
Collecte des données expérimentales :

Les protozoaires sont souvent utilisés pour l'évaluation de la toxicité. Les méthodes mises en œuvre sont basées sur des critères morphologiques, ultra-structuraux, éthologiques et métaboliques [47].

L'inhibition de la croissance d'une population est un indicateur très en vogue, parce qu'il peut être déterminé directement ou indirectement à l'aide d'un équipement électronique. Ce qui permet l'acquisition rapide des observations nécessaires pour les analyses de régression. Nous considérerons la concentration d'inhibition 50% de la croissance (CIC_{50}), dont le logarithme de l'inverse, soit $pCIC_{50} = \log(CIC_{50})^{-1}$, servira d'indicateur de toxicité.

Les tests de toxicité ont été réalisés [48,49] en examinant la croissance d'une population de *Tetrahymena pyriformis*. Les essais ont été menés dans des erlenmeyers de 250 ml, contenant 50 ml d'un milieu dont la composition est précisée ci après :

Eau distillée	1000 ml
Proteose peptone	20 g
D-glucose	5 g
extrait de levure	1 g
FeEDTA	1 mL d'une solution à 3 % (masse/v)
pH	7,35

La température a été fixée à $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Ce milieu est inoculé avec 0,25 ml d'une culture contenant approximativement 36 000 cellules par ml. La croissance des ciliés est suivie par spectrophotométrie, en mesurant la densité optique (absorbance) à 540 nm après 48 heures d'incubation.

Plusieurs critères ont guidé au choix des composés toxiques examinés. Tous sont disponibles dans le commerce avec une pureté suffisante (95 % et plus), ce qui ne nécessite pas une re-purification préalablement au test. Des précautions ont été observées afin d'assurer une diversité concernant, à la fois, les propriétés physico-chimiques et la position des substituants.

Les solutions stocks des divers composés toxiques, ont été préparées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à des concentrations de 5, 10, 25 et 50 grammes par litre. Dans chaque cas, le volume de solution stock ajouté à chaque fiole est limité par la concentration finale de DMSO qui ne doit pas excéder 0,75 % (350 µl par fiole), quantité qui n'altère pas la reproduction de *Tetrahymena* [48,49].

Coefficient de partage

Coefficient de partage

I- Définition:

II- Mesure de coefficient de partage (logP)

II-1- Méthode du flacon agité

II- 2- Détermination par HPLC

III- Prédiction du coefficient de partage octanol /eau

III- 1- Méthodes fragmentales

III-2- Méthodes Des Contributions d'Atomes

III-3- Approches par Molécule -Entière

Coefficient de partage Octanol/eau (logP)

Le transport, le passage à travers les membranes, la bioaccumulation ou encore l'activité pharmacologique d'une molécule peuvent être conditionnés par son partage entre une phase lipidique et une phase aqueuse, c'est-à-dire son caractère hydrophile. Celui-ci peut être quantifié par le coefficient de partage octanol-eau, noté logP, qui mesure la solubilité différentielle d'un soluté dans ces deux solvants non miscibles [50].

$$\log P = \log \left(C_{\text{octanol}} / C_{\text{H}_2\text{O}} \right) \quad (\text{eq. 19})$$

C_{octanol} et $C_{\text{H}_2\text{O}}$ sont les concentrations du soluté dans l'octanol et l'eau.

La lipophilie, échelle continue, peut avoir aussi bien une valeur positive qu'une valeur négative. Donc, les composés qui ont les valeurs de $P > 1$ ou $\log P > 0$ sont lipophiles, et les composés qui ont les valeurs de $P < 1$ ou $\log P < 0$ sont hydrophiles.

La lipophilie reflète la balance entre deux classes d'interactions intermoléculaires:

La première est proportionnelle à la taille du soluté, et la seconde est associée aux groupes fonctionnels. Ainsi, la lipophilie peut être décomposée en deux contributions principales (Carrupt *et al.*, 1997) [51]:

$$\text{Lipophilie} = \text{Hydrophobie} - \text{Polarité}. \quad (\text{eq. 20})$$

Comme la détermination expérimentale de $\log P$ est souvent délicate, de nombreuses méthodes ont été développées pour prédire ce paramètre. Parmi celles-ci, les plus couramment utilisées sont celles qui sont basées sur l'additivité des contributions lipophiles de fragments moléculaires ou atomiques. Elles ne tiennent compte ni de l'aspect tridimensionnel des molécules ni de leur stéréochimie. Pour pallier ce défaut, d'autres techniques dites « Tridimensionnelles » ont été proposées.

Mesure du coefficient de partage (logP):

L'octanol est un solvant qui possède une polarité très similaire à celle des membranes lipidiques, c'est pourquoi il est utilisé pour évaluer le caractère lipophile d'une molécule, donc sa capacité à se bioaccumuler dans les organismes vivants.

II-1- Méthode du flacon agité :

La plus classique et la plus fiable des méthodes de détermination du logP est la méthode dite du "flacon agité" [52].

Cette méthode consiste à mélanger une quantité connue de soluté dans un volume connu d'octanol et d'eau, puis de mesurer la distribution du soluté dans chaque solvant. La méthode la plus courante pour mesurer cette distribution est la spectroscopie UV/Visible.

Cette méthode comporte des avantages :

- Méthode la plus précise, pour la gamme la plus large de solutés (neutres comme chargés)
- La structure chimique n'a pas besoin d'être connue avant de commencer la procédure.

Et des inconvénients :

- Le temps nécessaire (30 minutes par échantillon)
- L'octanol et l'eau doivent être pré-mélangés et équilibrés (cela prend au moins 24 heures)
- Il faut attendre la solubilisation complète
- Le rapport concentration/réponse UV/Visible doit être linéaire dans la gamme de concentrations du soluté (Loi de Beer-Lambert)

II- 2- Détermination par HPLC :

Une méthode plus rapide de détermination du logP utilise la chromatographie liquide haute performance (HPLC) [52]. Le logP d'un soluté peut être déterminé par corrélation entre son temps de rétention et celui de composés similaires avec un logP connu.

Cette méthode a l'avantage d'être rapide (5-20 minutes par échantillon), mais présente certains inconvénients :

- La structure chimique du soluté doit être connue avant de procéder à la détermination.
- Puisque le logP est habituellement déterminé par régression linéaire, on doit connaître le logP de plusieurs composés avec une structure similaire.
- Des classes de composés chimiques différentes ont des coefficients de corrélation différents, la comparaison entre les classes n'est pas valable.

Prédiction du coefficient de partage octanol/eau:

Cette propriété physico-chimique peut être mesurée, mais ces mesures sont généralement longues et coûteuses. Par conséquent, différentes méthodes de prédiction du logP ont été mises au point, et il existe un nombre important de logiciels de prédiction de cette propriété. Ceux-ci s'appuient aussi bien sur des méthodes de contribution de groupes (ACD/LogP[53], KOWWIN [46], CLOGP [45],...) que sur des régressions multilinéaires à partir de descripteurs (VLogP [54]) ou sur des réseaux de neurones (AUTOLogP[55]).

Dans les bases de données, on peut trouver près de 30 000 structures organiques dont les valeurs de logP expérimental sont disponibles, ce nombre est cependant négligeable comparé au nombre des structures pour lesquelles les données de log P sont fortement demandées. En effet, il y a un intérêt continu pour le développement de méthodes de calculs de log P à partir de la structure moléculaire.

La première méthode de calcul de logP a été développée par Hansch et Fujita (système π) [56]. Les imperfections relevées ont conduit Rekker à développer la première approche de contribution fragmentaire [57-60]. Puisque la définition de fragment peut être ambiguë, (Broto et al) [61], suivis par d'autres, ont développé des systèmes de calcul basés sur des contributions atomiques. Toutes les méthodes qui divisent les molécules en sous-structures, sont appelées approches de sous-structure. L'utilisation exclusive des sous-structures atomiques caractérise des méthodes de contribution d'atomes, tandis que l'utilisation additionnelle de plus grands groupes est typique pour des méthodes fragmentaires. L'addition des contributions des sous-structures conduit finalement à la valeur de logP.

En revanche, les approches basées sur la molécule entière emploient, les potentiels moléculaires de lipophilie (PML), les indices topologiques, ou les propriétés moléculaires pour quantifier log P.

Une classification des logiciels de calcul de logP les plus importants est rapportée dans le tableau 4. Les sources des programmes respectifs et leur accès à l'Internet sont énumérés dans le tableau 5.

Tableau 4: Classification des logiciels de calcul de logP.

Approches par Sous-Structure	Approches par Molécule-Entière
<i>Méthodes Fragmentals</i>	<i>Potentiels Moléculaires de Lipophilie (PML)</i>
CLOGP Cf-SYBYL AB/LogP ACD/LogP KOWWIN	CLIP HINT
	<i>Indices Topologiques</i>
	MLOGP AUTOLOGP
<i>Méthode des Contributions d'Atomes</i>	SciLogP
TSAR, MOLCAD	<i>Propriétés Moléculaires</i>
ALOGP XLOGP	BLOGP QLOGP

Tableau 5 : Adresses des différents logiciels de calcul de logP.

Logiciel	Fournisseur	Internet
AB/LogP	Advanced Pharma Algorithms	www.ap-algorithms.com
ABSOLV		www.sirius-analytical.com
ACD/LogP	Advanced Chemistry Development	www.acdkzbs.com
ALOGP98	Cerius-Z/MSI	www.msi.com
AUTOLOGP	J. Devillers	jde-ctis@imuginet.j
CLIP	B. Testa, P.-A. Carrupt	bernard.testa@ict.unil.ch
CLOGP	Daylight	www.daylight.com
	Biobyte	www.biobyte.com
HINT	Edusoft	eslc@uabiotech.com
Interactive Analysis (IA)		www.logp.com
KlogP	G. Klopman	www.multicase.com
KOWWIN	Syracuse Research Corporation	meylan@syrres.com
MOLCAD	Tripes	www.tripos.com
ProLogP	F. Darvas	www.cornpudnrg.com
ProPred		www.capec.kt.dtu.dk
QikProp		www.schrodinger.com
QLOGP	P. Buchwald, N. Bodor	buchwald@ufl.edu
QMPRPlus		www.simulations-plus.com
$\sum f$ FSYBYL	Tripes	www.tripos.com
SciLogP	SciVision	www.sciuision.com
SLIPPER		www.ipac.ac.m/qsar
SPARC		ibmlcLchem.uga.edu/sparc
TSAR	Oxford Molecular	www.oxmol.co.uk
XLOGP	L. Lai	lai@ipc.pku.edu.cn

III- 1- Méthodes fragmentales :

La lipophilie d'un composé peut être estimée par la somme de la lipophilie de ses fragments et de termes de corrections.

$$\log P = \sum_{i=1}^n a_i * f_i + \sum_{j=1}^m b_j * F_j \quad (\text{eq. 21})$$

où: f_i = constante de lipophilie du fragment f_i

a_i = nombre de fragments f_i

F_j = facteur de correction F_j

b_j = nombre de facteurs de correction F_j

Ces approches séparent les molécules en deux parties, l'une constituée par les atomes et l'autre par des groupes plus grands appelés fragments. Pourtant les molécules ne sont pas que des atomes et des fragments. Ainsi, les Méthodes fragmentales appliquent des règles de correction couplées par la connectivité moléculaire.

Puisque n'importe quelle méthode fragmentale a des avantages et des inconvénients, la fragmentation d'une molécule est peu arbitraire, ces méthodes peuvent définir les interactions électroniques des fragments géants. Ceci représente l'avantage principal de l'emploi des fragments. D'autre part, les méthodes fragmentales ne calculent pas les structures isomères et ne considèrent pas la flexibilité conformationnelle.

Approche CLOGP: Hansch et Leo [62-66] ont développé un système de fragmentation connu sous le nom de CLOGP [45], basé sur les principes du "constructionisme". Les valeurs des fragments de base ont été déduites à partir de données de $\log P$ mesurées, d'un petit ensemble de molécules simples telles que l'hydrogène et le méthane. Cette méthode a été adaptée la première fois pour l'usage informatique par Chou et Jurs [67] ; elle a été lancée sur le marché sous l'appellation CLOGP.

Approche LOGKowwin: La méthode de contribution d'atome/fragment', est présentée par Meylan et Howard [68]; elle est disponible dans logiciel appelé KOWWIN [46]. C'est une approche réduite déduite de l'analyse de régression. Le modèle est défini par l'eq (22).

$$\log P = 0.229 + \sum f_k \cdot N_k + \sum F_j \cdot N_j \quad (\text{eq 22})$$

N_k : est l'occurrence du fragment d'ordre i ou le type d'atome.

N_j : est l'occurrence du j ème facteur de correction.

$\sum f$: est un Système qui a été développé la première fois par le groupe de Rekker. Les valeurs logP expérimentales de composés organiques simples ont été employées pour déduire les valeurs fragmentaires pour analyse de régression. Le développement du système $\sum f$ a été développé en trois phases. La première période a conduit au calcul de 126 valeurs de fragments, la deuxième est une révision du système original, la troisième phase a été consacrée aux modèles plus complexes comportant des hydrocarbures aliphatiques.

Les constantes d'hydrophobie ont été évaluées avec une première analyse de régression sur 1120 composés, sans utilisation de facteurs de correction. La dernière analyse est déduite d'une régression linéaire sur d'autres composés (1231) en corrélant les valeurs de logP expérimentales et celles estimées par le premier modèle de régression. Le logiciel est amélioré par 144 valeurs d'atome/fragment et 235 facteurs de correction qui sont énumérés dans la version 1.54.

III-2- Méthodes De Contribution d'Atome

La plupart des méthodes de contribution d'atome fonctionnent sans facteurs de correction (Eq. 23). Où n_i : nombre d'atomes de type i ; a_i : contribution d'un atome de type i .

$$\log P = \sum n_i \cdot a_i \quad (\text{eq. 23})$$

Dans ces méthodes plusieurs améliorations ont été apportées, mais 2 problèmes restent posés: le premier concerne le grand nombre d'atomes nécessaires pour décrire un ensemble de molécules, le second a trait aux structures isomères ces méthodes ne prennent pas en charge la flexibilité de conformation.

Approche Ghose/Crippen: Le groupe de Crippen [69,72] a développé une " *procédure basée sur les contributions atomiques pure* " qui applique exclusivement les contributions d'atomes et évite les facteurs de correction (Eq. 24), où N_k est l'occurrence du k ème type d'atome).

$$\log P = \sum a_k \cdot N_k \quad (\text{eq. 24})$$

Le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote, le soufre, et les halogènes sont classés dans 110 types d'atome ; après plusieurs révisions, le nombre de classifications d'atome qui arrive jusqu'à 120 [69] est obtenu à partir d'un ensemble de calibration de 893 structures. L'hydrogène et les halogènes sont classés par l'état d'hybridation et d'oxydation du carbone

auquel ils sont liés ; les atomes de carbone sont classés selon leur état d'hybridation et la nature chimique des atomes voisins. La complexité de cette procédure de classification est certifiée par un total de 44 types de carbone. L'approche de Ghose/Crippen qui utilise largement la contribution d'atomes, a été utilisée par le logiciel qu'on a employé pour le calcul de l'hydrophilie notée ALOGP par les développeurs de ce logiciel.

III-3- Approches Molécule- Entière:

III-3-1 Méthodes MLP :

Les approches de Molécule- Entière utilisent les descriptions de la molécule entière, pour calculer log P. Ces modèles essaient d'éviter les imperfections des approches fragmentaires, telles que la simplification des effets stériques, et l'impossibilité de calculer logP des structures pour lesquelles les valeurs des fragments n'existent pas, ou le problème soulevé par le cas des isomères.

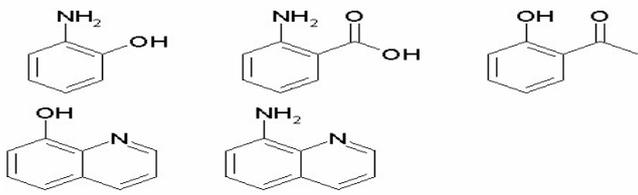
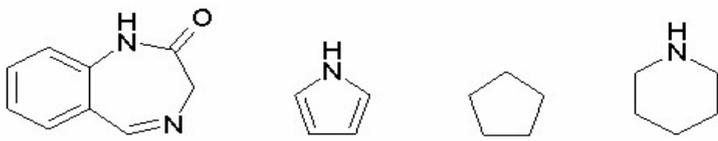
III-3-2 Base Topologique :

La topologie qui concerne les propriétés et les relations spatiales, est constante dans un changement de forme ou de taille. De plus la connectivité traite des liaisons entre les atomes. Si les molécules sont bien définies, les indices de connectivité moléculaires peuvent être déduits directement à partir de la structure moléculaire employée pour prédire logP.

MLOGP: Pour calculer logP par une "méthode simple" Moriguchi a employé une analyse de régression multiple d'un ensemble de 1230 molécules organiques comprenant, les composés aliphatiques, aromatiques, et hétérocycliques [73]. L'équation finale de régression, eq. (25) implique 13 paramètres y compris la somme des hydrophobies atomiques, la somme des hydrophilies atomiques, les effets de proximité, les liaisons insaturées, les propriétés amphotères, et les fonctions spéciales telles que la présence d'un azote quaternaire, le nombre de groupes nitro, ou un simulacre pour la présence de la p-lactame. Un coefficient de corrélation acceptable de 0.952 a été obtenu ; le logP des 1230 composés a été calculé avec un écart type de 0,411, $s = 0.422$ [44].

$$\begin{aligned} M\log P = & -1.041 + 1.244(\mathbf{CX})^{0.6} - 1.017(\mathbf{NO})^{0.9} + 0.406(\mathbf{PRX}) - 0.145(\mathbf{UB})^{0.8} + 0.511(\mathbf{HB}) \\ & + 0.268(\mathbf{POL}) - 2.215(\mathbf{AMP}) + 0.912(\mathbf{ALK}) - 0.392(\mathbf{RNG}) - 3.684(\mathbf{QN}) + 0.474(\mathbf{NO2}) + \\ & 1.582(\mathbf{NCS}) + 0.733(\mathbf{BLM}) \end{aligned} \quad (\text{eq. 25})$$

Tableau 6 : Signification des paramètres statistiques utilisés dans l'eq. (25).

Paramétrr	Type	Description
CX	N	La somme des poids des atomes de carbone et d'halogènes; les poids sont: 0.5 pour F, 1.0 pour C et Cl, 1.5 pour le Br, et 2.0 pour I.
NO	N	Nombre total de N et de O.
PRX	N	Effet de proximité de N/O: 2 pour X-Y et 1 pour X-a-y (X, Y :N et/ou O ;A :C, S, ou P ;- : Liaison saturée ou insaturée) avec une correction (-1) pour -CON< et -SO ₂ N<
UB	N	Nombre de liaisons insaturées comprenant les liaisons semi-polaires tels que des N-oxydes et des sulfoxydes, sauf dans NO ₂ .
HB	D	Variable factice pour la présence de liaisons hydrogène intramoléculaire comme l'ortho-OH et - CO-R, -OH et - NH ₂ , - NH ₂ et - COOH, ou 8-OH/NH ₂ pour les quinolines, 5 ou le 8-OH/NH ₂ pour les quinoxalines, etc...
		
POL	N	Nombre de substituants polaires aromatiques (substituants aromatiques à l'exclusion d'Ar-C(X)(Y) - et Ar-C(X)=C ;X, Y :C et/ou H).Limite supérieure = 4.
AMP	N	Propriété amphotère ; a-aminoacid = 1, acide aminobenzoïque = 0.5, acide pyridinecarboxylique = 0.5.
ALK	D	Variable factice pour l'alcane, l'alcène, le cycloalcane, ou le cycloalcene (hydrocarbures avec 0 ou 1 lien doubles).
RNG	D	Variable factice pour la présence de structures cycliques, sauf benzène et les structures heteroaromatique.
		
QN	N	Azote quaternaire > N< : 1 ;N-oxyde :0.5.
NO2	N	Nombre de groupes nitro.
NCS	N	Isothiocyanate (- N=C=S) :1.0 ;sulfocyanate (- S-C#N) :0.5.
BLM	D	Variable factice pour la présence de la . -lactame.

Interprétation du modèle

Action- Toxicité des phénols

1 Introduction

2 Mécanisme d'action