoft Windows [version 10.0.19043.1766]
(c) Microsoft Corporation. Tous droits réservés.

C:\Users\hp>cd C:\Users\hp\Desktop\ADTvina

C:\Users\hp\Desktop\ADTvina>"C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe" --confi
g configuration.txt --log log.txt
```

Figure 23: la commande d'exécution de vina

A la suite, on clique sur entrer, puis le processus de Docking va débuter (figure24).

```
C:\Users\hp\Desktop\ADTvina>"C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe" --confi
g configuration.txt --log log.txt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:      #
#                                                           #
# O. Trott, A. J. Olson,                                    #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and   #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461                                                    #
#                                                           #
# DOI 10.1002/jcc.21334                                     #
#                                                           #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.  #
#####

Output will be 1_out.pdbqt
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1949219860
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
```

Figure 24: le processus du Docking moléculaire

Si cette page s'affiche, cela veut dire que le Docking est lancé. Pour notre cas, on a lancé le Docking 328 fois, du fait qu'on a 4 protéines et 82 ligands.

f. Visualisation des interactions

La visualisation 3D des résultats d'amarrage est réalisé par le logiciel PyMol.

En bref, voici une figure (figure25) résumant tout le processus pour identifier des nouveaux inhibiteurs ciblant 4XV9 et les mutations.

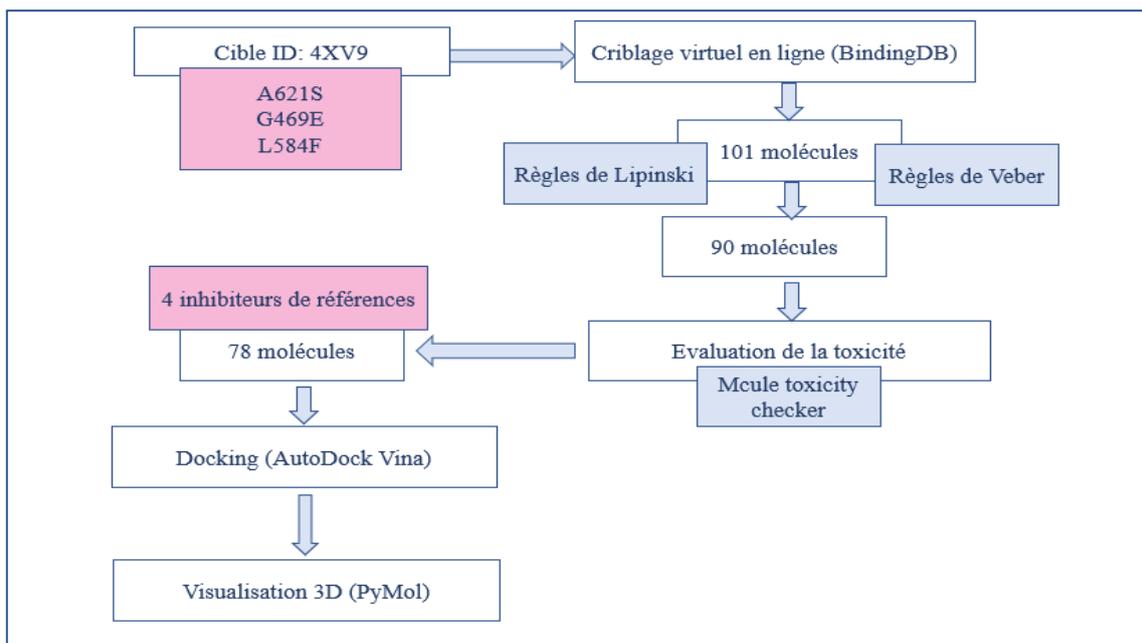


Figure 25: le processus d'identification, *in silico*, des inhibiteurs ciblant 4XV9 et les mutations A621S, G469E, et L584F.

II. Résultats et discussions

A. Résultats

1. Prédiction des effets des mutations

Tout d'abord, les 491 mutations ont été identifiées en ClinVar. Cependant, pour les mutations incluses dans notre cristal 4XV9, seulement 129 mutations, étant dans la région entre 442-705 qui sont utilisées.

Toutefois, les résultats obtenus, d'après la prédiction des effets des mutations de BRAF sur la stabilité, la flexibilité et la fonction de la protéine, sont regroupées en domaines. Ceci est afin de spécifier comment chaque mutation a un effet spécifique sur chaque domaine.

En effet, les valeurs DDG, qui sont mesurées (en kcal/mol), indiquant si les mutations ont un effet stabilisant ($DDG > 0$) ou déstabilisant ($DDG < 0$). Par contre, les effets des mutations sur la flexibilité, d'après DynaMut, est associée à DDS, étant mesurée (en kcal/mol. K), où les valeurs positives indiquent une augmentation de flexibilité, pendant que celles négatives indiquent une diminution de stabilité. Par ailleurs, les mutations sont divisées en deux catégories distinctes :

- Les mutations neutres,
- Les mutations délétères.

Dans notre cas, notre étude a été consacrée sur 3 domaines : le domaine kinase, le domaine de liaison à l'ATP, et le domaine de boucle d'activation. Par la suite, chacune des mutations, intégrées dans domaines, impactent différemment la stabilité, la flexibilité et la fonction (tableauXII).

TableauXII: les statistiques de l'impact des différentes mutations, au niveau des trois domaines, sur la fonction, la flexibilité et la stabilité

Domaine	Nombre des mutations	mutations délétères	mutations neutres	stabilité augmentée	stabilité diminuée	flexibilité augmentée	flexibilité diminuée
ATP binding	32	30	2	19	13	20	12
kinase	10	10	0	4	6	6	4
boucle d'activation	87	78	9	36	51	53	34
somme	129	118	11	59	70	79	50

Cette analyse globale des mutations, affectant les différents domaines, a montré la présence de 118 mutations délétères (91.47%) et 11 mutations neutres (8.52%) (figure 26)

la distribution globale des mutations

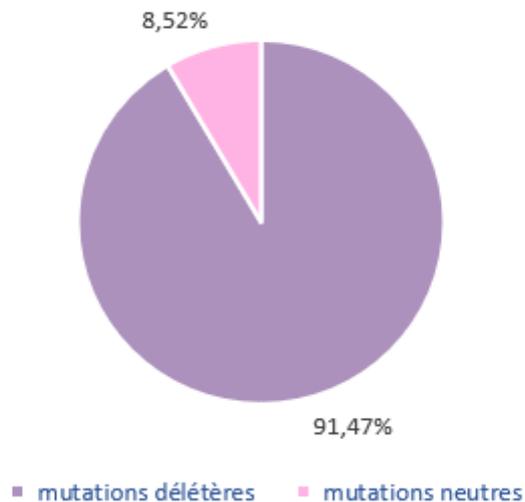


Figure 26: la distribution globale des mutations délétères et des mutations neutres en 4XV9

➤ Domaine de liaison à l'ATP

En premier lieu, au niveau domaine de liaison d'ATP ayant 32 mutations au total (tableau VIII), en utilisant DynaMut, ces 32 mutations possèdent un intervalle de stabilité de (-.1658 et 1.365), où 19 mutations (59.37%) sont responsables de l'augmentation de la stabilité, or 13 de celles-ci (40.62%) sont la cause de d'une diminution de stabilité. En ce qui concerne la flexibilité, les résultats montrent 20 mutations (62.5%) qui augmentent la flexibilité, tandis que 12 de ces mutations (37.5%).

Par ailleurs, Provean montre 30 mutations (93.75%) sont délétères, or 2 de ces mutations (6.25%) restent neutres (figure 27).

Tableau XII: les effets des différentes mutations de BRAF au niveau du domaine de liaison à l'ATP 'ATP binding' sur : la fonction de la protéine (délétère ou neutre), la stabilité (stabilisante $DDG > 0$ ou déstabilisante $DDG < 0$), la flexibilité (augmentée $DDS > 0$ ou réduite < 0)

Mutation	Prédiction des effets sur la fonction	Prédiction de stabilité $\Delta\Delta G$	Prédiction de flexibilité $\Delta\Delta S$
A481E	Délétère	0.761	-0.634
A481K	Délétère	0.688	-0.968
F468C	Délétère	-0.091	0.053
F468L	Délétère	-0.219	0.005
G464A	Délétère	0.013	-0.34
G464E	Délétère	0.142	-0.548
G464R	Délétère	0.731	-0.919
G464V	Délétère	1.204	-0.566
G466A	Délétère	0.49	-0.092
G466E	Délétère	0.313	-1.193
G466R	Délétère	0.91	-1.725
G466V	Délétère	1.365	-0.71
G469A	Délétère	-0.28	-0.518
G469E	Délétère	-0.508	-0.55
G469L	Délétère	0.37	-1.558
G469R	Délétère	-0.248	-0.751
G469S	Délétère	0.006	-0.62
G469V	Délétère	0.37	-0.763
I463S	Délétère	-1.658	0.327
I463V	Neutre	-0.096	0.06
K483E	Délétère	-0.641	0.433
K483I	Délétère	0.663	0.238
K483N	Délétère	-1.043	0.68
K483Q	Délétère	-1.211	0.353
K483R	Délétère	0.011	-0.108
K483T	Délétère	-0.956	0.731
S467A	Délétère	-0.472	0.71
T470P	Délétère	0.079	0.413
V471F	Délétère	0.487	-1.028
V471I	Neutre	1.172	-0.373
V482L	Délétère	0.671	-0.353
Y472C	Délétère	-0.339	0.583

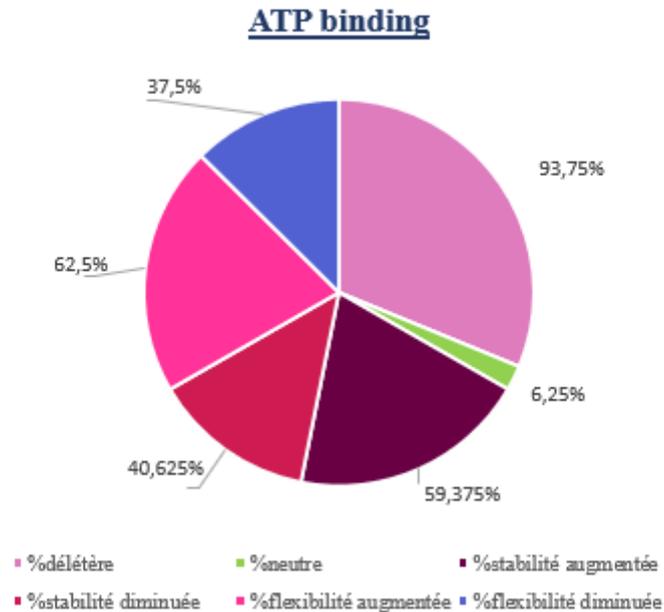


Figure 27: le pourcentage des différents effets des mutations en domaine ATP binding

➤ **Domaine kinase**

En domaine kinase catalytique, il existe 10 mutations au total (tableauXIV).

D'ailleurs, par DynaMut, il existe 4 mutations, avec un intervalle de stabilité de (-0.951 et -0.87), dont 4 mutations (40%) sont responsables de l'augmentation de la stabilité, pendant que 6 mutations (60%) sont la cause d'une diminution de stabilité. En outre, pour la flexibilité, les résultats montrent 6 mutations (60%) qui augmentent la flexibilité, or les autres 4 (40%) diminuent la flexibilité. Autrement, Provean montre que les 10 mutations sont délétères (100%) (figure28).

TableauXIV: les effets des différentes mutations de BRAF au niveau du domaine kinase sur :
la fonction de la protéine (délétère ou neutre), la stabilité (stabilisante $DDG > 0$ ou
déstabilisante $DDG < 0$), la flexibilité (augmentée $DDS > 0$ ou réduite < 0)

Mutation	Prédiction de l'effet sur la fonction	Prédiction de Stabilité $\Delta\Delta G$	Prédiction de Flexibilité $\Delta\Delta S$
D576Y	Délétère	0.717	-0.311
H574Q	Délétère	-0.12	0.256
H574Y	Délétère	0.87	-0.31
L584F	Délétère	-0.914	-0.636
N580D	Délétère	-0.951	0.401
N581D	Délétère	-0.577	0.223
N581H	Délétère	-0.436	-0.458
N581K	Délétère	0.023	0.212
N581S	Délétère	-0.332	0.462
N581T	Délétère	0.362	0.297

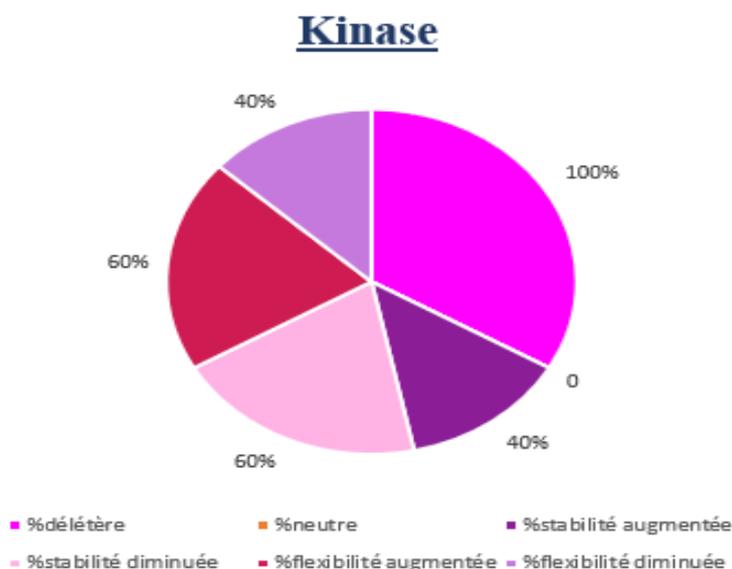


Figure 28: le pourcentage des différents effets des mutations en domaine kinase

➤ **Domaine de boucle d'activation**

Pour le domaine de boucle d'activation, il existe 87 mutations au total (tableau XV).

D'après DynaMut, les résultats montrent ces 87 mutations avec un intervalle de stabilité entre (-3.798 et 1.5), dont 36 mutations (41.37%) sont capables d'augmenter la stabilité, tandis que

les 51 autres (58.62%) sont la cause d'une diminution de stabilité. Autrement, les résultats montrent 53 mutations (60.91%) peuvent augmenter la flexibilité, or les autres 34 (39.08%) diminuent la flexibilité.

Cependant, Provean montre 78 des mutations (89.65%) sont délétères, mais les 9 mutations (10.34) restantes demeurent neutres (figure29).

TableauXV: les effets des différentes mutations de BRAF au niveau du domaine de boucle d'activation sur : la fonction de la protéine (délétère ou neutre), la stabilité (stabilisante $DDG > 0$ ou déstabilisante $DDG < 0$), la flexibilité (augmentée $DDS > 0$ ou réduite < 0)

Mutation	Prédiction des effets sur la fonction	Prédiction de stabilité $\Delta\Delta G$	Prédiction de flexibilité $\Delta\Delta S$
A497T	Délétère	-0.658	-0.087
A621S	Délétère	-0.991	-0.206
C532Y	Délétère	1.405	-1.141
D565E	Délétère	1.379	-0.335
D587A	Délétère	-0.192	0.344
D587E	Délétère	-0.07	0.102
D587N	Délétère	0.361	-0.077
D594A	Délétère	-0.337	0.802
D594E	Délétère	-0.123	0.096
D594G	Délétère	-0.272	0.902
D594H	Délétère	0.682	-0.141
D594N	Délétère	-0.184	0.302
D594V	Délétère	-0.162	0.483
D638E	Délétère	0.176	-0.253
D677N	Délétère	0.827	-0.095
E501A	Délétère	0.074	0.133
E501G	Délétère	-0.71	0.213
E501K	Délétère	1.508	-0.762
E501Q	Délétère	-0.078	0.091
E501V	Délétère	0.176	-0.065
E586K	Délétère	0.88	-0.335
E648G	Délétère	-2.316	0.877
F498Y	Délétère	0.212	-0.005
F548L	Délétère	-1.087	0.357

F548S	Délétère	-3.17	1.036
F595L	Délétère	-0.388	0.159
F595S	Délétère	-0.701	0.599
G534R	Délétère	0.045	-0.492
G596C	Délétère	-0.664	-0.075
G596D	Délétère	0.345	-0.261
G596R	Délétère	0.674	-0.53
G596S	Délétère	0.295	-0.403
G596V	Délétère	-0.148	0.06
G672V	Délétère	-0.278	-0.498
H539N	Neutre	0.094	0.043
I457F	Délétère	0.684	-0.405
I554M	Délétère	-0.617	0.03
I554T	Délétère	-3.798	0.784
I556T	Délétère	-3.567	0.31
I592M	Délétère	0.837	-0.248
I592T	Délétère	-3.382	0.4
I592V	Neutre	-1.066	0.467
I659T	Délétère	-0.108	0.296
I665M	Délétère	-0.31	0.007
K499E	Délétère	-0.515	0.467
K499N	Délétère	-1.105	0.316
K499Q	Délétère	-0.738	0.47
L485F	Délétère	0.728	-0.503
L485S	Délétère	-2.25	0.482
L485W	Délétère	0.965	-0.631
L505F	Délétère	0.643	-0.743
L525P	Délétère	-0.652	0.85
L525Q	Délétère	-1.158	0.577
L525R	Délétère	0.365	0.018
L541F	Délétère	1.301	-0.69
L567V	Délétère	-2.117	0.402
L597P	Délétère	-0.145	1.336
L597Q	Délétère	-0.125	0.467
L597R	Délétère	0.56	-0.226

L597S	Délétère	0.22	1.103
L597V	Délétère	-0.287	0.767
M484I	Neutre	0.203	0.089
M564V	Délétère	-0.722	0.246
M650I	Neutre	-0.769	-0.144
M693T	Neutre	-1.835	0.398
N660S	Délétère	0.216	-0.036
P676S	Délétère	-1.726	0.217
Q461R	Neutre	0.102	-0.042
Q496H	Délétère	0.512	-0.249
Q653H	Délétère	0.508	0.112
Q664E	Délétère	0.693	-0.199
R462I	Délétère	-0.126	0.004
R558Q	Délétère	-0.396	0.152
R682Q	Neutre	-0.662	0.366
R701G	Délétère	-1.232	0.736
T589P	Délétère	0.101	-0.183
V487E	Délétère	0.103	-0.061
V487G	Délétère	-0.544	0.216
V528L	Neutre	0.633	-0.298
V624I	Neutre	0.663	-0.336
W531C	Délétère	0.031	1.023
W531L	Délétère	-1.557	0.541
W531S	Délétère	-1.055	1.172
Y633C	Délétère	-0.15	0.573
Y633H	Délétère	-0.037	0.082
Y647C	Délétère	-1.621	0.993
Y647H	Délétère	-1.351	0.419

Boucle d'activation

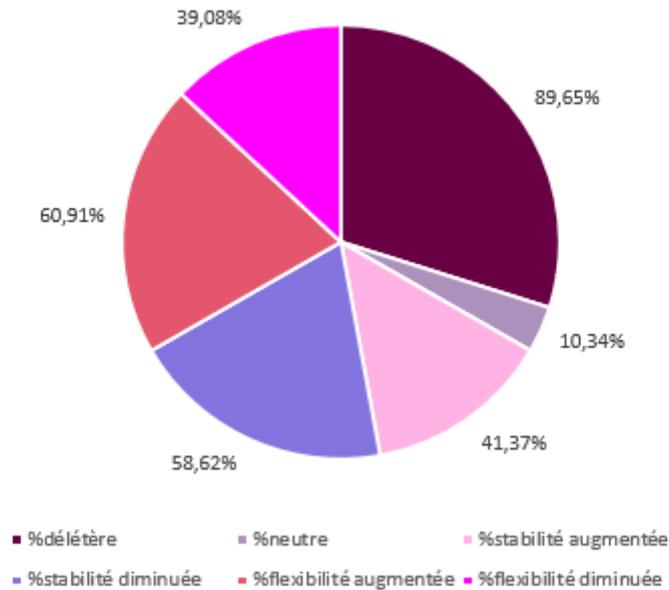


Figure 29: le pourcentage des différents effets des mutations en domaine de boucle d'activation

2. Filtrage des mutations

Pour le processus de Docking moléculaire, on a sélectionné une seule mutation de chaque domaine, correspondante à ces trois critères à la fois :

- Une mutation délétère,
- Une mutation très déstabilisante ($DDG < 0$),
- Une mutation diminuant la flexibilité ($DDS < 0$).

Après la filtration, et après la validation de ces critères, on a sélectionné :

- La mutation G469E pour le domaine 'ATP-binding',
- La mutation L584F pour le domaine kinase,
- La mutation A621S pour le domaine de boucle d'activation (tableauXVI).

TableauXVI: les mutations choisies pour le processus de Docking

Mutation	Domaine	Prédiction des effets sur la fonction	Prédiction de stabilité $\Delta\Delta G$	Prédiction de flexibilité $\Delta\Delta S$
G469E	ATP binding	Délétère	-0.508	-0.55
L584F	Kinase	Délétère	-0.914	-0.636
A621S	Boucle d'activation	Délétère	-0.991	-0.206

3. Docking moléculaire

Ces études consistent de faire une combinaison entre le criblage virtuel et les approches moléculaires pour identifier des inhibiteurs potentiels contre BRAF. Pour cela, 4 inhibiteurs de référence, déjà testés sur notre protéine, sont utilisés pour faire une comparaison de leurs affinités aux protéines avec ceux qui sont potentiels. Ainsi, le processus de Docking a été réalisé sur 4 protéines : une sauvage 4XV9, et ses 3 mutations : A621S, G469E, et L584F.

Pour cela, les 4 inhibiteurs approuvés et qui sont utilisés comme référence sont : Sorafénib, Vémurafénib, Dabrafénib, et Encorafénib. Par ailleurs, 78 inhibiteurs potentiels ont été étudié afin de sélectionner le meilleur parmi eux.

Toutefois, le Dépistage virtuel basé sur la structure « structure-based virtual screening » est une approche qui est utilisée, dans le but d'identifier des petites molécules ayant une grande affinité pour la protéine de type sauvage ainsi que les 3 autres mutations. Ce qui fait, d'après la base de données ClinVar, on a pris 101 composés. Ensuite, on les a filtrés selon les règles de Lipinski et Veber, puis selon l'évaluation de la toxicité. Par ailleurs, après la filtration des ligands potentiels selon les règles de Lipinski et de Veber, seulement 90 composés ont respecté ces règles. Ensuite, on a effectué une évaluation de toxicité, tout en utilisant le serveur Mcule toxicity checker, et on a eu finalement 78 composés, n'étant pas toxiques (tableauXVII).

TableauXVII: les différents composés finaux utilisés pour notre étude

PubChem CID	b_1rotN	Weight	a_acc	a_don	TPSA	logP(o/w)
90647159	6	564.97998	6	1	106.26	3.8945301
117876207	6	527.56	6	1	121.28	3.6475301
117876236	4	562.005	5	1	118.94	3.2415299
117876237	7	575.04401	6	0	95.260002	4.97153
117876240	7	579.00696	6	0	95.260002	4.5065298

117876248	6	540.599	6	1	106.26	4.0655298
117876252	7	560.56097	7	1	115.49	3.2585299
117876253	6	596.08698	6	0	106.34	3.7265301
117876255	5	567.04498	6	0	103.1	4.1785302
117876269	6	577.01599	6	1	113.15	4.4675298
117876328	6	546.00598	6	1	112.05	4.1185298
117876332	6	533.00696	6	1	89.190002	4.7285299
117876334	6	544.56201	6	1	106.26	3.9205301
117876336	6	546.98999	6	1	106.26	4.17553
117876558	5	515.52399	5	1	112.05	3.8445301
117876565	6	544.56201	6	1	106.26	3.6005299
117876589	7	528.58801	7	1	98.419998	4.0925298
117876593	6	546.00598	6	1	112.05	3.87853
117876620	6	546.98999	6	1	106.26	4.1005301
117876630	6	560.03296	6	1	112.05	4.1375299
117876637	7	561.01697	6	0	95.260002	4.7125301
117876640	5	561.01697	4	1	106.58	4.5205302
117876642	6	575.04401	6	1	106.26	4.8215299
117876643	6	575.04401	6	1	106.26	4.8215299
117876697	6	632.97699	6	1	106.26	4.7902899
117876710	5	548.98096	5	0	86.029999	4.71453
117876718	6	614.00299	5	1	98.059998	5.3272901
117876725	6	560.03296	5	0	89.269997	4.7615299
117876726	6	561.01697	6	1	106.26	4.6375299
117876735	6	544.56201	6	1	106.26	3.9955299
117876780	5	561.01697	4	1	106.58	4.59553
117876803	6	576.02802	5	1	100.79	4.4125299
117876805	5	546.00598	5	1	112.05	4.4675298
117876806	7	591.04297	6	1	115.49	4.83253
117876808	5	531.979	5	1	112.05	4.2085299
117876813	6	533.00696	6	1	89.190002	4.6535301
117876814	7	579.00696	6	1	106.26	3.9825301
117876823	6	579.00696	6	1	106.26	4.3565302
117876830	6	561.01697	6	1	106.26	4.56253
117876832	6	561.01697	6	1	106.26	4.56253
117876838	7	576.02802	6	2	113.6	4.72153
117876839	6	547.034	6	1	89.190002	5.11553
117876847	6	577.01599	6	1	113.15	4.39253
117876848	5	530.99097	5	0	86.029999	4.9205298
117876853	6	590.05499	5	1	100.79	4.8745298
117876855	8	591.04297	7	2	126.49	3.3515301
117876861	5	531.979	5	1	112.05	4.2835302
117876863	6	548.52496	6	1	106.26	3.4555299

117889659	6	575.04401	6	1	106.26	4.8965302
117889770	6	526.57196	6	1	106.26	3.7325301
117889796	6	561.01697	6	1	106.26	4.4345298
117889803	5	581.07196	6	0	103.1	4.43753
117889814	6	541.58698	6	1	121.28	3.9065299
117889832	5	546.00598	5	1	112.05	4.5425301
117889891	7	556.59796	7	1	115.49	3.7985301
117889915	6	579.00696	6	1	106.26	4.1535301
117889964	7	570.625	7	1	115.49	4.26053
117890054	5	562.005	5	1	118.94	4.5005298
117890064	7	542.61499	7	1	98.419998	4.3515301
117890104	6	547.034	6	1	89.190002	4.9125299
117890298	5	529.55096	5	1	112.05	4.1035299
117890386	6	561.01697	6	1	106.26	4.35953
117890467	6	547.034	6	1	89.190002	4.9875302
117890474	5	529.55096	5	1	112.05	4.0285301
117890479	8	577.06	7	2	109.42	4.2465301
117892654	6	593.08301	6	0	103.1	4.8315301
117892657	5	525.58801	5	1	112.05	4.1735301
117892658	6	564.97998	6	1	106.26	4.6585302
117892659	6	579.00696	6	1	106.26	4.5095301
117892661	7	587.05499	6	1	106.26	4.7105298
117892667	5	585.03497	6	0	103.1	3.9725299
117892668	6	596.99701	6	1	106.26	4.3035302
117892675	6	564.97998	6	1	106.26	3.8945301
117892676	7	576.03198	7	2	132.28	3.1775301
117892677	4	538.00299	6	0	99.860001	4.6305299
117892680	7	595.00598	7	2	126.49	3.3335299
117892681	5	549.96899	5	1	112.05	4.0025301
117892682	7	595.99396	7	1	128.38	3.16153

Le tableau ci-dessus montre l’ID du composé, sa masse moléculaire, ses liaisons rotatives, le nombre d’accepteur et donneur de liaison hydrogène, sa surface polaire, et le coefficient de partage octanol-eau. Tous ces 78 composés ont fut le sujet de notre étude.

On a fait la même chose pour les inhibiteurs de référence. La Sorafénib et le Vémurafénib respectent les lois de Lipinski, mais violent les règles de Veber, mais ils ne sont pas toxiques. Cependant, l’Encorafénib et le Dabrafénib ne respectent ni les lois de Lipinski, ni les lois de Veber. La seule différence est que l’Encorafénib est toxique or l’autre n’est pas toxique. Tous respectent les règles de Lipinski et Veber. Mais, en terme de toxicité, seulement l’Encorafénib qui a présenté une substance toxique.

Ultérieurement, on a lancé le Docking moléculaire, en utilisant AutoDock vina, dans le but de confirmer et valider les résultats obtenus.

Pour les résultats de Docking protéine-ligands des inhibiteurs de référence (tableauXVIII), la Sorafénib a la meilleure affinité pour la protéine sauvage 4XV9 et pour la mutation A621S. Tandis que, la Vémurafénib présente la meilleure affinité pour les mutations G469E et L584F.

TableauXVIII: les résultats de Docking, en terme d'affinité des 4 inhibiteurs de référence

Ligands	Type sauvage	A621S	G469E	L584F
Sorafénib	-11,6	-10,9	-11,8	-10,5
Dabrafénib	-9,2	-9,3	-9,3	-9,6
Vémurafénib	-10,1	-10,4	-12,3	-12,3
Encorafénib	-7,7	-7,1	-8,5	-8,6

En se basant sur l'affinité, on a sélectionné des composés pour chaque protéine, par comparaison avec les inhibiteurs de référence :

- Pour le type sauvage 4XV9 : 11 composés (tableauXIX),
- Pour la mutation A621S : 20 composés(tableauXX),
- Pour la mutation G469E : 2 composés(tableauXXI),
- Pour la mutation L584F : 1 composé(tableauXXII).

TableauXIX: les inhibiteurs potentiels ciblant le type sauvage 4XV9 et leurs affinités

Ligands (PubChem CID)	Affinité
117876269	-8,5
117876336	-7,7
117876558	-7,9
117876735	-8,7
117876813	-7,7
117876861	-7,7
117889659	-8,4
117889770	-7,9
117889814	-8,5
117889891	-8,2
117889964	-8,2
117890064	-7,7

TableauXX: les inhibiteurs potentiels ciblant la mutation A621S et leurs affinités

Ligands (PubChem CID)	Affinité
117876207	-7,2
117876269	-8,6
117876332	-7,5
117876336	-7,6
117876558	-8,1
117876589	-7,9
117876718	-7,3
117876726	-7,9
117876735	-9,9
117876780	-7,7
117876806	-7,6
117876848	-7,2
117876861	-7,6
117889659	-7,6
117889796	-8,1
117889891	-8,3
117890064	-7,9
117890104	-8,4
117890298	-7,8
117890467	-7,2

TableauXXI: les inhibiteurs potentiels ciblant la mutation G469E et leurs affinités

Ligands (PubChem CID)	Affinité
117876269	-8,5
117876735	-10

TableauXXII: les inhibiteurs potentiels ciblant la mutation L584F et leurs affinités

Ligands (PubChem CID)	Affinité
117876735	-8,8

En analysant, l'inhibiteur potentiel Pubchem CID=117876735 (BDBM200399) est le meilleur de tous les autres, présentant les meilleures affinités dans les 4 protéines. Une affinité de -8.7

pour le type sauvage, une de -9.9 pour la mutation A621S. Pendant que, pour la mutation G469E, l'affinité est -10, et pour celle de L584F présente-8.8 (tableauXXIII).

TableauXXIII: l'inhibiteur BDBM200399 présentant les meilleures affinités au niveau des 4 protéines

Ligand	Type sauvage	A621S	G469E	L584F
117876735 (BDBM200399)	-8,7	-9,9	-10	-8,8

4. Visualisation par Pymol

Pour la visualisation des résultats, on utilise le logiciel Pymol afin de voir les interactions entre ligand-récepteur.

Pour la protéine sauvage 4XV9, ce tableau présente les résultats visualisés par Pymol, en présentant les différentes interactions ligand-récepteur (tableauXXIV)

TableauXXIV: les résultats des interactions entre les différents ligands et le récepteur 4XV9

Ligands	Molécule	Affinité (Kcal/mol)	Bondes H	Distance (Å)
1	BDBM200399	-8,8	4	Glu-533 (2,6Å) Cys-532 (2,5Å; 2,5Å) Lys-473 (2,6Å)
2	Sobrafénib	-11,6	2	Cys-532 (2,6Å) Asp-594 (2Å)
3	Vémurafénib	-10,6	2	Ser-535 (0) Cys-532 (2,3Å)
4	Dabrafénib	-7,1	4	Trp-531 (2,4Å) Lys-473 (2,4Å) Gln-461 (0,6Å) Ile-463 (2,1Å)
5	Encorafénib	-9,2	2	Ile-592 (2,5Å) Lys-483 (2,6Å)

En outre, en ce qui concerne la mutation A621S, la visualisation par Pymol montre les différences des interactions entre le récepteur et les différents ligands (tableau XXV)

Tableau XXV: les résultats des interactions entre les différents ligands et le récepteur A621S

Ligands	Molécule	Affinité (Kcal/mol)	Bondes H	Distance (Å)
1	BDBM200399	-9,9	3	Lys-473 (2,8Å) Cys-532 (2,3Å; 2,6Å)
2	Sorafénib	-10,9	1	Lys-483 (2,5Å)
3	Dabrafénib	-9,3	4	Arg-462 (2,4Å) Ile-463 (2,5Å;2,7Å) Ser-535 (2,7Å)
4	Vémurafénib	-10,4	3	Gln-530 (2,1Å) Cys-532 (2,1Å) Asp-594 (2,6Å)
5	Encorafénib	-7,1	2	Gly-534 (2,3Å) Lys-473 (2Å)

Autrement, en ce qui concerne la mutation G469E, voici les résultats qui représentent les différentes affinités et les bonds H de chaque ligand, lors de la visualisation (tableau XXVI)

Tableau XXVI: les résultats des interactions entre les différents ligands et le récepteur G469E

Ligands	Molécule	Affinité (Kcal/mol)	Bondes H	Distance (Å)
1	BDBM200399	-10	4	Asn-580 (2,4Å) Ser-536 (2,2Å) Cys-532 (2,4Å) Gln-461 (2,6Å)
2	Sorafénib	-11,8	2	Cys-532 (2,4Å) Asp-594 (1,7Å)
3	Dabrafénib	-9,3	2	Lys-483 (2,7Å) Ile-592 (2,3Å)

4	Vémurafénib	-12,3	3	Trp-531 (2,0Å) Lys-473 (2,1Å) Gln-461(2,2Å)
5	Encorafénib	-8,5	2	Gln-461(2,5Å) His-539 (2,8Å)

Pour la mutation L584F, voici les résultats qui montrent les différences des interactions pour les 5 ligands, lors de la visualisation (tableauXXVII)

TableauXXVII: les résultats des interactions entre les différents ligands et le récepteur L584F

Ligands	Molécule	Affinité (Kcal/mol)	Bondes H	Distance (Å)
1	BDBM200399	-8,8	4	Asn-580 (2,7Å) Ser-536 (2,6Å) Leu-597 (2,3Å) Ala-598(2,5Å)
2	Sorafénib	-11,8	2	Cys-532 (2,4Å) Asp-594(1,7Å)
3	Dabrafénib	-9,6	2	Gly-534 (2,4Å) Ser-535 (1,8Å)
4	Vémurafénib	-12,3	3	Gln-530 (2,1Å) Asp-594 (2,4Å) Cys-532(1,8Å)
5	Encorafénib	-8,6	2	Glu-533(2,6Å) Gly-534 (2,3Å)

Maintenant, on va présenter les figures des résultats des différents interactions de la protéine sauvage et les 3 mutations avec les 5 ligands.

➤ Le type sauvage 4XV9

En interagissant avec l'inhibiteur BDBM200399, il présente 4 bonds hydrogènes avec le récepteur : une avec Glu 533, une autre avec Lys473, et deux bonds H avec Cys 532.

Cependant, l'inhibiteur Sorafénib présente 2 bonds d'hydrogène avec Cys532 et Asp594.

Également, pour le cas de l'inhibiteur Vémurafénib, il a deux bonds hydrogènes avec le récepteur, en Ser 535 et Cys 532.

Du même, l'Encorafénib présente deux bonds hydrogènes avec Ile592 et Lys483. Pendant que, Dabrafénib présente bonds avec les résidus suivants : Trp531, Lys473, Gln461, et Ile463 (figure30).

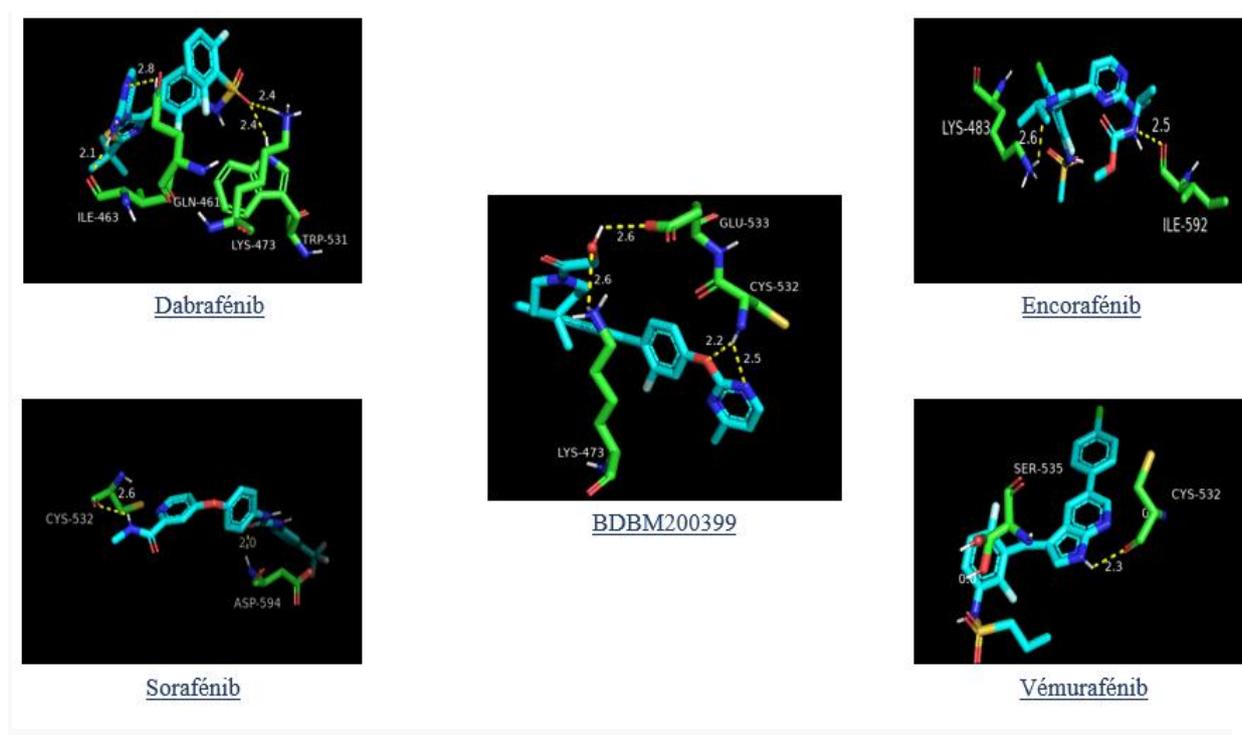


Figure 30: visualisation des résultats pour le type sauvage 4XV9

➤ La mutation G469E

L'inhibiteur BDBM200399 présente 4 bonds hydrogènes avec Asn580, Ser536, Cys532, et Gln461. Par contre, l'inhibiteur Sorafénib possède 2 bonds d'hydrogène avec Cys532 et Asp594. Aussi, pour Vémurafénib, en présentant 2 bonds avec Lys483 et Ile592. Par ailleurs, l'Encorafénib présente 3 bonds hydrogènes avec Trp531, Gln461 et Lys473. Pendant que, Dabrafénib présente 3 bonds avec les résidus suivants : Gln461, et His539 (figure32).

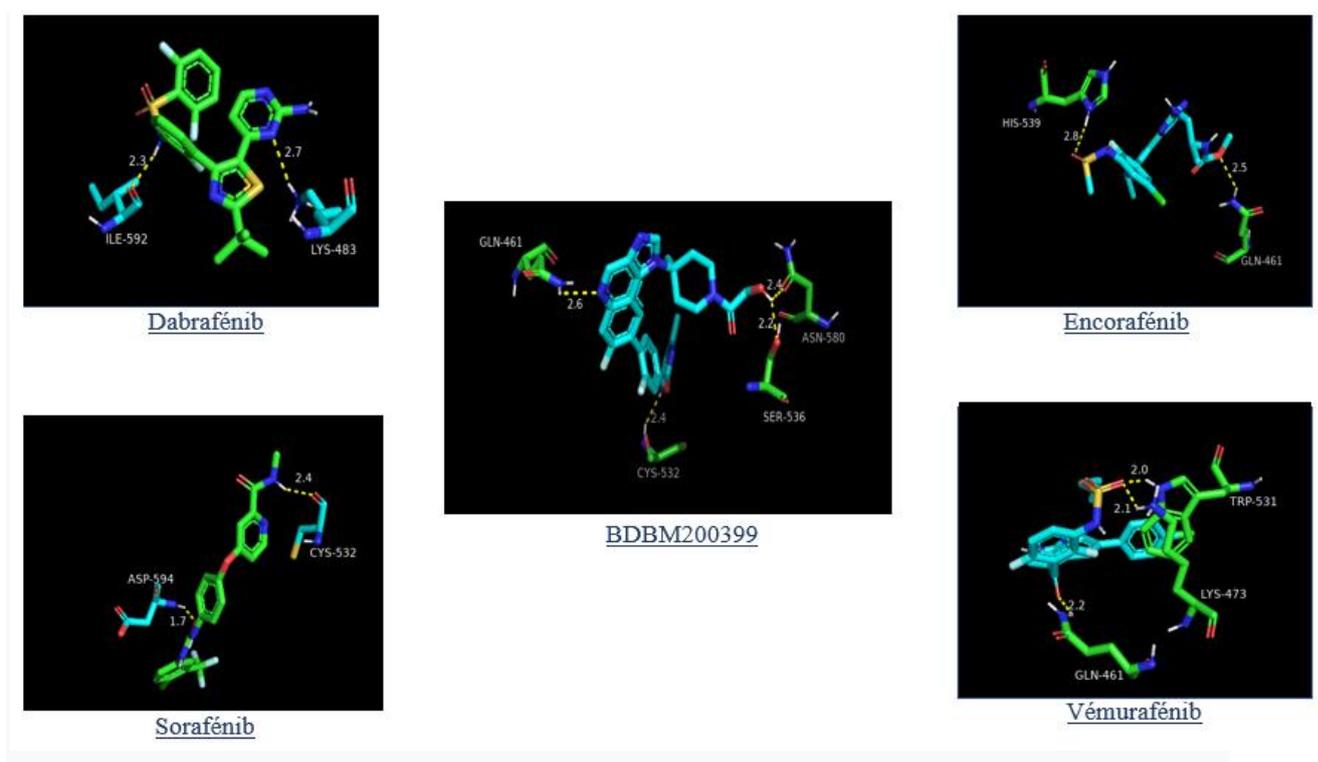
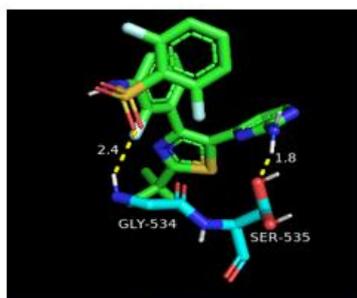


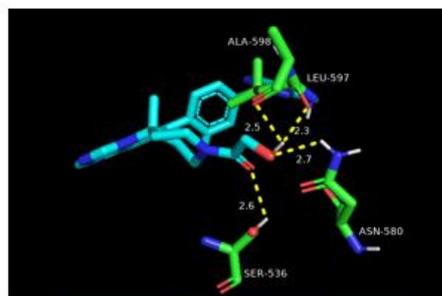
Figure 32: visualisation des résultats pour la mutation G469E

➤ La mutation L584F

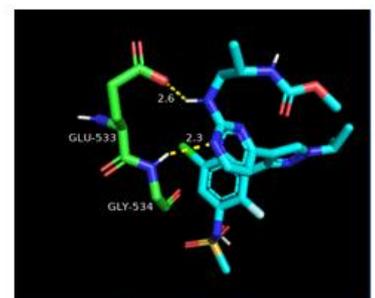
L'inhibiteur BDBM200399 présente 4 bonds hydrogènes avec Asn580, Ser536, Leu597, et Ala598. Toutefois, l'inhibiteur Sorafénib possède 2 bonds d'hydrogène avec Cys532 et Asp594. La même chose, pour Vémurafénib, en présentant 2 bonds avec Gly534 et Ser535. Par ailleurs, l'Encorafénib présente 3 bonds hydrogènes avec Glu533 et Gly534. Pendant que, Dabrafénib présente 3 bonds avec les résidus suivants : Gln530, Asp594 et Cys532 (figure33).



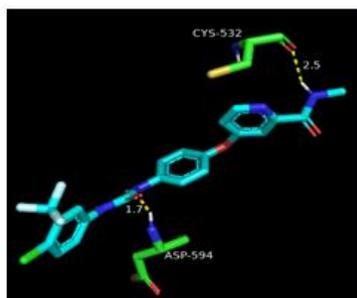
Dabrafénib



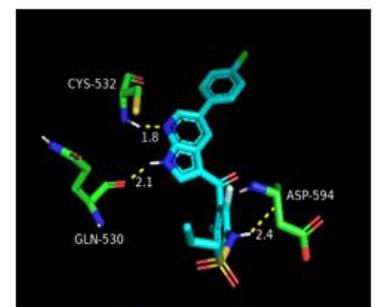
BDBM200399



Encorafénib



Sorafénib



Vémurafénib

Figure 33: visualisation des résultats pour la mutation L584F

B. Discussion

Dans le cadre de notre travail, toutes les mutations de BRAF causant un cancer ont été récupéré depuis la base des données ClinVar.

En effet, les mutations de substitutions sont classées par domaine, puis ont été analysé grâce aux méthodes computationnelles, afin d'évaluer leurs impacts sur la stabilité, la flexibilité, ainsi sur la fonction. L'étude de stabilité est très importante, à cause du fait qu'elle améliore la fonction, l'activité et la régulation structurelle (240). Or, la flexibilité peut être utilisée dans l'analyse des séquences, les prédictions des structures, et la modélisation moléculaire (241).

A la suite, une étude de criblage virtuel basé sur la structure a été nécessaire, dans l'intention d'identifier des nouveaux composés ayant une activité inhibitrice contre les différentes mutations BRAF au niveau de chaque domaine. La plupart des mutations BRAF sont oncogéniques ou probablement oncogéniques (242).

Par ailleurs, afin d'évaluer un effet mutationnel, il faut étudier les propriétés physico-chimiques des acides aminés, les rôles de leurs chaînes latérales dans la structure des protéines(243–245). Autrement, ces études combinent toutes les propriétés des résidus d'origine et de substitution et les informations structurelles, tout ceci est afin de faire la distinction entre les mutations délétères, étant généralement liées aux maladies, et celles neutres (246).

En effet, les mutations avec substitution ou faux-sens, sont responsables de plusieurs maladies, peuvent rendre les protéines non-fonctionnelles. Notamment, les protéines peuvent avoir des mutations, dont la plupart sont déstabilisantes mais neutres phénotypiquement. Par ailleurs, la stabilité d'une protéine est liée, d'une manière directe à son activité fonctionnelle et un repliement incorrect. Cependant, une diminution de stabilité conduit à l'apparition des mutations pathogènes (247).

Toutefois, un changement de flexibilité des résidus actifs de la protéine a plusieurs effets, notamment la modification de la région fonctionnelle, ainsi l'activité des protéines. Une diminution de la flexibilité globale et une augmentation de la rigidité affectent les propriétés de liaison des protéines. Cependant, une stabilité élevée augmente la rigidité de la protéine, tandis qu'une stabilité plus faible augmente la flexibilité de la protéine(240).

Cependant, une analyse globale des mutations, affectant les différents domaines, présente 118 des mutations délétères (91,47%), ainsi 11 mutations neutres (8.52%). De ce fait, ces

mutations délétères sont distribuées par domaine comme ceci : 30 mutations en domaine ATP binding, 10 mutations en domaine kinase, ainsi 78 mutations au niveau du domaine de boucle d'activation. Par ailleurs, le domaine le plus affecté par les mutations délétères est le domaine de boucle d'activation par un nombre de 78 mutations. En effet, ce domaine joue un rôle important dans la stabilisation des interactions avec les nucléosides d'ATP, grâce aux interactions hydrophobes. En élaborant, les résidus de ce domaine forment des fortes interactions hydrophobes avec la boucle P dans la conformation inactive de la kinase, en bloquant par la suite la kinase dans son état inactif, jusqu'à la phosphorylation de cette boucle ; par conséquent, ces interactions seront déstabilisées en présence d'une charge négative (107).

De ces 118 mutations délétères, 70 sont déstabilisantes avec des valeurs DDG qui sont variées entre (-3.798, -0.037), dont 50 parmi eux sont capables de diminuer la flexibilité.

Ceci peut expliquer leurs aspects délétères, vue qu'elles provoquent un changement sur la stabilité et la flexibilité de la structure 3D de la protéine (ref), ce qui affecte, par conséquent, la fonction de la protéine (22,23).

En outre, le domaine de boucle d'activation, ayant la mutation A621S, est le plus déstabilisant de ces domaines (DDG = -0.991). Cette mutation est une substitution d'une Alanine par une Sérine, c'est-à-dire une substitution d'un acide aminé aliphatique (hydrophobique) par un autre polaire non chargé (hydrophile). Comme la sérine peut être phosphorylée dans une chaîne de protéine, cette mutation peut être interprétée par le fait qu'elle peut induire un changement de conformation de la protéine, ce qui affecte la flexibilité par la suite (248). Ainsi, ceci peut être expliqué aussi par l'interaction d'acide aminé avec le solvant. Un autre facteur à tenir compte c'est la différence de la taille de la Sérine (105Da), qui est plus grande que le type sauvage, Alanine (89Da).

Cependant, au niveau du domaine kinase, toutes les mutations sont délétères, cela indique que ce domaine est le plus touché par les mutations, du fait qu'il performe une fonction catalytique kinase, en transférant un groupe phosphate de l'ATP sur les substrats BRAF(99).

Pour le domaine kinase, la mutation L584F est une substitution d'un Leucine, un acide aminé aliphatique, avec un autre qui est la Phénylalanine, un acide aminé aromatique, au niveau de la position 584. Cela veut dire que ces deux acides aminés sont hydrophobiques, donc l'interaction avec l'eau est conservée. Pour la taille de ces acides aminés, la Phénylalanine (165Da) est plus grande que le type sauvage, la Leucine (131Da).

Cette mutation, L584F, diminue la stabilité ($DDG = -0.914$), et augmente la flexibilité de la protéine ($DDS = -0.636$), ce qui peut être interprété par le fait que la conformation de la protéine devient très flexible au point qu'elle devient instable donc elle ne peut pas faire des interactions, ce qui altère par conséquent la fonction catalytique de ce domaine. Pourtant, le mécanisme de cette mutation à induire un cancer reste au cours d'investigation (249,250).

Le fait que les mutations de BRAF sont des mutations activatrices, c'est-à-dire des mutations de « gain de fonction », donc ça cause des tumeurs. Par la suite, ceci change complètement la stabilité et la flexibilité de la protéine, par le fait que la protéine devient instable et trop flexible (251).

Le domaine ATP-binding a pour effet la stabilisation des phosphates non transférés de l'ATP. Une sous-région de ce domaine, se considère une poche hydrophobe de liaison aux nucléotides lors de la liaison à l'ATP(107). La mutation G469E est une substitution d'un Glycine, qui est un acide aminé aliphatique, avec un autre acide, qui est l'acide glutamique, à la position 469. Ceci est une substitution d'un acide aminé hydrophobe par un autre hydrophile, ceci est expliqué par la grande accessibilité de la mutation au solvant.

Cette mutation présente une augmentation de stabilité ($DDG = -0.508$) et une diminution de la flexibilité ($DDS = -0.55$). Ce qui est expliqué par la présence d'autres types d'interactions comme les interactions de Van der Waals. Par ailleurs, ceci va peut être l'empêcher à accomplir sa fonction à cause de la diminution de la flexibilité. En plus, il y a une grande différence de taille entre la Glutamate (147Da), qui est beaucoup plus grande que celle de type sauvage, la Glycine (75Da). Ceci peut être dû par le changement des interfaces d'interaction, puisque la Glutamate est trop accessible au solvant. Ceci peut également affecter l'interaction entre le ligand et la protéine. Par ailleurs, G469E est une mutation activatrice, aboutissant au cancer(252).

Après la prédiction des effets sur la protéine, le cancer demeure une maladie, dont on n'a pas encore trouvé des thérapies efficaces sans toucher les cellules normales et sans être toxique. Cependant, la protéine BRAF est la cause de la plupart des cancers dans tous les organes du corps humains. De ce fait, il faut faire des recherches pour pouvoir identifier des composés ciblant cette protéine complexe.

Pour cela, une partie de ce travail s'est concentrée sur l'identification des inhibiteurs potentiels des mutations de la protéine BRAF, ainsi que le type sauvage, ce qui va permettre de faire une comparaison entre les différents résultats.

Tout d'abord, on a construit une base de données comportant 78 ligands, plus les 4 inhibiteurs de référence, et après avoir étudié et filtré 491 mutations, seulement trois qui ont été utilisé : A621S, G469E, L584F.

D'ailleurs, un criblage virtuel est utilisé afin d'identifier des petites molécules, ayant une grande affinité pour nos protéines. Ce qui fait, nous avons récupéré 101 molécules de la base de données Binding DB, après une filtration par les lois de 5 et Veber, seulement 90 molécules qui respectent ces lois. Ainsi, on a effectué une évaluation de toxicité par Mcule toxicity checker, par la suite, il reste seulement 78 molécules. Tout à coup, on a lancé le Docking par AutoDock vina, dans le but de confirmer et valider les résultats obtenus.

En outre, le fichier grid Box est valable pour le type sauvage ainsi la mutation G469E qui se situe au niveau du domaine ATP-binding, et la mutation L584F qui se trouve dans le domaine kinase. Pour créer un grid box, il nous faut les résidus de site actif de la littérature, de ce fait le site actif de la protéine est dans l'intervalle de 463 à 583 acides aminés. Cependant, dans ce site actif, la protéine performe deux rôles : un rôle catalytique pour le domaine kinase, et un rôle de liaison de l'ATP pour le domaine ATP-binding, sans oublier que ce dernier contient un sous-domaines qui est la boucle P dont son rôle est de stabiliser la liaison de site avec ATP (99).

Les 4 inhibiteurs de référence qui sont utilisés sont : Encorafénib, Dabrafénib, Vémurafénib et Encorafénib.

En résultat, la Sorafénib reste le meilleur inhibiteur avec une affinité de (-11.6 Kcal/mol) pour le type sauvage 4XV9, et avec une affinité de (-10.9 Kcal/mol) pour la mutation A621S du domaine de boucle d'activation. Ainsi, l'inhibiteur de référence Dabrafénib a montré la meilleure affinité (-12.3 Kcal/mol) respectivement pour les mutations G469E et L584F.

L'inhibiteur potentiel BDBM200399, en type sauvage, a une meilleure affinité avec (-8.7 Kcal/mol), pendant que l'Encorafénib a une affinité (-7.7Kcal/mol). Également pour la mutation L584F, il présente une affinité avec (-8.8 Kcal/mol), qui est meilleure que celle d'Encorafénib avec une affinité (-8.6 Kcal/mol).

Néanmoins, pour les mutations A621S et G469E, l'inhibiteur BDBM200399 présente une meilleure affinité que celle de l'Encorafénib et la Dabrafénib. Pour la mutation A621S, BDBM200399 présente une affinité de (-9.9 Kcal/mol), qui est meilleure par rapport l'Encorafénib ayant une affinité (-7.1 Kcal/mol), et par rapport la Dabrafénib, ayant une affinité (-9.3Kcal/mol). Du même pour la mutation G469E, BDBM200399 a une affinité avec (-10 Kcal/mol), qui est très bon par rapport à l'Encorafénib ayant (-8.5 Kcal/mol) et la Dabrafénib ayant (-9.3 Kcal/mol).

Par ailleurs, c'est très intéressant de voir qu'il y a de très bonne affinité, tandis que le nombre de liaison hydrogène est réduit. Ceci peut être dû à la présence d'autres types de liaisons tel : que les liaisons Van Der Waals. Ce qui indique l'effet des mutations de substitution sur la taille des acides aminés, leurs charges et le nombre de liaison hydrogène, sans oublier la présence des polymorphismes délétères, qui sont capables de modifier la formation de liaison hydrogènes entre molécules (247).

Notamment, on a vérifié les 4 inhibiteurs de référence selon les lois de 5 et Veber, puis on a évalué la toxicité de chacun d'eux. En faisant cela, on a la Sorafénib et le Vémurafénib qui ne respectent pas les règles de Veber, mais respectent les règles de Lipinski, ainsi ils ne sont pas toxiques (235,238,253,254).

Pour l'Encorafénib et le Dabrafénib ne respectent ni les lois de Lipinski, ni les lois de Veber. La seule différence est que Encorafénib est toxique, tandis que Dabrafénib n'est pas toxique(236,237). Ces informations donnent une valeur au composé BDBM200399, qui respecte les lois de Lipinski et de Veber, et le plus important, ce composé n'est pas toxique.

D'une autre côté, la combinaison de l'un des inhibiteurs avec un autre médicament est essentiel, afin d'éviter la résistance ou d'empêcher l'effet toxique de médicament(99).

A la fin, le composé BDBM200399 peut être proposé comme un nouveau médicament thérapeutique contre les différents types de cancer causés par la protéine BRAF.

Conclusion et perspectives

BRAF est une protéine de la voie de signalisation de MAPK. Celle-ci peut causer plusieurs types de cancer, si elle subit des altérations. D'ailleurs, le type de cancer causé par BRAF le plus connu est le mélanome.

Notre étude consiste à faire des prédictions de l'impact des mutations sur la stabilité, la flexibilité, et sur la fonction de la protéine. Ce qui peut être utile à élaborer des nouvelles recherches, afin de mieux comprendre les mécanismes de leurs effets. Mais cela va prendre beaucoup de temps, car on ne peut pas limiter l'impact des mutations en un seul aspect ; pour cela, il faut prendre en considération l'étude complète de plusieurs facteurs qui ont un impact sur la protéine comme les interactions moléculaires, la température, et le pH....

En outre, on a utilisé un criblage virtuel basé sur la structure et l'amarrage moléculaire afin de proposer des inhibiteurs potentiels contre les mutations de BRAF au niveau du : domaine ATP-binding contenant la mutation G469E, domaine kinase ayant la mutation L584F, et domaine de boucle d'activation contenant la mutation A621S. Le composé BDBM200399 a montré une meilleure affinité par rapport à deux inhibiteurs, qui sont mis au marché.

Les méthodes de modélisation cellulaire et de bio-informatique sont prometteuses pour les futures recherches contre le cancer, pour gagner le temps et diminuer la durée de développement des médicaments anti-cancéreux. Pourtant, ceci n'est que le début, car c'est une étude *in silico*. Pour cela, il faut faire des recherches *in vitro*, puis *in vivo*, ainsi les essais cliniques afin d'étudier l'effet de ce composé à traiter le cancer pour sa mise sur le marché.

Bibliographie

1. Gladka MM. Cellular communication in a « virtual lab »: going beyond the classical ligand-receptor interaction. *Cardiovasc Res.* 1 juin 2020;116(7):e67-9.
2. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* mai 2005;6(5):322-7.
3. Schreck KC, Grossman SA, Pratilas CA. BRAF Mutations and the Utility of RAF and MEK Inhibitors in Primary Brain Tumors. *Cancers.* 28 août 2019;11(9):E1262.
4. Dankner M, Rose AAN, Rajkumar S, Siegel PM, Watson IR. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene.* juin 2018;37(24):3183-99.
5. Jin Z, Sinicrope FA. Advances in the therapy of BRAFV600E metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* sept 2019;19(9):823-9.
6. Yu W, MacKerell AD. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1520:85-106.
7. Robert J. Signalisation cellulaire et cancer. *Bull Cancer (Paris).* 1 nov 2010;97(11):1215-22.
8. de Cremoux P, Robert J. Signalisation cellulaire et cancer : caractérisation de cibles thérapeutiques. *Pathol Biol.* 1 août 2012;60(4):217-22.
9. Signalisation cellulaire et cancer [Internet]. Disponible sur: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-2-8178-0028-8>
10. Pathologie Biologie - Vol 60 - n° 4 - EM consulte [Internet]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/revue/PATBIO/60/4/table-des-matieres/>
11. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9(9):726-35.
12. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells - PubMed [Internet]. [cité 28 juin 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11942415/>
13. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Bäsecke J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia.* avr 2008;22(4):686-707.
14. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1 avr 2010;1802(4):396-405.
15. Siow YL, Kalmar GB, Sanghera JS, Tai G, Oh SS, Pelech SL. Identification of Two Essential Phosphorylated Threonine Residues In the Catalytic Domain of Mekk1: INDIRECT ACTIVATION BY Pak3 AND PROTEIN KINASE C *. *J Biol Chem.* 21 mars 1997;272(12):7586-94.
16. Dhomen N, Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1 févr 2007;17(1):31-9.
17. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp Ther Med.* 1 mars 2020;19(3):1997-2007.
18. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 14 mai 2007;26(22):3279-90.

19. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* janv 1999;79(1):143-80.
20. EBSCOhost | 10129088 | Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. [Internet]. Disponible sur:
<https://web.p.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=08876924&AN=10129088&h=8PUrXW%2fLMh0w%2fp5eK5uHhq6zm5AvVX0vwLSpnwmyqZP7jETJuSqgifPLoXy%2fOivB4C2GDZOkLDdZFWyYsGn9g%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrlNotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d08876924%26AN%3d10129088>
21. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia.* févr 2004;18(2):189-218.
22. Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene.* 14 mai 2007;26(22):3122-42.
23. Gyurkó MD, Csermely P, Sóti C, Steták A. Distinct roles of the RasGAP family proteins in *C. elegans* associative learning and memory. *Sci Rep.* 15 oct 2015;5:15084.
24. Hennig A, Markwart R, Esparza-Franco MA, Ladds G, Rubio I. Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem.* août 2015;396(8):831-48.
25. McCormick F. ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell.* 13 janv 1989;56(1):5-8.
26. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* juill 2003;17(7):1263-93.
27. Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science.* 3 juin 1994;264(5164):1463-7.
28. Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene.* 14 mai 2007;26(22):3185-202.
29. Bell B, Xing H, Yan K, Gautam N, Muslin AJ. KSR-1 binds to G-protein betagamma subunits and inhibits beta gamma-induced mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 19 mars 1999;274(12):7982-6.
30. Chen HF, Chuang HC, Tan TH. Regulation of Dual-Specificity Phosphatase (DUSP) Ubiquitination and Protein Stability. *Int J Mol Sci.* 30 mai 2019;20(11):E2668.
31. Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.* janv 2013;280(2):489-504.
32. Ras oncogenes: split personalities - PubMed [Internet]. Disponible sur:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18568040/>
33. Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:615-49.

34. Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE. p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. nov 1989;86(21):8323-7.
35. Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*. 5 oct 1990;63(1):133-9.
36. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. nov 2004;5(11):875-85.
37. Wittinghofer A, Nassar N. How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci*. déc 1996;21(12):488-91.
38. Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*. 11 sept 1998;273(37):24052-6.
39. W L, M M, N P. Dual function of Ras in Raf activation. *Dev Camb Engl [Internet]*. déc 1998;125(24). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9811584/>
40. Marshall CJ. Cell signalling. Raf gets it together. *Nature*. 12 sept 1996;383(6596):127-8.
41. Ma F, J T, Rm P. Membrane localization of Raf assists engagement of downstream effectors. *J Biol Chem [Internet]*. 10 juin 2000;275(40). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10913130/>
42. Chong H, Lee J, Guan KL. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J*. 16 juill 2001;20(14):3716-27.
43. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J*. 15 avr 1999;18(8):2137-48.
44. J S, M T, Ri M. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol [Internet]*. mars 2001;3(3). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11231577/>
45. Tzivion G, Shen YH, Zhu J. 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene*. 1 oct 2001;20(44):6331-8.
46. Jambrina PG, Rauch N, Pilkington R, Rybakova K, Nguyen LK, Kholodenko BN, et al. Phosphorylation of RAF Kinase Dimers Drives Conformational Changes that Facilitate Transactivation. *Angew Chem Int Ed Engl*. 18 janv 2016;55(3):983-6.
47. Zhang BH, Guan KL. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *EMBO J*. 16 oct 2000;19(20):5429-39.
48. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, et al. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*. 1 avr 1994;13(7):1610-9.
49. Cf Z, Kl G. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J [Internet]*. 3 janv 1994;13(5). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8131746/>
50. Fischmann TO, Smith CK, Mayhood TW, Myers JE, Reichert P, Mannarino A, et al. Crystal structures of MEK1 binary and ternary complexes with nucleotides and inhibitors. *Biochemistry*. 31 mars 2009;48(12):2661-74.

51. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* avr 1999;19(4):2435-44.
52. Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, et al. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 mars 1998;95(7):3537-42.
53. Zhao Q, Lee FS. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem.* 26 mars 1999;274(13):8355-8.
54. Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* sept 2002;64(5-6):755-63.
55. Delire B, Stärkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest.* juin 2015;45(6):609-23.
56. Yokoyama K, Hiyama A, Arai F, Nukaga T, Sakai D, Mochida J. C-Fos regulation by the MAPK and PKC pathways in intervertebral disc cells. *PLoS One.* 2013;8(9):e73210.
57. Liu Y, Tang J, Yuan J, Yao C, Hosoi K, Han Y, et al. Arsenite-induced downregulation of occludin in mouse lungs and BEAS-2B cells via the ROS/ERK/ELK1/MLCK and ROS/p38 MAPK signaling pathways. *Toxicol Lett.* 10 oct 2020;332:146-54.
58. M VS, T O, D T, Ad T, Cn D, M F, et al. The ETS transcription factor ERF controls the exit from the naïve pluripotent state in a MAPK-dependent manner. *Sci Adv* [Internet]. oct 2021;7(40). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34597136/>
59. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26096166/>
60. Myc is involved in Genistein protecting against LPS-induced myocarditis in vitro through mediating MAPK/JNK signaling pathway - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32515469/>
61. Hu C, Huang W, Xiong N, Liu X. SP1-mediated transcriptional activation of PTTG1 regulates the migration and phenotypic switching of aortic vascular smooth muscle cells in aortic dissection through MAPK signaling. *Arch Biochem Biophys.* 30 oct 2021;711:109007.
62. Moschos SJ, Sullivan RJ, Hwu WJ, Ramanathan RK, Adjei AA, Fong PC, et al. Development of MK-8353, an orally administered ERK1/2 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *JCI Insight.* 22 févr 2018;3(4):92352.
63. T H, Pp R. Defining the role of the RSK isoforms in cancer. *Semin Cancer Biol* [Internet]. févr 2018;48. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28476656/>
64. Dreas A, Mikulski M, Milik M, Fabritius CH, Brzózka K, Rzymiski T. Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Interacting Kinases 1 and 2 (MNK1 and MNK2) as Targets for Cancer Therapy: Recent Progress in the Development of MNK Inhibitors. *Curr Med Chem.* 2017;24(28):3025-53.
65. Lee S, Rauch J, Kolch W. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. *Int J Mol Sci.* 7 févr 2020;21(3):E1102.
66. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22232209/>

67. Quinlan MP, Settleman J. Isoform-specific ras functions in development and cancer. *Future Oncol Lond Engl*. févr 2009;5(1):105-16.
68. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 15 mai 2012;72(10):2457-67.
69. Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*. 23 févr 2001;104(4):593-604.
70. Pt W, Mj G, Sm R, S L, D ND, Vm G, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* [Internet]. 19 mars 2004;116(6). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15035987/>
71. Noeparast A, Giron P, Noor A, Bahadur Shahi R, De Brakeleer S, Eggermont C, et al. CRAF mutations in lung cancer can be oncogenic and predict sensitivity to combined type II RAF and MEK inhibition. *Oncogene*. août 2019;38(31):5933-41.
72. Li D, March ME, Gutierrez-Uzquiza A, Kao C, Seiler C, Pinto E, et al. ARAF recurrent mutation causes central conducting lymphatic anomaly treatable with a MEK inhibitor. *Nat Med*. juill 2019;25(7):1116-22.
73. Lin W, Tong C, Zhang W, Cen W, Wang Y, Li J, et al. Silencing ARAF Suppresses the Malignant Phenotypes of Gallbladder Cancer Cells. *BioMed Res Int*. 2020;2020:3235786.
74. Yen I, Shanahan F, Lee J, Hong YS, Shin SJ, Moore AR, et al. ARAF mutations confer resistance to the RAF inhibitor belvarafenib in melanoma. *Nature*. juin 2021;594(7863):418-23.
75. Ritterhouse LL, Barletta JA. BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Semin Diagn Pathol*. sept 2015;32(5):400-8.
76. Umar BA, Uzairu A, Shallangwa GA, Uba S. RATIONAL DRUG DESIGN OF POTENT V600E-BRAF KINASE INHIBITORS THROUGH MOLECULAR DOCKING SIMULATION. *J Eng Exact Sci*. 20 déc 2019;5(5):0469-81.
77. Hong A, Piva M, Liu S, Hugo W, Lomeli SH, Zoete V, et al. Durable Suppression of Acquired MEK Inhibitor Resistance in Cancer by Sequestering MEK from ERK and Promoting Antitumor T-cell Immunity. *Cancer Discov*. mars 2021;11(3):714-35.
78. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 14 mai 2007;26(22):3291-310.
79. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 15 juin 2003;101(12):4667-79.
80. Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev*. févr 2002;12(1):30-5.
81. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 12 avr 2004;23(16):2838-49.
82. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer*. déc 2004;4(12):937-47.
83. Moore AR, Rosenberg SC, McCormick F, Malek S. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat Rev Drug Discov*. août 2020;19(8):533-52.

84. Cabanillas ME, Ryder M, Jimenez C. Targeted Therapy for Advanced Thyroid Cancer: Kinase Inhibitors and Beyond. *Endocr Rev.* 1 déc 2019;40(6):1573-604.
85. Ishii N, Harada N, Joseph EW, Ohara K, Miura T, Sakamoto H, et al. Enhanced inhibition of ERK signaling by a novel allosteric MEK inhibitor, CH5126766, that suppresses feedback reactivation of RAF activity. *Cancer Res.* 1 juill 2013;73(13):4050-60.
86. Chenard-Poirier M, Kaiser M, Boyd K, Sriskandarajah P, Constantinidou A, Harris SJ, et al. Results from the biomarker-driven basket trial of RO5126766 (CH5127566), a potent RAF/MEK inhibitor, in RAS- or RAF-mutated malignancies including multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 20 mai 2017;35(15_suppl):2506-2506.
87. Gao Y, Chang MT, McKay D, Na N, Zhou B, Yaeger R, et al. Allele-Specific Mechanisms of Activation of MEK1 Mutants Determine Their Properties. *Cancer Discov.* mai 2018;8(5):648-61.
88. Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, et al. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov.* juill 2013;3(7):742-50.
89. Germann UA, Furey BF, Markland W, Hoover RR, Aronov AM, Roix JJ, et al. Targeting the MAPK Signaling Pathway in Cancer: Promising Preclinical Activity with the Novel Selective ERK1/2 Inhibitor BVD-523 (Ulixertinib). *Mol Cancer Ther.* nov 2017;16(11):2351-63.
90. Mark GE, Rapp UR. Primary structure of v-raf: relatedness to the src family of oncogenes. *Science.* 20 avr 1984;224(4646):285-9.
91. Odabaei G, Chatterjee D, Jazirehi AR, Goodglick L, Yeung K, Bonavida B. Raf-1 kinase inhibitor protein: structure, function, regulation of cell signaling, and pivotal role in apoptosis. *Adv Cancer Res.* 2004;91:169-200.
92. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* avr 1997;9(2):174-9.
93. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* sept 2008;67(9):878-87.
94. Brennan DF, Dar AC, Hertz NT, Chao WCH, Burlingame AL, Shokat KM, et al. A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature.* 21 avr 2011;472(7343):366-9.
95. J T, Jt L, W W, J Z, H C, S M, et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 26 févr 2008;105(8). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18287029/>
96. Sholl LM. A narrative review of BRAF alterations in human tumors: diagnostic and predictive implications. *Precis Cancer Med* [Internet]. 30 déc 2020;3(0). Disponible sur: <https://pcm.amegroups.com/article/view/5933>
97. Yao Z, Torres NM, Tao A, Gao Y, Luo L, Li Q, et al. BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition. *Cancer Cell.* 14 sept 2015;28(3):370-83.
98. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, et al. Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 août 2007;1773(8):1196-212.

99. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31426419/>
100. Bivona TG. Dampening oncogenic RAS signaling. *Science*. 22 mars 2019;363(6433):1280-1.
101. cBioPortal for Cancer Genomics [Internet]. Disponible sur: <https://www.cbioportal.org/>
102. Yao Z, Yaeger R, Rodrik-Outmezguine VS, Tao A, Torres NM, Chang MT, et al. Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature*. 10 août 2017;548(7666):234-8.
103. Flaherty KT, McArthur G. BRAF, a target in melanoma: implications for solid tumor drug development. *Cancer*. 1 nov 2010;116(21):4902-13.
104. Cutler RE, Stephens RM, Saracino MR, Morrison DK. Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 août 1998;95(16):9214-9.
105. Ca P, Bs T, Q Y, A V, C S, Db S, et al. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 17 mars 2009;106(11). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19251651/>
106. Lito P, Pratilas CA, Joseph EW, Tadi M, Halilovic E, Zubrowski M, et al. Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell*. 13 nov 2012;22(5):668-82.
107. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 19 mars 2004;116(6):855-67.
108. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 23 nov 2011;480(7377):387-90.
109. Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res*. 1 mai 2001;61(9):3595-8.
110. Dougherty MK, Müller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, et al. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell*. 21 janv 2005;17(2):215-24.
111. Ritt DA, Monson DM, Specht SI, Morrison DK. Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Mol Cell Biol*. févr 2010;30(3):806-19.
112. Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2015;16(5):281-98.
113. N T, H L, Da C, A T, A M, F S, et al. Crystal structure of a BRAF kinase domain monomer explains basis for allosteric regulation. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. janv 2015;22(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25437913/>
114. Röring M, Herr R, Fiala GJ, Heilmann K, Braun S, Eisenhardt AE, et al. Distinct requirement for an intact dimer interface in wild-type, V600E and kinase-dead B-Raf signalling. *EMBO J*. 30 mai 2012;31(11):2629-47.

115. Aj S, Ss L, Kl B, Pj M, E S, N C, et al. Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 4 sept 2013;110(15). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23533272/>
116. J O, Mk S, J P, Gk I, M S, S O, et al. Prevalence of class I-III BRAF mutations among 114,662 cancer patients in a large genomic database. *Exp Biol Med Maywood NJ* [Internet]. janv 2021 ;246(1). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33019809/>
117. Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F, Tanaka Y, Imamura J, Imamura T, et al. Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. *Cancer Res*. 1 déc 2003;63(23):8132-7.
118. Summers MG, Smith CG, Maughan TS, Kaplan R, Escott-Price V, Cheadle JP. BRAF and NRAS Locus-Specific Variants Have Different Outcomes on Survival to Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 juin 2017;23(11):2742-9.
119. Zheng G, Tseng LH, Chen G, Haley L, Illei P, Gocke CD, et al. Clinical detection and categorization of uncommon and concomitant mutations involving BRAF. *BMC Cancer*. 24 oct 2015;15:779.
120. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res*. sept 2011;39(17):e118.
121. Sullivan RJ, Flaherty KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. avr 2013;49(6):1297-304.
122. Cm N. RAS diseases in children. *Haematologica* [Internet]. nov 2014;99(11). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25420281/>
123. Kratz CP, Franke L, Peters H, Kohlschmidt N, Kazmierczak B, Finckh U, et al. Cancer spectrum and frequency among children with Noonan, Costello, and cardio-facio-cutaneous syndromes. *Br J Cancer*. 14 avr 2015;112(8):1392-7.
124. Mh C, Im S. Oncogenic BRAF and KRAS mutations in endosalpingiosis. *J Pathol* [Internet]. févr 2020;250(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31576556/>
125. Chan E, Stohr BA, Croom NA, Cho SJ, Garg K, Troxell ML, et al. Molecular characterisation of metanephric adenomas beyond BRAF: genetic evidence for potential malignant evolution. *Histopathology*. juin 2020;76(7):1084-90.
126. Martinez-Barbera JP, Andoniadou CL. Biological Behaviour of Craniopharyngiomas. *Neuroendocrinology*. 2020;110(9-10):797-804.
127. Chen J, Jian X, Deng S, Ma Z, Shou X, Shen Y, et al. Identification of recurrent USP48 and BRAF mutations in Cushing's disease. *Nat Commun*. 9 août 2018;9(1):3171.
128. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 17 nov 2005;353(20):2135-47.
129. The Cancer Genome Atlas Program - NCI [Internet]. 2018 Disponible sur: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>
130. Exploration [Internet]. Disponible sur: <https://portal.gdc.cancer.gov/exploration?filters=%7B%22op%22%3A%22and%22%2C%22content%22%3A%5B%7B%22op%22%3A%22in%22%2C%22content%22%3A%7B%22field%22%3A%22cases.avai>

lable_variation_data%22%2C%22value%22%3A%5B%22ssm%22%2C%22cnv%22%5D%7D%7D%2C%7B%22op%22%3A%22in%22%2C%22content%22%3A%7B%22field%22%3A%22genes.gene_id%22%2C%22value%22%3A%5B%22ENSG00000157764%22%5D%7D%7D%5D%7D&searchTableTab=cases

131. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. Disponible sur: <https://omim.org/>
132. OMIM Allelic Variants - 164757 [Internet]. Disponible sur: <https://omim.org/allelicVariants/164757>
133. Dingerdissen HM, Bastian F, Vijay-Shanker K, Robinson-Rechavi M, Bell A, Gogate N, et al. OncoMX: A Knowledgebase for Exploring Cancer Biomarkers in the Context of Related Cancer and Healthy Data. *JCO Clin Cancer Inform.* nov 2020;(4):210-20.
134. OncoMX [Internet]. Disponible sur: <https://oncomx.org/searchview/?gene=P15056#details>
135. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature.* 18 mars 2010;464(7287):427-30.
136. Dc K, G S, J C, M M, C O, Sa H, et al. Clinical responses to ERK inhibition in BRAFV600E-mutant colorectal cancer predicted using a computational model. *NPJ Syst Biol Appl* [Internet]. 6 févr 2017;3. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28649441/>
137. Gogas HJ, Flaherty KT, Dummer R, Ascierto PA, Arance A, Mandala M, et al. Adverse events associated with encorafenib plus binimetinib in the COLUMBUS study: incidence, course and management. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. sept 2019;119:97-106.
138. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell.* 22 janv 2010;140(2):209-21.
139. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature.* 18 mars 2010;464(7287):431-5.
140. Karajannis MA, Legault G, Fisher MJ, Milla SS, Cohen KJ, Wisoff JH, et al. Phase II study of sorafenib in children with recurrent or progressive low-grade astrocytomas. *Neuro-Oncol.* oct 2014;16(10):1408-16.
141. Zhang C, Spevak W, Zhang Y, Burton EA, Ma Y, Habets G, et al. RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature.* 22 oct 2015;526(7574):583-6.
142. Jin T, Lavoie H, Sahmi M, David M, Hilt C, Hammell A, et al. RAF inhibitors promote RAS-RAF interaction by allosterically disrupting RAF autoinhibition. *Nat Commun.* 31 oct 2017;8(1):1211.
143. Ra O, L L, V O, E C, E M, A R, et al. Preclinical efficacy of a RAF inhibitor that evades paradoxical MAPK pathway activation in protein kinase BRAF-mutant lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 22 nov 2016;113(47). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27834212/>
144. Basile KJ, Le K, Hartsough EJ, Aplin AE. Inhibition of mutant BRAF splice variant signaling by next-generation, selective RAF inhibitors. *Pigment Cell Melanoma Res.* mai 2014;27(3):479-84.
145. Z Y, Y G, W S, R Y, J T, N N, et al. RAF inhibitor PLX8394 selectively disrupts BRAF dimers and RAS-independent BRAF-mutant-driven signaling. *Nat Med* [Internet]. févr 2019;25(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30559419/>

146. J W, Z Y, P J, An A, Acr Q, S U, et al. A Secondary Mutation in BRAF Confers Resistance to RAF Inhibition in a BRAFV600E-Mutant Brain Tumor. *Cancer Discov* [Internet]. sept 2018;8(9). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29880583/>
147. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 12 juill 2012;367(2):107-14.
148. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med*. 13 nov 2014;371(20):1877-88.
149. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, et al. Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. oct 2018;19(10):1315-27.
150. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 13 nov 2014;371(20):1867-76.
151. Fangusaro J, Onar-Thomas A, Young Poussaint T, Wu S, Ligon AH, Lindeman N, et al. Selumetinib in paediatric patients with BRAF-aberrant or neurofibromatosis type 1-associated recurrent, refractory, or progressive low-grade glioma: a multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. juill 2019;20(7):1011-22.
152. Rj S, Jr I, F J, Djl W, Ja S, V K, et al. First-in-Class ERK1/2 Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) in Patients with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors: Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study. *Cancer Discov* [Internet]. févr 2018;8(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29247021/>
153. Emerging application of genomics-guided therapeutics in personalized lung cancer treatment - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29911108/>
154. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25653539/>
155. Halliday PR, Blakely CM, Bivona TG. Emerging Targeted Therapies for the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer. *Curr Oncol Rep*. 26 févr 2019;21(3):21.
156. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer*. juill 2014;14(7):455-67.
157. Iv F, Kh P, Ks S. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 8 janv 2011;82(3). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21635872/>
158. Lin L, Bivona TG. The Hippo effector YAP regulates the response of cancer cells to MAPK pathway inhibitors. *Mol Cell Oncol*. janv 2016;3(1):e1021441.
159. Lin L, Sabnis AJ, Chan E, Olivas V, Cade L, Pazarentzos E, et al. The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat Genet*. mars 2015;47(3):250-6.
160. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*. 26 juill 2012;487(7408):505-9.

161. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23288408/>
162. Neel DS, Bivona TG. Resistance is futile: overcoming resistance to targeted therapies in lung adenocarcinoma. *NPJ Precis Oncol.* 2017;1:3.
163. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* janv 2014;4(1):94-109.
164. Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun.* 6 mars 2012;3:724.
165. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 16 déc 2010;468(7326):973-7.
166. Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26608120/>
167. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317224/>
168. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 22 févr 2007;445(7130):851-7.
169. W H, H S, L S, M P, C S, X K, et al. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* [Internet]. 9 oct 2015;162(6). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26359985/>
170. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature.* 26 juill 2012;487(7408):500-4.
171. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30410366/>
172. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.* 15 juin 2008;68(12):4853-61.
173. Moriceau G, Hugo W, Hong A, Shi H, Kong X, Yu CC, et al. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell.* 9 févr 2015;27(2):240-56.
174. Cm J, Js B, Sy K, Sr T, L W, La J, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* [Internet]. 16 déc 2010 ; 468(7326). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21107320/>
175. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 7 juill 2005;436(7047):117-22.

176. H K, H E, S T, Kv F, H K, Y A, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Defines Feedback Activation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling Induced by MEK Inhibition in KRAS-Mutant Lung Cancer. *Cancer Discov* [Internet]. juill 2016;6(7). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27154822/>
177. A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27338794/>
178. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22356324/>
179. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24508103/>
180. Kong X, Kuilman T, Shahrabi A, Boshuizen J, Kemper K, Song JY, et al. Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature*. 12 oct 2017;550(7675):270-4.
181. Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*. sept 1997;17(9):5598-611.
182. Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, Sellers WR, Pryer NK, Levesque MP, et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature*. 14 févr 2013;494(7436):251-5.
183. Abdel-Wahab O, Klimek VM, Gaskell AA, Viale A, Cheng D, Kim E, et al. Efficacy of intermittent combined RAF and MEK inhibition in a patient with concurrent BRAF- and NRAS-mutant malignancies. *Cancer Discov*. mai 2014;4(5):538-45.
184. Nakagawa H, Kataoka M. Rigidity of protein structure revealed by incoherent neutron scattering. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. avr 2020;1864(4):129536.
185. Liljas A. *Textbook of structural biology*. Second edition. New Jersey: World Scientific; 2017. 599 p. (Series in structural biology).
186. *Introduction to Proteins : Structure, Function, and Motion, Second Edition* [Internet]. Chapman and Hall/CRC; 2018. Disponible sur: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781315113876/introduction-proteins-amit-kessel-nir-ben-tal>
187. Huber R, Bennett WS. Functional significance of flexibility in proteins. *Biopolymers*. janv 1983;22(1):261-79.
188. Bouvignies G, Bernadó P, Meier S, Cho K, Grzesiek S, Brüschweiler R, et al. Identification of slow correlated motions in proteins using residual dipolar and hydrogen-bond scalar couplings. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 sept 2005;102(39):13885-90.
189. Performance of protein stability predictors - Khan - 2010 - *Human Mutation* - Wiley Online Library [Internet]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/humu.21242>
190. Alber T. Mutational Effects on Protein Stability. *Annu Rev Biochem*. 1989;58(1):765-92.

191. Tang KE, Dill KA. Native protein fluctuations: the conformational-motion temperature and the inverse correlation of protein flexibility with protein stability. *J Biomol Struct Dyn.* oct 1998;16(2):397-411.
192. Fenimore PW, Frauenfelder H, McMahon BH, Parak FG. Slaving: solvent fluctuations dominate protein dynamics and functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 déc 2002;99(25):16047-51.
193. Pw F, H F, Bh M, Rd Y. Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to alpha- and beta-fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 10 mai 2004;101(40). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15448207/>
194. Frauenfelder H, Fenimore PW, Chen G, McMahon BH. Protein folding is slaved to solvent motions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 oct 2006;103(42):15469-72.
195. Vitkup D, Ringe D, Petsko GA, Karplus M. Solvent mobility and the protein « glass » transition. *Nat Struct Biol.* janv 2000;7(1):34-8.
196. Dill KA. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry.* 7 août 1990;29(31):7133-55.
197. Kamerzell TJ, Middaugh CR. The complex inter-relationships between protein flexibility and stability. *J Pharm Sci.* sept 2008;97(9):3494-517.
198. Mittermaier A, Kay LE. New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *Science.* 14 avr 2006;312(5771):224-8.
199. Ag P, Cd K, Jp L. Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods Enzymol* [Internet]. 2001;339. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11462813/>
200. Karplus M, McCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol.* sept 2002;9(9):646-52.
201. McCammon JA, Harvey SC. *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids.* Cambridge University Press; 1988. 256 p.
202. Karplus M, Petsko GA. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature.* 18 oct 1990;347(6294):631-9.
203. Protein fluctuations and the thermodynamic uncertainty principle - PubMed [Internet]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6390520/>
204. Frauenfelder H, Parak F, Young RD. Conformational substates in proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1988;17:451-79.
205. M O, Pg W. The experimental survey of protein-folding energy landscapes. *Q Rev Biophys* [Internet]. août 2005;38(3). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16780604/>
206. Schulze B, Sljoka A, Whiteley W. How does symmetry impact the flexibility of proteins? 2014.
207. Laskowski RA, Watson JD, Thornton JM. Protein function prediction using local 3D templates. *J Mol Biol.* 19 août 2005;351(3):614-26.
208. Macalino SJY, Gosu V, Hong S, Choi S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch Pharm Res.* sept 2015;38(9):1686-701.

209. Wróbel A, Arciszewska K, Maliszewski D, Drozdowska D. Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. *J Antibiot (Tokyo)*. janv 2020;73(1):5-27.
210. Kalyanamoorthy S, Chen YPP. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discov Today*. sept 2011;16(17-18):831-9.
211. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Mol Basel Switz*. 22 juill 2015;20(7):13384-421.
212. wwPDB consortium. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Res*. 8 janv 2019;47(D1):D520-8.
213. Lesk AM, Chothia C. How different amino acid sequences determine similar protein structures: the structure and evolutionary dynamics of the globins. *J Mol Biol*. 25 janv 1980;136(3):225-70.
214. K I, Dh A, A E. Structure is three to ten times more conserved than sequence--a study of structural response in protein cores. *Proteins [Internet]*. 15 nov 2009;77(3). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19507241/>
215. Ingles-Prieto A, Ibarra-Molero B, Delgado-Delgado A, Perez-Jimenez R, Fernandez JM, Gaucher EA, et al. Conservation of protein structure over four billion years. *Struct Lond Engl* 1993. 3 sept 2013;21(9):1690-7.
216. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. A new approach to protein fold recognition. *Nature*. 2 juill 1992;358(6381):86-9.
217. Simons KT, Kooperberg C, Huang E, Baker D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions. *J Mol Biol*. 25 avr 1997;268(1):209-25.
218. Liao JLL, Andrews RC. Targeting protein multiple conformations: a structure-based strategy for kinase drug design. *Curr Top Med Chem*. 2007;7(14):1394-407.
219. Wunberg T, Hendrix M, Hillisch A, Lobell M, Meier H, Schmeck C, et al. Improving the hit-to-lead process: data-driven assessment of drug-like and lead-like screening hits. *Drug Discov Today*. févr 2006;11(3-4):175-80.
220. Anderson AC. The process of structure-based drug design. *Chem Biol*. sept 2003;10(9):787-97.
221. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci*. 6 juin 2019;20(11):E2783.
222. Melo-Filho CC, Braga RC, Andrade CH. 3D-QSAR approaches in drug design: perspectives to generate reliable CoMFA models. *Curr Comput Aided Drug Des*. 2014;10(2):148-59.
223. A L, C DG. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Curr Med Chem [Internet]*. 2013;20(23). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23651302/>
224. Vuorinen A, Schuster D. Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. *Methods San Diego Calif*. janv 2015;71:113-34.

225. Leelananda SP, Lindert S. Computational methods in drug discovery. *Beilstein J Org Chem*. 2016;12:2694-718.
226. 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.
227. Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, et al. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res*. janv 2014;42(Database issue):D1091-1097.
228. UniProt [Internet]. Disponible sur: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P15056/entry#sequences>
229. Karami TK, Hailu S, Feng S, Graham R, Gukasyan HJ. Eyes on Lipinski's Rule of Five: A New « Rule of Thumb » for Physicochemical Design Space of Ophthalmic Drugs. *J Ocul Pharmacol Ther Off J Assoc Ocul Pharmacol Ther*. févr 2022;38(1):43-55.
230. Nazreen S. Design, synthesis, and molecular docking studies of thiazolidinediones as PPAR- γ agonists and thymidylate synthase inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*. sept 2021;354(9):e2100021.
231. Dienstmann R, Tabernero J. BRAF as a Target for Cancer Therapy. *Anti-Cancer Agents Med Chem- Anti-Cancer Agents*. 1 mars 2011;11(3):285-95.
232. Li Z, Jiang K, Zhu X, Lin G, Song F, Zhao Y, et al. Encorafenib (LGX818), a potent BRAF inhibitor, induces senescence accompanied by autophagy in BRAFV600E melanoma cells. *Cancer Lett*. janv 2016;370(2):332-44.
233. Suo Z, Xiong X, Sun Q, Zhao L, Tang P, Hou Q, et al. Investigation on the Interaction of Dabrafenib with Human Serum Albumin Using Combined Experiment and Molecular Dynamics Simulation: Exploring the Binding Mechanism, Esterase-like Activity, and Antioxidant Activity. *Mol Pharm*. 3 déc 2018;15(12):5637-45.
234. Luke JJ, Hodi FS. Vemurafenib and BRAF Inhibition: A New Class of Treatment for Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 1 janv 2012;18(1):9-14.
235. Sorafenib [Internet]. Disponible sur: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00398>
236. Dabrafenib [Internet]. Disponible sur: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08912>
237. Encorafenib [Internet]. Disponible sur: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11718>
238. Vemurafenib [Internet]. Disponible sur: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08881>
239. Luo C, Xie P, Marmorstein R. Identification of BRAF Inhibitors through In Silico Screening. *J Med Chem*. 9 oct 2008;51(19):6121-7.
240. Analysing the Effect of Mutation on Protein Function and Discovering Potential Inhibitors of CDK4: Molecular Modelling and Dynamics Studies | PLOS ONE [Internet]. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133969>
241. Vihinen M, Torkkila E, Riikonen P. Accuracy of protein flexibility predictions. *Proteins*. juin 1994;19(2):141-9.
242. OncoKB™ - MSK's Precision Oncology Knowledge Base [Internet]. OncoKB™. Disponible sur: <https://www.oncokb.org/>

243. Karchin R, Diekhans M, Kelly L, Thomas DJ, Pieper U, Eswar N, et al. LS-SNP: large-scale annotation of coding non-synonymous SNPs based on multiple information sources. *Bioinformatics*. 15 juin 2005;21(12):2814-20.
244. Kaminker JS, Zhang Y, Waugh A, Haverty PM, Peters B, Sebisanoovic D, et al. Distinguishing cancer-associated missense mutations from common polymorphisms. *Cancer Res*. 15 janv 2007;67(2):465-73.
245. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic [Internet]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/nar/article/35/11/3823/2402194?login=true>
246. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 1 juill 2003;31(13):3812-4.
247. Li M, Goncarenco A, Panchenko AR. Annotating mutational effects on proteins and protein interactions: designing novel and revisiting existing protocols. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1550:235-60.
248. Polar Amino Acids: Uncharged | *Amino Acids* | *Amino Acids and Peptides* | *The Fundamentals of Biochemistry: Interactive Tutorials* | Colorado State University [Internet]. Disponible sur: <https://bc401.bmb.colostate.edu/5/aminos-6.php?i=1>
249. Stones CJ, Kim JE, Joseph WR, Leung E, Marshall ES, Finlay GJ, et al. Comparison of responses of human melanoma cell lines to MEK and BRAF inhibitors. *Front Genet*. 2013;4:66.
250. Carter J, Tseng LH, Zheng G, Dudley J, Illei P, Gocke CD, et al. Non-p.V600E BRAF Mutations Are Common Using a More Sensitive and Broad Detection Tool. *Am J Clin Pathol*. oct 2015;144(4):620-8.
251. Stein Y, Rotter V, Aloni-Grinstein R. Gain-of-Function Mutant p53: All the Roads Lead to Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 8 déc 2019;20(24):E6197.
252. Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F, Aragaki J, Tanaka Y, Imamura J, et al. Different effects of point mutations within the B-Raf glycine-rich loop in colorectal tumors on mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor kappaB pathway and cellular transformation. *Cancer Res*. 15 mai 2004;64(10):3428-35.
253. Kane RC, Farrell AT, Saber H, Tang S, Williams G, Jee JM, et al. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 déc 2006;12(24):7271-8.
254. Kim G, McKee AE, Ning YM, Hazarika M, Theoret M, Johnson JR, et al. FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 oct 2014;20(19):4994-5000.

