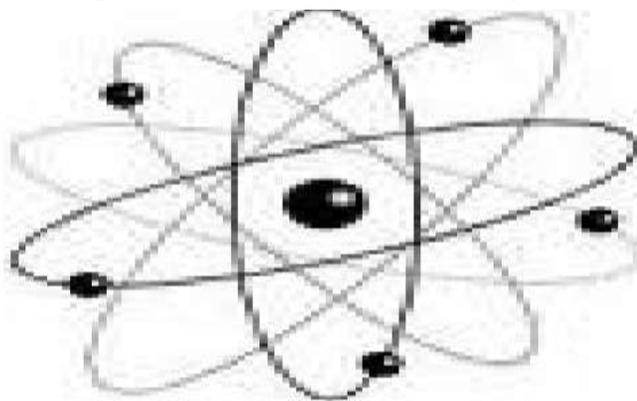




République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Med Khider Biskra  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie



Département des Sciences de la Matière  
Domaine : Sciences de la Matière  
Filière : Chimie  
Spécialité : Chimie Pharmaceutique



Mémoire de fin d'étude en Master  
Intitulé :

***Étude Par Docking Moléculaire Des Dérivés De  
Pyrazole Tétrasubstituée Comme Inhibiteurs De la  
Cycloxygénase-2***

*Présenté par :*

**GHAZA. KARIMA**

*Devant le jury :*

***Belaidi.Salah***

***Université Med Khider de Biskra***

***Président***

***Ouassaf.Moubareka***

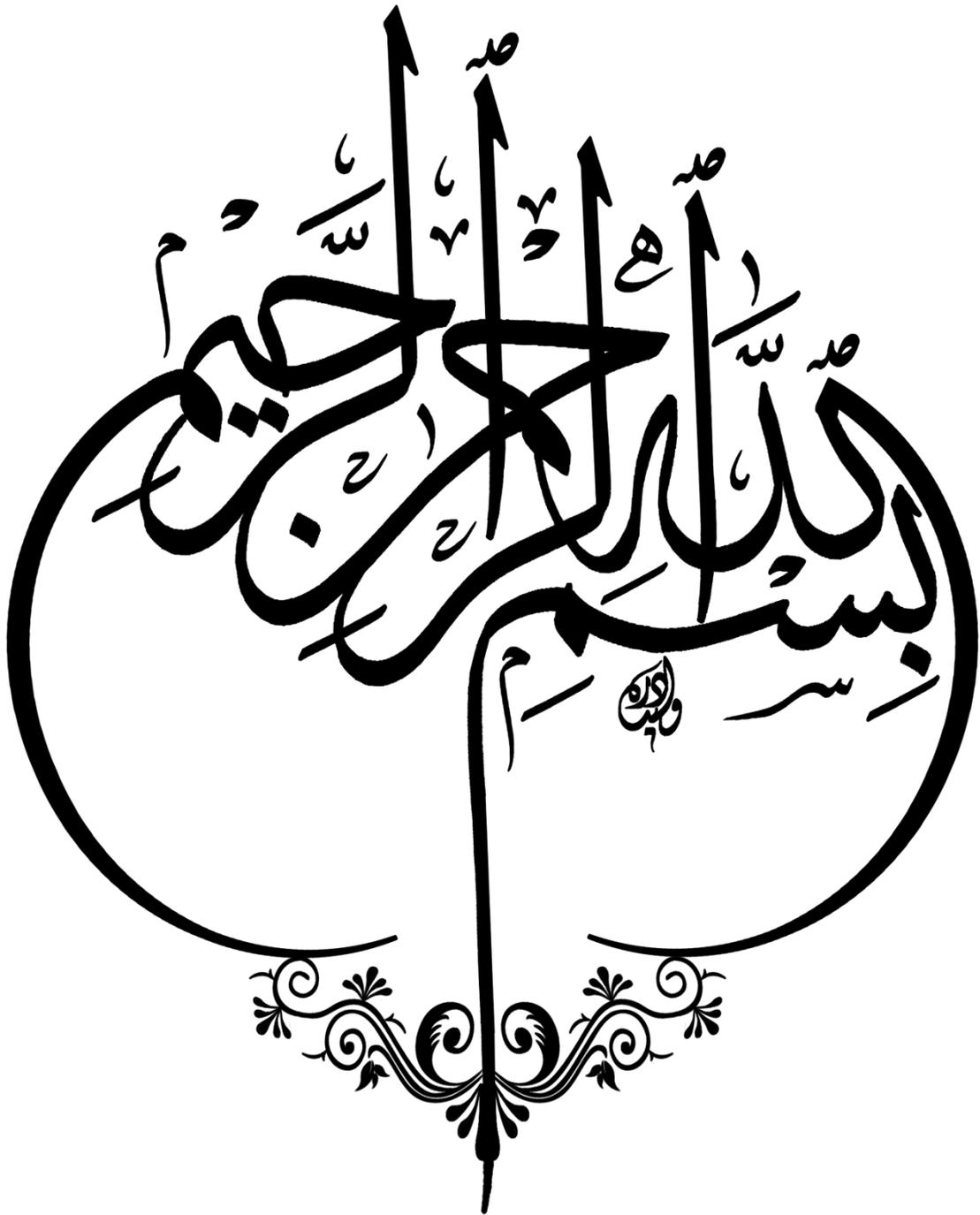
***Université Med Khider de Biskra***

***Rapporteur***

***Sellami.Mohamed***

***Université Med Khider de Biskra***

***Examineur***



# Dédicaces

♥ *A mon cher papa, qui m'a toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite*

♥ *A ma très chère maman, pour m'avoir toujours écoutée, pour son soutien moral et ses précieux conseils.*

♥ *A mon fidèle amie M. Bachir qui m'a encouragé, qui ma donnée la force et la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés.*

♥ *A tous mes sœurs (Soraya et Mouna).*

♥ *A tous mes frères (Younes, Haroun, Moustafa et le petit cher Ziyade).*

♥ *A tous mes enseignants durant les années des études.*

♥ *A ma famille, à mes amis, je dédie ce mémoire.*

# ***Remerciements***

*Au terme de ce travail, on tient à remercier en premier lieu à « ALLAH » le bon dieu, le Miséricordieux de nous avoir donné la force, Volonté, et la patience d'achever cette modeste étude.*

*Nous tenons tout d'abord à adresser nos profonds remerciements et gratitude à notre encadreur Madame **Ouassaf Mebarka** Maitre-assistant à l'université Mohamed Khidher, pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'orientation, la confiance, la patience et le temps qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*Nous tenons à remercier les membres de jury qui ont bien voulu nous faire l'honneur de participer à ce jury.*

*Nous remercie également tous les enseignants du département science de la matière pour leur contribution à cette formation.*

*Nous remercions enfin tous ceux ou celles qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités ici.*

## Liste des abréviations

**DMF** : Diméthyle formamide.

**MO** : Micro-ondes

**TA** : Température

**Bn** : Benzenyl

**US** : Ultrasons

$\Delta$  : Chauffage classique

**AINS** : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

**COX-1** : Cyclooxygénase-1

**COX-2** : Cyclooxygénase-2

**DFG** : Débit de Filtration Glomérulaire

**IEC**: Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion

**IL-1 $\beta$** : Interleukine-1 Bêta

**IL-6**: Interleukine-6

**INR**: International Normalise Ratio

**ClogP**: logarithme du rapport des concentrations d'une substance dans l'octanol et dans l'eau.

**PGHS**: prostaglandine endoperoxyde H synthétase

**PGs**: prostaglandines

**AA**: acide arachidonique

**PGG<sub>2</sub>**, **PGH<sub>2</sub>**: prostaglandine G<sub>2</sub>, prostaglandine H<sub>2</sub>

**RMN**: résonance magnétique nucléaire

**THF**: tétrahydrofuranne

**TXA<sub>2</sub>**: thromboxane A

**Amber**: Assisted Model Building with Energy Refinement ff03.r1: parm99.dat + frcmod.ff03 +frcmod.ionsjc\_tip3p.

**DM:** Dynamique moléculaire.

**DSK:** Dyskinésies.

**MAO:** Monoamine oxydase.

**MAO-A:** Monoamine oxydase-A.

**MAO-B:** Monoamine oxydase-B.

**MDV:** Molegro Virtual Docker.

**MM :** Mécanique moléculaire.

## Liste des Figures

<b>Chapitre I : Généralité</b>	
<b>Figure. I. 1. Structure moléculaire du pyrazole.....</b>	<b>5</b>
<b>Figure. I. 2. Viagra .....</b>	<b>6</b>
<b>Figure. I. 3. Synthèse de dérivés de pyrazole.....</b>	<b>8</b>
<b>Figure. I. 4. Pyrazolo [3,4-d] pyridazine.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure. I. 5. La structure de plusieurs molécules biologiquement actives...</b>	<b>13</b>
<b>Figure. I. 6. Structure de Cyclooxygénase-2.....</b>	<b>14</b>
Figure. I. 7. Localisation du gène de la cyclooxygénase-2 (PTGS2) sur le brin long du chromosome 1 à partir de la première bande de la troisième région q31.1.....	15
<b>Figure. I.8. Structure de Cyclooxygénase-2.....</b>	<b>16</b>
<b>Figure. I. 9. Site actif de la COX-2.....</b>	<b>17</b>
<b>Figure. I. 10. Mécanisme de l'activité COX.....</b>	<b>19</b>
<b>Figure. I. 11. Mécanismes possibles impliquant COX2 dans le développement tumoral.....</b>	<b>20</b>
<b>Figure. I. 12. Cascade de l'acide arachidonique.....</b>	<b>21</b>
<b>Figure. I. 13. Classification des inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase</b>	<b>23</b>

<b>Chapitre II : Les methodes de modélisation des interactions protéine-ligand.</b>	
<b>Figure. II. 1. Mécanique moléculaire.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure. II. 2. Représentation schématique du principe d'une minimisation d'énergie « statique».....</b>	<b>30</b>
<b>Figure. II. 3. Evolution du nombre de structures protéiques disponibles dans la PDB .....</b>	<b>32</b>
<b>Figure. II. 4. Nombre de structures protéiques par intervalle de résolution donné.....</b>	<b>33</b>
<b>Figure. II. 5. Interactions de Van Der .....</b>	<b>34</b>
<b>Figure. II. 6. Ponts hydrogène.....</b>	<b>35</b>
<b>Figure. II. 7. Interaction électrostatiques.....</b>	<b>35</b>
<b>Figure. II.8. Principe général d'un programme de docking.....</b>	<b>36</b>
<b>Figure. II.9. Protocole général de docking.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre III : Etude pratique.</b>	
<b>Figure. III. 1. Protocole de calcul.....</b>	<b>43</b>
<b>Figure. III. 2. Enzyme de la cyclooxygénase .....</b>	<b>44</b>
<b>Figure. III. 3. General structure de pyrazole tétrasubstituée.....</b>	<b>44</b>
<b>Figure. III .4. Interface graphique des cavités 3 par MolDock.....</b>	<b>48</b>
<b>Figure. III. 5. Les résidus essentiels constituant les sites actifs de COX-2...</b>	<b>48</b>
<b>Figure. III. 6. Interaction entre les ligands et les résidus du site actif de la cavité 1.....</b>	<b>51</b>
<b>Figure III.7 : Résultats de LigPlot + montrant les interactions des 5 composés et VIOXX avec 5KIR. ....</b>	<b>54</b>

## Liste des tableaux.

<b>Chapitre I : Généralité</b>	
<b>Tableau I .1 : Les propriétés de Cyclooxygénase-2 .....</b>	14
<b>Tableau I .2 : Rôle La Cyclooxygénase-2.....</b>	18
<b>Chapitre III : Etude pratique</b>	
<b>Tableau III.1 : Structure des composés de la série bioactive.....</b>	45
<b>Tableau III.2 : Volume et surface des 5 cavités détectées.....</b>	47
<b>Tableau III.3 : Résultats de docking moléculaire des ligands avec la cavité 3 de COX-2.....</b>	50
<b>Tableau III.4 : Distance (stérique et Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes des ligands L9, L10, L14, L22 et L2.....</b>	57
<b>Tableau III.5: les paramètres de Lipinski des dérivés de pyrazole .....</b>	60
<b>Tableau III.6:L'ADMET profile des ligands de test et ligand référence...</b>	63

# SOMMAIRE

Remerciement.

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction générale 2

## Etude bibliographique

### Chapitre I : Généralités

I.1. Introduction..... 5

I. 2. le noyau pyrazole ..... 5

I. 3. Synthèse des pyrazole..... 6

I. 3. 1. Synthèse de pyrazoles à partir d'époxydes..... 6

I. 3.2. Synthèse des pyrazoles par la méthode monotope..... 6

I. 3.3. Synthèse des nouveaux 1, 3 ,5-triazine-pyrazoles..... 6

I. 3. 4. Synthèse des dérivés pyrazoliques à partir du  
Triflorométhylénamine avec les hydrazines monosubstituées ..... 7

I. 3.5. Réaction non conventionnelle ..... 7

I .3.5.1. Cycloaddition de la sydnone avec les alcynes sous irradiation  
micro-ondes..... 7

I. 3.6. Synthèse des pyrazoles à partir de diazocomposés..... 7

I. 3.7. Synthèse de formylpyrazoles ..... 7

---

<b>I .3.8. Synthèse de carboxaldehyde pyrazole .....</b>	<b>8</b>
<b>I .3.9. Synthèse de pyrazoles substitués .....</b>	<b>8</b>
<b>I .3.10. Synthèse de dérivés de pyrazoles .....</b>	<b>8</b>
<b>I .4. Intérêts biologiques des pyrazoles.....</b>	<b>11</b>
<b>I .5. La Cyclooxygénase-2 (COX-2) .....</b>	<b>14</b>
<b>I .5.1. Définition.....</b>	<b>14</b>
<b>I .5.2. Le gène .....</b>	<b>15</b>
<b>I .5.3. Structure .....</b>	<b>15</b>
<b>I .5.4. Site actif de la COX-2.....</b>	<b>16</b>
<b>I .5.5. Rôle de la Cyclooxygénase-2 .....</b>	<b>17</b>
<b>I .5.6. Mécanismes l'activité de COX-2 .....</b>	<b>18</b>
<b>I .5.7. Fonction de la cyclooxygénase.....</b>	<b>20</b>
<b>I .5.8. La COX-2 et l'inflammation.....</b>	<b>22</b>
<b>I .5.9. Les inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase-2 .....</b>	<b>22</b>
<b>Chapitre II : LES méthodes de modélisation des interactions protéine-</b>	
<b>ligand</b>	
<b>II .1. Méthodes de modélisation moléculaire .....</b>	<b>25</b>
<b>II .1.1. Introduction .....</b>	<b>25</b>
<b>II .1.2. La mécanique moléculaire.....</b>	<b>26</b>
<b>II .1.2.1. Principes théoriques.....</b>	<b>26</b>

---

<b>II .1.2.2. Modélisation par champs de force .....</b>	<b>27</b>
<b>II .1.3. Les simulations de dynamique moléculaire .....</b>	<b>28</b>
<b>II .1.3.1. Principes théoriques .....</b>	<b>28</b>
<b>II .1.3.2. Calcul de dynamique moléculaire.....</b>	<b>29</b>
<b>II .1.4. Minimisation d'énergie (optimisation de géométrie) .....</b>	<b>29</b>
<b>II .2. Technique basée sur la structure de la protéine.....</b>	<b>30</b>
<b>II .3. L'évolution des structures des protéines .....</b>	<b>31</b>
<b>a) La résolution.....</b>	<b>32</b>
<b>b) Le facteur R.....</b>	<b>33</b>
<b>c) Choix d'une structure cristallographique.....</b>	<b>33</b>
<b>d) Facteur d'agitation thermique.....</b>	<b>33</b>
<b>e) Détermination du site actif.....</b>	<b>34</b>
<b>II .4. Interaction protéine-ligand .....</b>	<b>34</b>
<b>II .4.1. Intéractions de Van Der Waals .....</b>	<b>34</b>
<b>II .4.2. Ponts hydrogène .....</b>	<b>35</b>
<b>II .4.3. Interactions électrostatiques .....</b>	<b>35</b>
<b>II .5. Principes théoriques de docking moléculaire.....</b>	<b>35</b>
<b>II .6. Algorithmes de docking.....</b>	<b>36</b>
<b>II .7. Choix de logiciel de MolDock (MVD).....</b>	<b>37</b>
<b>II .8. Protocole général de docking.....</b>	<b>38</b>

---

<b>II .9. ADME .....</b>	<b>39</b>
--------------------------	-----------

### **Chapitre III: Etude pratique**

<b>III .1. Introduction .....</b>	<b>42</b>
-----------------------------------	-----------

<b>III .2. Préparation de l'enzyme .....</b>	<b>43</b>
--	-----------

<b>III .3. Préparation des ligands.....</b>	<b>44</b>
---	-----------

<b>III .4. Détection des cavités.....</b>	<b>47</b>
---	-----------

<b>III .5. Etude de docking moléculaire .....</b>	<b>49</b>
---	-----------

<b>III .6. Résultats du Docking moléculaire .....</b>	<b>49</b>
---	-----------

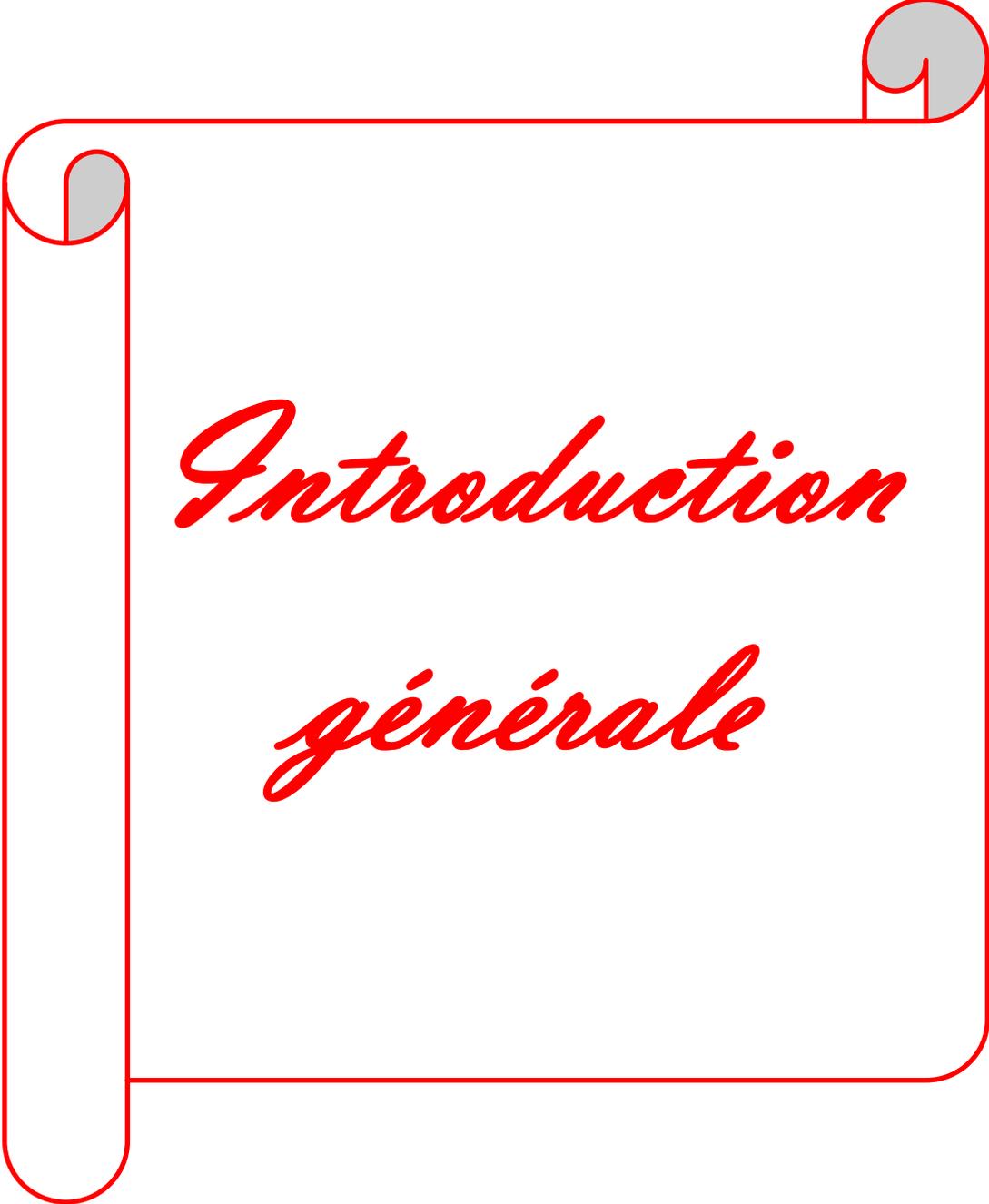
<b>III .7. Les règles de Lipinski.....</b>	<b>59</b>
--	-----------

<b>III .7.1. Interprétation .....</b>	<b>60</b>
---------------------------------------	-----------

<b>III .8. Admet (absorption, distribution, métabolisme, élimination et toxicité) .....</b>	<b>61</b>
---	-----------

<b>Conclusion générale.....</b>	<b>65</b>
---------------------------------	-----------

<b>Références.....</b>	<b>68</b>
------------------------	-----------



*Introduction  
générale*

## *Introduction générale*

L'inflammation est une réaction normale de l'organisme en réponse à un traumatisme biologique, physique ou chimique entraînant une altération de certaines cellules. Cette réaction se manifeste cliniquement par une rougeur, un œdème et une douleur.

Les AINS regroupent les molécules inhibant la synthèse des prostanoïdes par une inhibition plus ou moins sélective de l'activité des cyclooxygénases. Il existe dans l'organisme de types d'enzymes cyclooxygénases : COX-1 et COX-2.

La COX-2 est à l'origine de la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation et son inhibition est donc intéressante pour bloquer le processus inflammatoire. [1]

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques.

Les détails de ces interactions, au niveau moléculaire, sont donc d'un très grand intérêt et peuvent être étudiés par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN). Malheureusement, ces techniques ne permettent pas de détailler la totalité de ces interactions étant donné le nombre incalculable de molécules différentes au sein d'une seule cellule.

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales mentionnées ci-dessus. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont des petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée. [2]

L'avantage majeur de ces méthodes est d'aider à la prédiction des molécules en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser les composés (lorsque ceux-ci proviennent des chimiothèques commerciales). Le criblage virtuel s'apparente à une succession de techniques dont le point de départ est le filtrage des chimiothèques à cribler. Souvent, la sélection des composés suit des règles spécifiques aux médicaments déjà connus et mis sur le marché (règles «drug-like»). Par exemple, la règle de Lipinski ou encore «règle des 5» peut être utilisée pour la sélection de composé « drug-like ».

Des adaptations peuvent être faites afin de rendre la «règle des 5» plus stricte. C'est la notion de «lead-like». [3]

Les composés respectant les critères «lead-like» ne sont pas pour autant certains de devenir des médicaments. En effet, beaucoup de molécules actives sont abandonnées du fait qu'elles possèdent une pharmacocinétique en dehors des normes.

## *Introduction générale*

Afin d'évaluer le métabolisme d'une molécule, des méthodes de prédiction in silico basées sur la modélisation des cytochromes P450 ont vu le jour. De manière plus générale, l'ADME-Tox (Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination - Toxicité) des médicaments est un facteur à prendre en compte dans l'optimisation de candidats prometteurs [4]

Dans ce contexte que se situe notre travail qui a pour objectif de déterminer l'interaction de COX-2, enzyme impliquée dans l'inflammation avec une série des dérivés de pyrazole afin d'établir une relation entre ces molécules et leur éventuel pouvoir inhibiteur sur la cyclooxygénase-2.

Le présent mémoire comporte trois parties :

Le premier chapitre est présenté sous forme d'une revue bibliographique consacrée le noyau pyrazole leur structure, leur classification et leurs propriétés biologiques. et la description de cyclooxygénase (COX-2). Il sera question de la régulation, rôle, localisation tissulaire.

La deuxième partie. Nous nous intéressons à l'apport de la modélisation moléculaire dans l'étude des interactions protéine ligand et nous consacrerons à la présentation du divers aspect du Docking moléculaire.

Nous présentons, dans le troisième chapitre, les différents matériels et méthodes utilisés dans cette étude. Enfin nous exposons l'essentiel de nos résultats et une discussion.



# Chapitre I : Généralité

## I.1. Introduction :

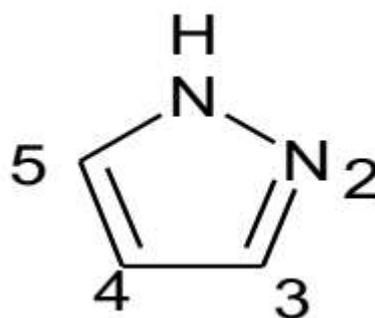
Pyrazole réfère à la classe des composés organiques à cycle aromatique simple, caractérisés par une structure d'un cycle à 5-membre dont trois atomes de carbone et deux atomes d'azote dans des positions adjacentes. Vue leur composition et ayant des effets pharmacologiques sur l'être humain, ils sont classés comme des alcaloïdes, même qu'ils sont rares dans la nature. En 1959, le premier pyrazole, 1-pyrazolyl-alanine, a été isolé à partir des grains du watermelons [5]

## I.2. Le noyau pyrazole :

Le noyau pyrazole ou 1,2-diazole et un isomère structural de l'imidazole [6].

Le nom pyrazole provient du noyau pyrrole auquel on a ajouté un atome d'azote (azole) (Figure. I. 1.).

Les deux atomes d'azote possèdent des propriétés différentes ; l'un se comportant comme celui de la pyridine peut subir une protonation en milieux acide ou de réaction avec des électrophiles, le deuxième atome d'azote possède la propriété de l'azote du pyrrole, le doublet participant au système conjugué du cycle. En nomenclature systématique, les pyrazole appartiennent à la famille de 1,2-diazole. Le pyrazole est un hétérocycle aromatique plan  $\pi$ -exédentaire. Les réactions de substitutions électrophiles se font préférentiellement en position 4 et les attaques en position 3 et 5.



**Figure. I. 1.** Structure moléculaire du pyrazole.

Les pyrazoles diversement substitués par des groupements aromatiques et hétéroaromatiques possèdent des nombreuses activités biologiques, ce qui les rend particulièrement intéressants. Les différentes vois d'accès au noyau pyrazole ont subi de

nombreuses modification depuis les premières synthèses décrites par Knorr, Pechmann et Huisgen [7, 8,9]

### I.3. Synthèse des pyrazoles :

Le cycle pyrazole constitue une structure de base dans un grand nombre d'agents pharmaceutiques ayant des propriétés anti-inflammatoires et anti -microbiennes. Le Viagra [10] est l'un des exemples le plus connu (Figure. I. 2).

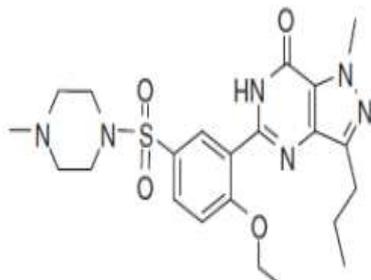


Figure. I. 2. Le Viagra

Plusieurs méthodes de synthèse sont connues [11]. Dans cette étude nous exposons quelques procédés.

#### I.3.1. Synthèse de pyrazoles à partir d'époxydes :

LeBlanc et coll. [12], ont synthétisé des pyrazoles à partir d'intermédiaires époxydes obtenus par traitement des chalcones avec l'eau oxygénée dans le méthanol à température ambiante. Ainsi, la réaction des époxydes obtenus avec l'hydrazine hydratée en présence de l'acide p-toluensulfonique au reflux du xylène conduit aux pyrazoles.

(Figure. I. 3)

#### I.3.2. Synthèse des pyrazoles par la méthode monotope :

La méthode monotope a été très utilisée en synthèse organique durant cette dernière décennie [13]. Natarajan et coll. [14] ont synthétisé des pyrazoles à partir de 1,3-dicétones qui sont préparées in situ par addition d'un organolithium avec un chlorure d'acide (Figure. I. 3). Ainsi des pyrazoles sont obtenus avec un bon rendement par addition d'hydrazines diversement substituées.

#### I.3.3. Synthèse des nouveaux 1,3,5-triazine-pyrazoles :

Mikhailichenko et coll. [15] ont étudié la réaction du méthylène dicarbonyle avec 4,6-disubstitué -2-hydrazinyl-1,3,5-triazine **08**, obtenu par réaction de l'hydrazine sur les composés **09**(Figure. I. 3), afin d'obtenir des systèmes aromatiques bihétérocycliques

potentiellement actifs. Les conditions de réaction ont été étudiées et optimisées. Ainsi, une série de 4,6-disubstitué 2-(1H-pyrazolyl) - 1, 3,5-triazines a été obtenue avec de bons rendements.

### I.3.4. Synthèse des dérivés pyrazoliques à partir du

#### Trifluorométhylénaminone avec les hydrazines monosubstituées :

En principe, la réaction d'hétérocyclisation entre l'énaminone et les hydrazines monosubstituées se fait selon la réaction addition / élimination de Michaël sur le carbone  $\beta$  de l'énaminocétone, suivie d'une réaction de cyclodéshydratation qui donne un mélange de pyrazole. (Figure. I.3)

Aline Touzot et Coll [16], ont étudié cette réaction, ils ont conclu que le Trifluorométhylénaminone est une énamincétone efficace pour la synthèse des pyrazoles fluorés. La réaction est plus régiosélective avec la phénylhydrazine qu'avec la méthylhydrazine. (Figure. I. 3)

### I.3.5. Réaction non conventionnelle :

#### I.3.5.1. Cycloaddition de la sydnone avec les alcynes sous irradiation micro-ondes:

Foster et coll [17], ont étudié la synthèse des pyrazoles azines substituées, par la stratégie de cycloaddition de sydnone **18** avec des alcynes terminaux sous activation micro-ondes à 200°C (Figure. I. 3). Les pyrazoles sont obtenus avec de bons rendements et la réaction s'avère peu régiosélective. Les mêmes résultats sont observés par chauffage classique.

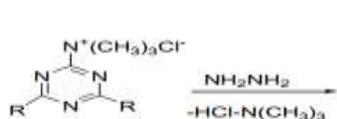
### I.3.6. Synthèse des pyrazoles à partir de diazocomposés :

La réaction des diazocomposés sur des alcynes, constitue une voie directe d'obtention des pyrazoles par réaction de cycloaddition 1, 3-dipolaire [18]. Au laboratoire, [19] la synthèse des pyrazoles à partir d'acétylènedicarboxylate de diméthyle (ACDM) et le diazoacétate d'éthyle sous activation micro-ondes et en présence d'argile échangée au cuivre a été réalisée. Supurgibekov et Coll [20], ont étudié la 1,5-électrocyclisation de vinyl diazocomposés **27** pour former des pyrazoles (Figure. I. 9). Il faut signaler que si des fonctions (CO 2Alk, CN<sub>2</sub>) sont dans la position Cis par rapport à la double liaison dans le composé diazocarbonylé, la réaction ne conduit pas à une 1,5-électrocyclisation mais conduit au pyridazine **37** selon la réaction de straudinger-diaza-wittig. (Figure. I. 3)

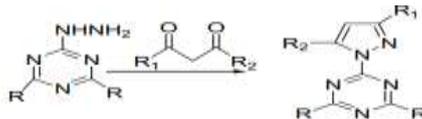
### I.3.7. Synthèse de formylpyrazoles :

Plusieurs méthodes de synthèse sont décrites dans la littérature pour la préparation des pyrazoles. Parmi ces travaux, on cite celui de Kira et al. Qui ont reporté la réaction de vilsemier-haack sur l'acetophenone/acetonehydrazones **30** qui a conduit aux formylpyrazoles





08

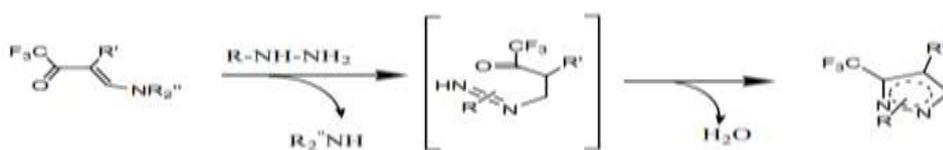


09

10



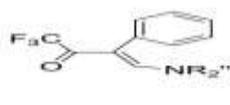
11



12

13

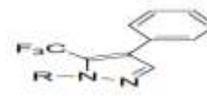
14



15

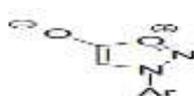


16

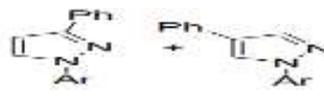


17

(1)



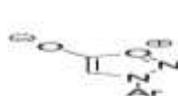
18



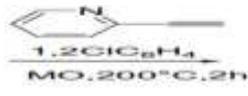
19

20

(2)



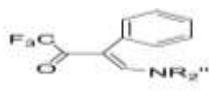
21



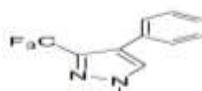
22

23

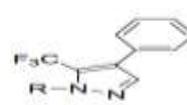
(03)



24



25



26

Figure. I. 3. Synthèse des dérivés de pyrazoles (suivant)

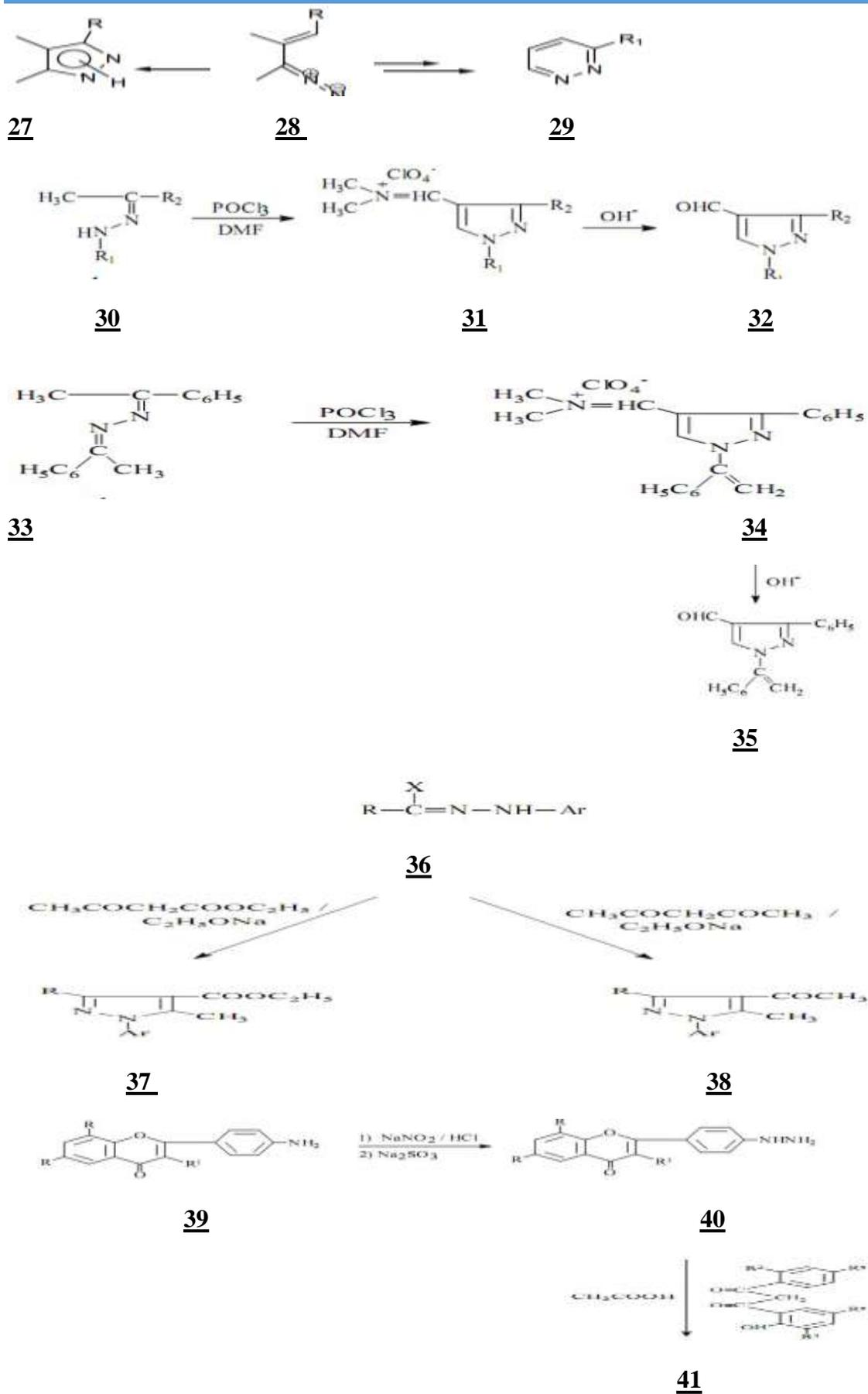
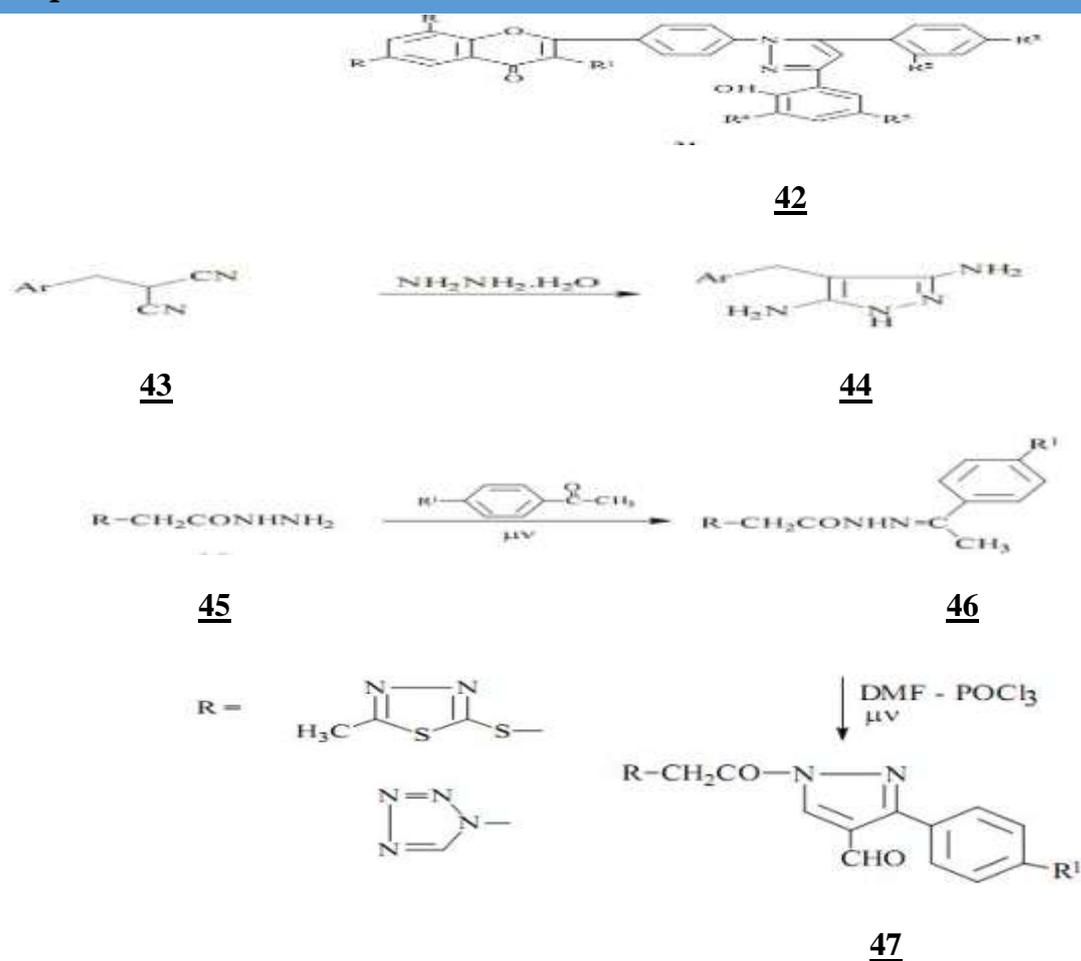


Figure. I. 3. Synthèse des dérivés de pyrazoles (suivant).



**Figure. I. 3.** Synthèse des dérivés de pyrazoles

#### I.4. Intérêts biologiques des pyrazoles:

Les dérivés de pyrazole ont un large éventail des activités biologiques en tant qu'anti inflammatoire [27], antidépresseur[28], contre le rhumatisme articulaire[29], antibactérienne[30], anticonvulsant [31] et leur utilisation comme herbicides[32], fongicides[33], pesticides[34], insecticides [28]et colorants. [35]

Les pyrazoles se trouvent dans la structure de plusieurs molécules biologiquement actives comme l'Allopurinol qui est utilisé dans le traitement de maladies liées aux articulations comme la goutte, l'Allopurinol inhibe l'enzyme Xanthine oxydase (XO) qui transforme l'Hypo xanthine et la Xanthine en acide urique (Figure. I.5), il possède également une activité anticancéreuse et antibactérienne. [36]

Les pyrazolynones et pyrazolidine-3,5-diones sont des dérivés largement utilisés dans le domaine pharmaceutique. La Phénazone, par exemple, est un antipyrétique utilisé dans le

traitement de rhumatismes et contre la fièvre, alors que la Phénylbutazone est un agent antiphlogistique utilisée contre les maladies inflammatoires. [27]

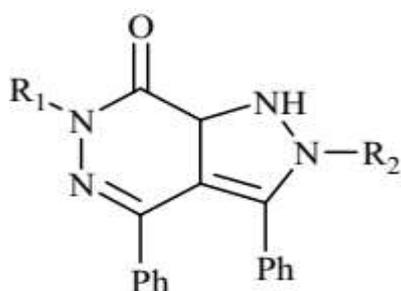
Parmi les inhibiteurs COX-2 déjà lancés sur le marché le **Celecoxib** (Figure. I.5) occupe une position unique en tant qu'agent anti-inflammatoire efficace. [37]

D'une autre part, beaucoup d'attention a été focalisée vers les pyrazoles comme anti microbiennes [38], [39], agents antivirale [40] et anticancéreux [41], après la découverte de **Pyrazofurin** (Figure. I. 5). Cet antibiotique qui possède une activité antimicrobienne et antivirale en plus d'être actif contre plusieurs variétés de cellule tumorale. [42]

Le composé ci-dessous a montré une activité antifongique significative in vitro, contre *C. albicans* et *C. neoformans*. Ainsi qu'une activité antibactérienne marquée contre *K. pneumoniae* et *Escherichia coli*. Plusieurs recherches sont entretenues sur ce produit et tous ses dérivés. [43]

Le **Fipronil** (Figure. I. 5) est un insecticide très actif [44], qui vise le récepteur de l'acide aminobutyrique (GABA), il est employé comme pesticide sur des parasites d'une grande variété de récolte vivrière [45]. Dans des applications non agricoles, le Fipronil est employé pour contrôler les parasites vétérinaires [46]. Des inquiétudes pour des effets secondaires du Fipronil sur la santé publique ont été soulevées en raison d'éventail utilisations de ce pesticide.

Plusieurs nouveaux dérivés de la pyrazolo [3,4-d] pyridazine ont été préparés, ces composés ont été examinés pour leurs activités antimicrobiennes contre les bactéries et les mycètes à gram négatif et à gram positif. Les composés **48** et **49** (Figure. I. 4) ont montré une activité sélective et efficace contre deux bactéries gram positif (*cierge atcc 7064* de B., et *s.doré Atcc 6538*), et une bactérie à gram négatif (*putida atcc 12633* de P.) [47].



**48:** R1 = C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> (2, 5); R2 = Pyr.

**49:** R1 = C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub> (2, 4, 6); R2 = CH<sub>3</sub>.

**Figure. I. 4.** Pyrazolo [3, 4-d] pyridazine.

A la recherche des inhibiteurs pour le **CDK** (cyclin-dependent kinase) et **GSK-3** (glycogène synthèse kinase-3), de nouveaux pyrazolo [3,4-*b*] quinoxalines ont été identifiés comme inhibiteurs secondaires micro-molaires de CDK/cyclinB. Une étude préliminaire du

rapport structure-activité a montré leurs activités antiproliférative, spécialement pour le composé 3-amino-pyrazolo [3,4-*b*] quinoxaline (Figure. I. 5) qui a été testé contre les kinases CDK5/p25 et GSK-3 du cerveau. [48]

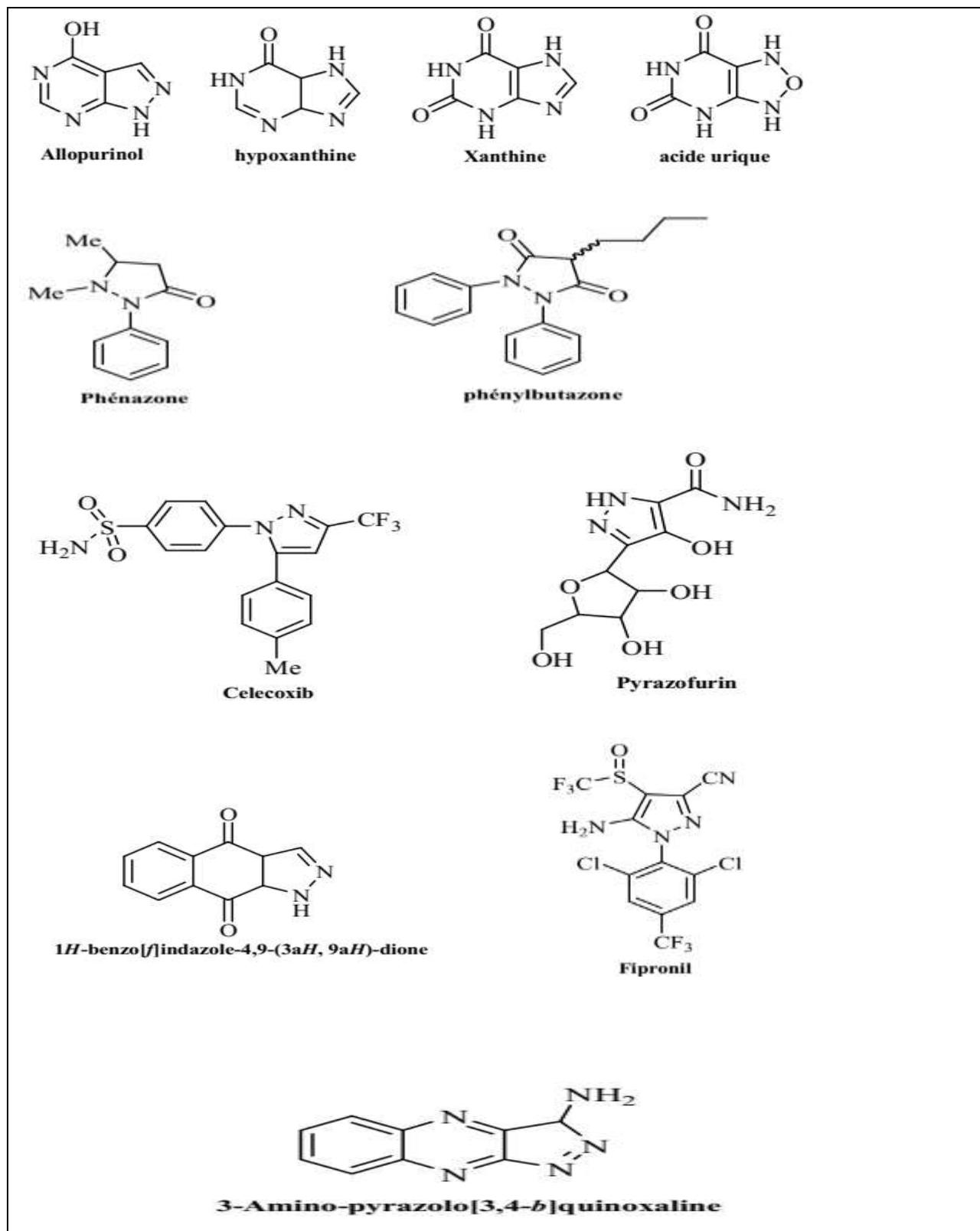
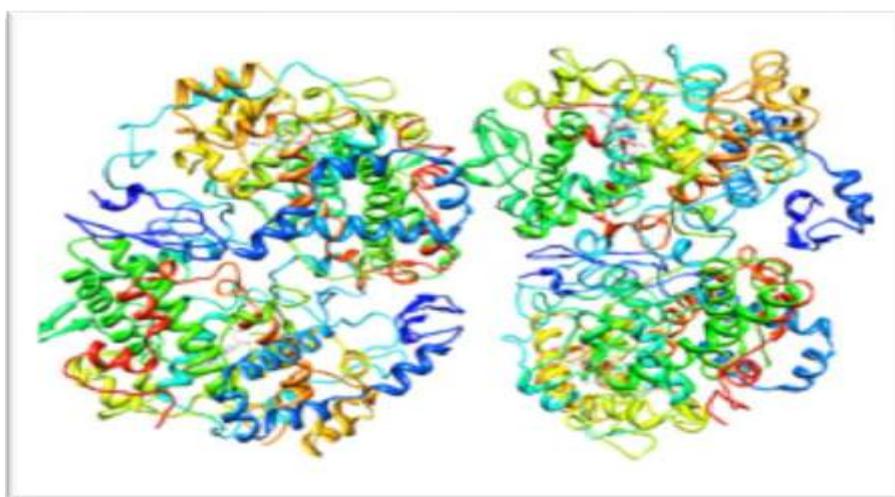


Figure. I. 5. La structure de plusieurs molécules biologiquement actives.

## I.5. La Cyclooxygénase-2 (COX-2) :

### I.5.1. Définition :

Elle a été découverte en 1991. La COX-2 humaine est composée de 581 acides aminés (74 Kilo daltons) dont la séquence est homologue à 60% environ à celle de la COX-1. Codée par un gène qui se situe sur le chromosome 1, la COX-2 est une enzyme principalement inductible (Figure. I. 6). Cependant, elle est constitutivement exprimée dans certains tissus tels que le cerveau et le rein [49]



**Figure. I. 6.** Structure de Cyclooxygénase-2. [50]

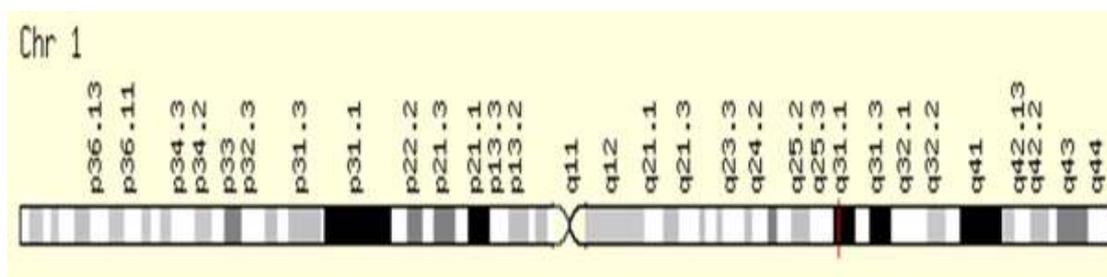
**Tableau I.1 :** Les propriétés de Cyclooxygénase-2 [51]

	<b>COX-2</b>
<b>Similitude structurelle</b>	Seulement 60% d'homologie dans la séquence d'acides aminés ( COX-2 sont codées par des gènes différents).
<b>Régulation</b>	Formation induite lors d'inflammation (synthèse multipliée par 10 à 80 en cas de simulation appropriée : inflammation, hormones)

<b>Localisation tissulaire</b>	Présente physiologiquement dans la prostate, l'utérus, les testicules et les poumons. Présente dans tous les tissus après induction
<b>Fonction de l'enzyme</b>	Activée par une inflammation qu'elle aggrave par la production de prostaglandines proinflammatoires. Toutefois, rôle physiologique non négligeable pour le maintien de diverses fonctions vitales.
<b>Nom du gène</b>	PTGS2
<b>Localisation du gène</b>	Chr.1 (1q31.1)
<b>Poids moléculaire</b>	72kDa
<b>Nombre d'acide aminé</b>	604

### I.5.2. Le gène :

Le gène de la cyclooxygénase 2 est situé sur le chromosome 1 (1q31.1) (Figure. I. 7), et se compose de 10 exons et de 9 introns [52]. Ce gène est inductible, avec un promoteur contenant une zone TATA et des zones de fixation pour des régulateurs transcriptionnels comme le NF-KB, le NF-IL-6 et la protéine de liaison pour la réponse à l'AMP cyclique. [53]



**Figure. I. 7.** Localisation du gène de la cyclooxygénase-2 (PTGS2) sur le brin long du chromosome 1 à partir de la première bande de la troisième région q31.1 [54]

### I.5.3. Structure :

La COX-2 (Figure. I.8.) a une masse de 72 kDa environ et l'ARN messager fait 4,5 kb

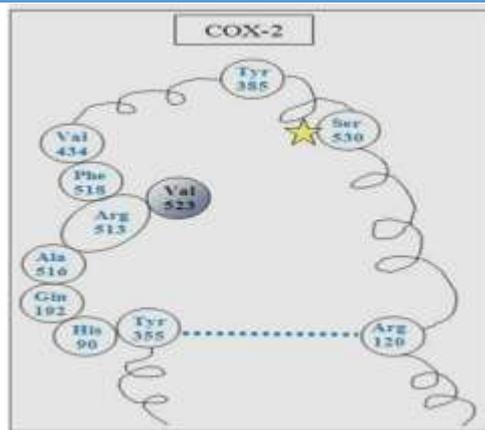


Figure. I.8. Structure de Cyclooxygénase-2 [55]

Après la traduction de ce dernier, l'enzyme se retrouve dans la membrane du réticulum endoplasmique et dans les feuillettes internes et externes de l'enveloppe nucléaire des monocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Cependant, COX-2 préfère se localiser dans l'enveloppe nucléaire où son activité est plus importante [56]

La structure tertiaire peut être divisée en trois parties distinctes :

- les résidus 34 à 72 forment un domaine compact contenant trois ponts disulfures internes. Ce domaine est lié à la partie principale de l'enzyme par un autre pont disulfure. Sa conformation est très proche de celle de l'EGF (Epidermal Growth Factor).
- les résidus 73 à 116 correspondent à une spirale d'hélices  $\alpha$  : A, B, C et D. Ces hélices amphiphiles forment le motif de liaison de l'enzyme à la membrane cellulaire.
- L'hélice D du motif de liaison fait la transition avec la troisième partie de l'enzyme. Il s'agit du domaine catalytique représenté par les résidus 117 à 587. Ce domaine catalytique est une structure globulaire contenant les sites actifs de cyclooxygénation et de peroxydation qui sont bien distincts spatialement. [57 ,58]

#### I.5.4. Site actif de la COX-2 (Figure. I. 9) :

Cette isoforme possède deux particularités :

- **une particularité géométrique** : La COX-2 est caractérisée par une taille plus grande de son site récepteur (+ 20%, par rapport à COX-1) car l'isoleucine 523 de COX-1 a été remplacée par une valine chez COX-2. Le raccourcissement de la chaîne latérale d'un seul atome de carbone suffit pour supprimer la zone d'étranglement : cela permet alors l'accès à une poche qui agrandit le volume du récepteur.
- **une particularité électronique** : La poche latérale du récepteur contient une arginine (Arg513), caractéristique de la COX-2. Ce résidu, ionisé au pH physiologique, fait apparaître une

charge positive supplémentaire : ce site cationique est fondamental dans le mode d'action des inhibiteurs sélectifs de COX-2.

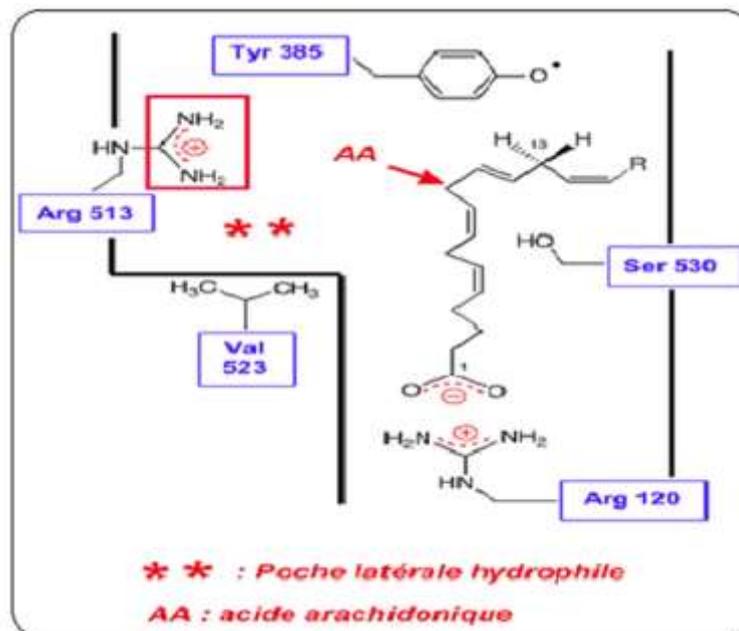


Figure. I. 9. Site actif de la COX-2 [59]

#### I.5.5. Rôle de la Cyclooxygénase-2 :

La COX catalyse l'étape initiale du métabolisme d'un acide gras, l'acide arachidonique. Ce dernier est un acide gras polyinsaturé essentiel, qui n'est pas ou peu présent à l'état libre dans le cytoplasme des cellules animales et se trouve en permanence transféré entre les différents compartiments cellulaires et lipides membranaires [60].

L'acide arachidonique est libéré sous l'action de la Phospholipase A2 (PLA2). Il permet, sous l'action de la COX, la formation de la prostaglandine (PG) G2 puis de la PGH2. Cette dernière est, par la suite, métabolisée par l'intervention de différentes enzymes en PGD2, PGE2, PGI2, PGF2 $\alpha$  et également en thromboxane A2 (TXA2) [61]. Ces substances, également appelées prostanoides, sont des médiateurs lipidiques impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques et physiopathologiques [62].

La COX-2 est faiblement détectée sous ces conditions, mais elle est rapidement induite en réponse à de nombreux stimuli et favorise la production de prostanoides inflammatoires [63]

La surexpression de la COX-2 joue un rôle principale dans la promotion tumorale en induisant la prolifération des cellules tumorales, en réduisant la mort cellulaire programmée et en diminuant l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses (chimiothérapie, radiothérapie, thérapie photodynamique). (Tableau I.2) [64]

<b>COX-2</b>
<b>Inductible</b>
Réponse à une réaction inflammatoire
Activée par des stimuli comme les cytokines par exemple. Présente dans les chondrocytes, les cellules synoviales, les monocytes, les macrophages et les polynucléaires

**Tableau I .2** : Rôle La Cyclooxygénase-2. [65]

#### **I .5.6. Mécanismes l'activité de COX-2 :**

La prostaglandine endoperoxyde H synthétase (PGHS) est souvent nommée cyclooxygénase de par sa première fonction catalytique. La COX est une enzyme bifonctionnelle contenant un groupe hème qui catalyse les deux premières étapes engagées dans la voie menant à la formation des prostaglandines (PGs) et du thromboxane TXA2 à partir de l'acide arachidonique (AA), à savoir la cyclooxygénation et la peroxydation. D'une part, la catalyse ajoute et cyclise deux molécules d'oxygène sur l'acide arachidonique pour former l'hydroperoxyde cyclique PGG2: c'est l'activité cyclooxygénase. D'autre part, elle réduit PGG2 en PGH2, c'est l'activité peroxydase. (Figure. I. 10)

Le mécanisme de conversion de l'AA en prostaglandine G2 (PGG2) a longtemps été l'objet d'étude des chimistes et des biochimistes (Figure. I. 11). Lors de ce processus, pas moins de quatre nouvelles liaisons carbone-carbone sont formées et cinq centres chiraux sont introduits dans l'AA achiral. Ces cinq dernières années furent le théâtre d'avancées importantes dans la compréhension détaillée des réactions catalytiques des COXs, c'est-à-dire dans l'identification des intermédiaires de réaction et des éléments responsables de la stéréosélectivité observée. Il fut déduit qu'en dépit de leur co-dépendance envers l'hème, il est possible de distinguer les activités cyclooxygénase et peroxydase en tant que sites indépendants mais interactifs [66]

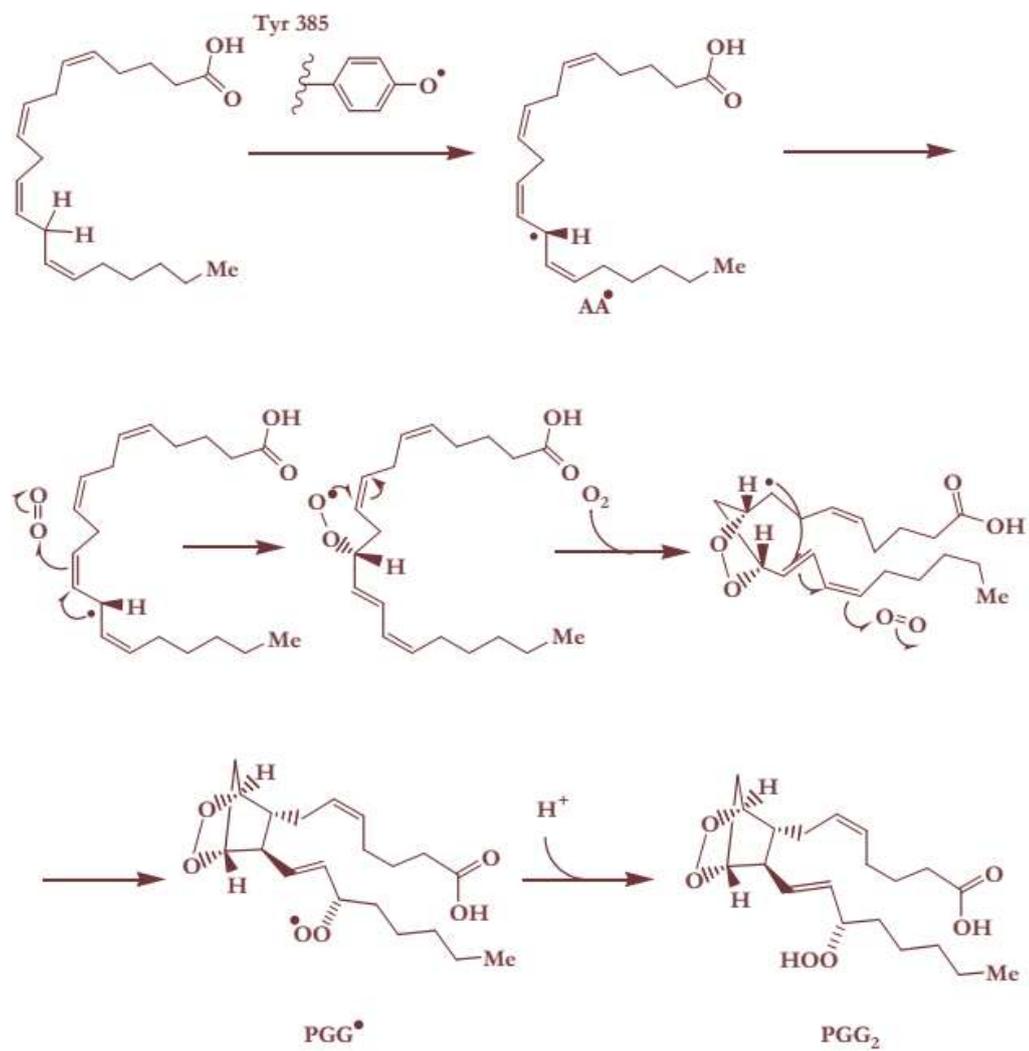


Figure. I. 10. Mécanisme de l'activité COX. [67]

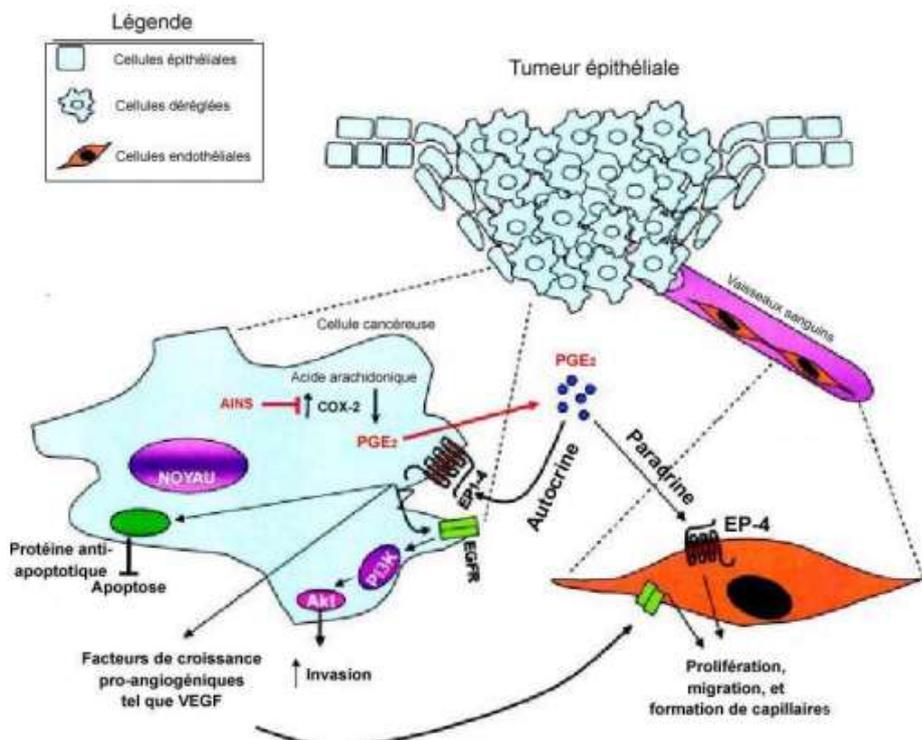


Figure. I. 11. Mécanismes possibles impliquant COX2 dans le développement tumoral. [68]

### I.5.7. Fonction de la cyclooxygénase:

L'acide arachidonique est un acide gras endogène provenant de la dégradation des phospholipides via la phospholipase A2. La prostaglandine endoperoxide synthase (PGHS ou encore COX) est une enzyme bifonctionnelle capable de convertir des acides gras tels que l'acide arachidonique en prostaglandine G2 (PGG2) par voie de dioxygénation. Un site de peroxydation transforme la PGG2 en PGH2, précurseur de séries de prostaglandines participant, à dose normale, à la protection du tissu gastro-intestinal. Elle produit également des prostacyclines, inhibiteur des fonctions plaquettaires ainsi que des thromboxanes. Tout ceci participe, à dose élevée, au phénomène inflammatoire (Figure. I. 12)

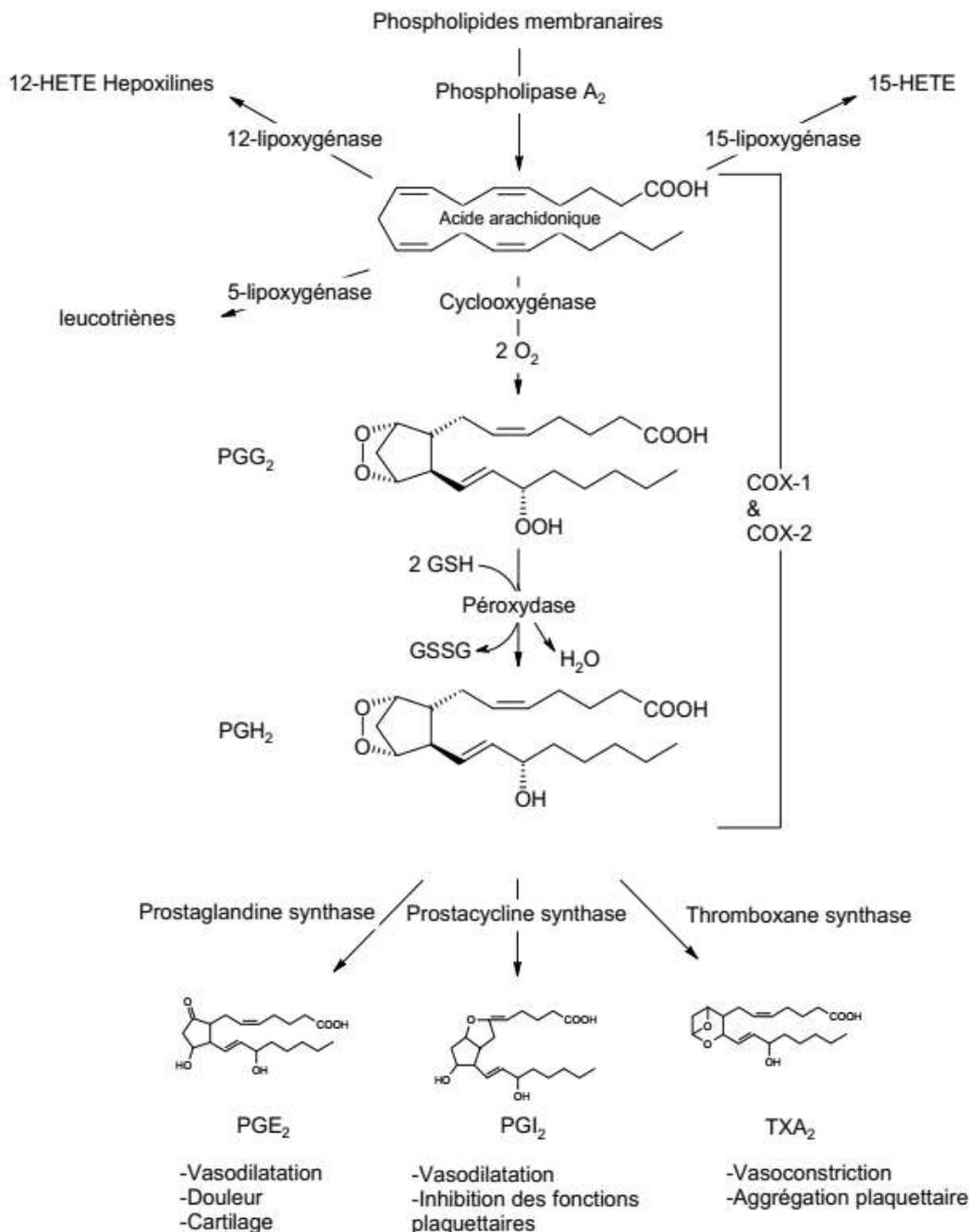


Figure. I. 12. Cascade de l'acide arachidonique.

La présence élevée de l'isoforme COX-2 est synonyme d'inflammation dans le tissu concerné. Son expression est généralement induite par des lipopolysaccharides ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (interleukines, interféron). Des études ont également montré l'existence d'un troisième isoforme, la COX-3. Cependant, celle-ci ne semble pas être capable de produire de prostaglandines ayant une activité dans les tissus humains.

Tous ces études mettent en avant que l'inhibition de la cyclooxygénase de type 2 réduit de

manière significative la production de prostaglandine dans les tissus et par voie de conséquence exerce une action anti-inflammatoire. Des travaux ont montré la présence élevée de COX-2 dans les muscles lisses des vaisseaux sanguins. L'activité COX-2 dans ces vaisseaux peut rectifier la diminution de production de prostaglandine PGI<sub>2</sub> observée lorsque l'endothélium vasculaire est endommagé. Localement, cette perte de PGI<sub>2</sub> augmente l'adhésion plaquettaire. [69]

#### I .5.8. La COX-2 et l'inflammation :

L'inflammation est définie comme l' « ensemble des modifications vasculaires, tissulaires et produites chez les êtres pluricellulaires par toute atteinte à leur intégrité tissulaire ». Elle constitue le mode de réponse le plus fréquent de l'organisme face à une irritation d'origine variable : infection, traumatisme mécanique ou chimique, trouble métabolique, brûlure, irradiation [70].

Des stimuli pro-inflammatoires peuvent induire la COX-2 [71]. De ce fait, la réaction inflammatoire est associée à une élévation du taux de PGS résultant de la surexpression de la De plus, la PGE<sub>2</sub> est le métabolite majoritairement détecté dans les processus inflammatoires [72].

La COX-2 représente ainsi une cible moléculaire de choix pour le traitement de l'inflammation.

Les anti-inflammatoires sont classés en deux catégories:

**Les anti-inflammatoires stéroïdiens :** (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de substances dérivées du cortisol qui agissent à différents niveaux de la réaction. Parmi les anti-inflammatoires stéroïdiens les plus puissants, on cite les glucocorticoïdes, les corticoïdes naturels (cortisol) et les corticoïdes de synthèse.

**Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)** forment un groupe hétérogène de substances qui agissent sur les produits de la réaction inflammatoire quelle que soit son origine.

#### I .5.9. Les inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase-2 :

Les inhibiteurs de COX-2 peuvent être séparés en trois catégories (Figure. I. 13). Il y a tout d'abord les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques (en vert) qui sont capables d'inhiber l'activité de COX-1 et de COX-2. Puis, il y a les inhibiteurs spécifiques de COX-2, qui n'inhibent que l'activité de COX-2 (en bleu). Enfin, il y a le nimésulide et le méloxicam qui sont souvent désignés comme inhibiteurs préférentiels de COX-2 (en gris) en raison de leur capacité à inhiber COX-1 mais que pour les plus fortes posologies recommandées [73].

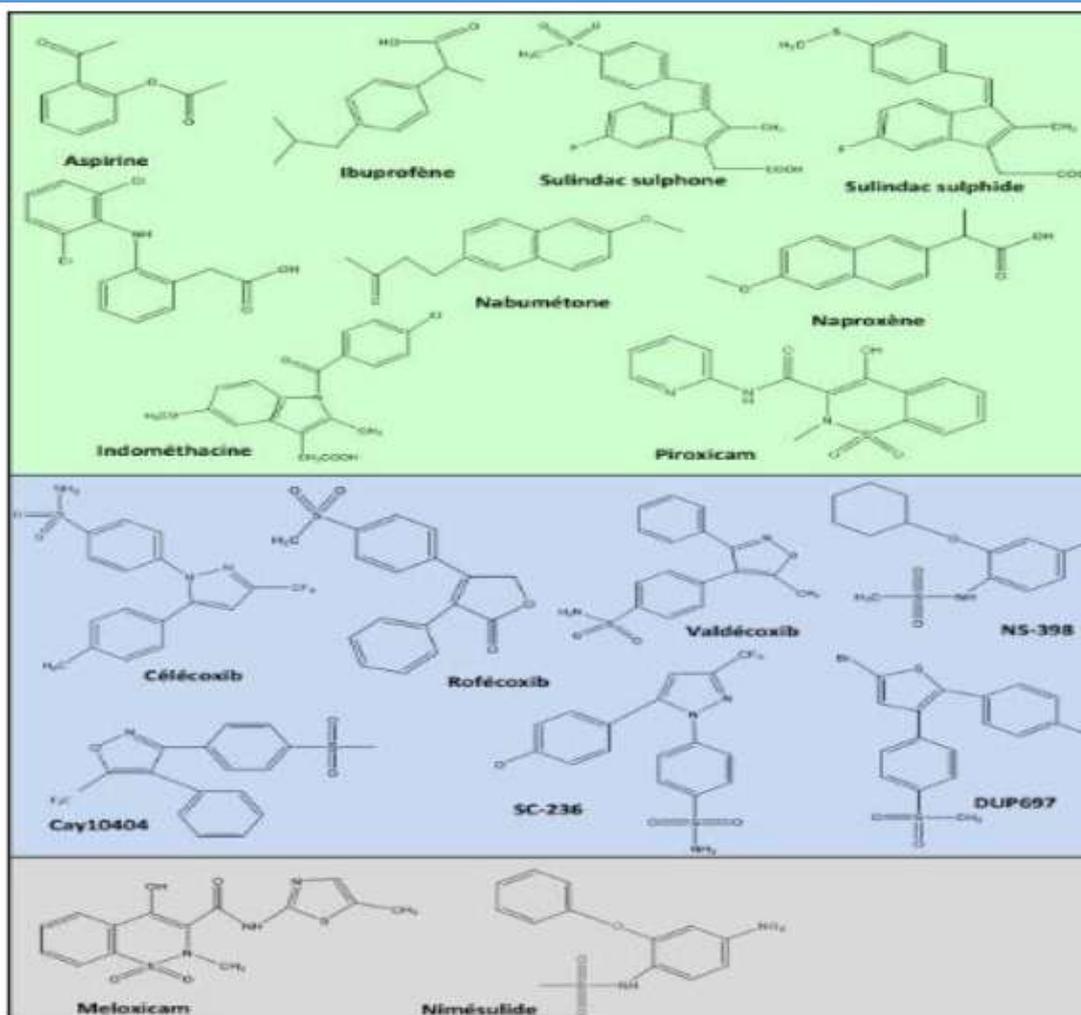


Figure. I. 13. Classification des inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase.

Chapitre II :

LES METHODES DE  
MODELISATION DES  
INTERACTIONS  
PROTEINE-LIGAND.

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

### II .1. Méthodes de modélisation moléculaire :

#### II .1.1. Introduction :

La modélisation moléculaire est le terme générique regroupant les méthodes qui permettent de simuler le comportement d'un système de particules, elle exploite des lois de la chimie, de la physique et de la biologie dans des programmes informatiques spécifiques afin de calculer structures et propriétés d'entités chimiques et biochimiques (protéines, acides nucléiques, complexes moléculaires, solides, cristaux etc.) [74]. La modélisation moléculaire a pour but de prévoir la structure et la réactivité des molécules ou des systèmes de molécules. [75]

La modélisation moléculaire met en jeu des méthodes de calcul théorique dont les principales font appel à la mécanique moléculaire, la dynamique moléculaire et à la mécanique quantique afin de déterminer la géométrie des atomes d'une molécule ainsi que ses propriétés physicochimiques [76,77].

L'interprétation est facilitée par de nombreux outils de représentation graphique et permet ainsi d'analyser les résultats sous un jour différent de celui de la voie expérimentale, qui demeure néanmoins complémentaire. Ainsi, la modélisation moléculaire trouve de nos jours en effet, les structures tridimensionnelles de ces biomolécules sont le point de départ pour des simulations visant à comprendre leurs interactions, entre elles ou avec des petites molécules, ce qui est à la base d'un grand nombre de phénomènes chimiques, biologiques et biochimiques [78]. Ainsi, la modélisation moléculaire trouve de nos jours d'importantes applications, parmi lesquelles trois exemples classiques sont :

- ✓ L'Étude des propriétés des matériaux : à partir de simulations moléculaires, un lien peut être établi entre les résultats de calculs menés à l'échelle microscopique (sur un échantillon représentatif d'atomes en interaction) et des propriétés mesurables à l'échelle macroscopique (sur les systèmes matériels réels que l'on souhaite maîtriser). Ainsi, peuvent être étudiées les propriétés mécaniques des polymères, les propriétés électroniques de solides cristallins ou encore les propriétés thermodynamiques et spectroscopiques d'une large gamme de composés d'intérêt scientifique et technologique [79].
- ✓ Le développement de nouveaux médicaments : le mécanisme d'action des nombreux médicaments consiste à agir comme inhibiteur (ligand) d'une enzyme (récepteur) impliquée dans le développement de la maladie, que ce soit une protéine d'un microorganisme pathogène ou d'un organisme humain. L'élucidation de la structure tridimensionnelle de protéines impliquées dans plusieurs pathologies a permis, via des simulations informatiques,

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

la découverte d'inhibiteurs puissants pour ces protéines, en réduisant considérablement le nombre d'essais de screening nécessaires pour aboutir à un nouveau médicament [80].

- ✓ La rationalisation de l'ingénierie enzymatique : le fondement est le même que celui du développement de médicaments : en permettant d'étudier les interactions entre les substrats (ligand) et les enzymes (récepteurs), la modélisation moléculaire apporte une meilleure compréhension de la sélectivité enzymatique, au niveau moléculaire. Ceci peut rendre possible, par la suite, le développement d'approches prédictives pour la sélectivité des enzymes natives vis-à-vis d'un substrat ou d'une classe de substrats donnée [81,82], ou encore, d'identifier des acides aminés dont la mutation ponctuelle permettrait de modifier la sélectivité ou la spécificité enzymatiques [83,84].

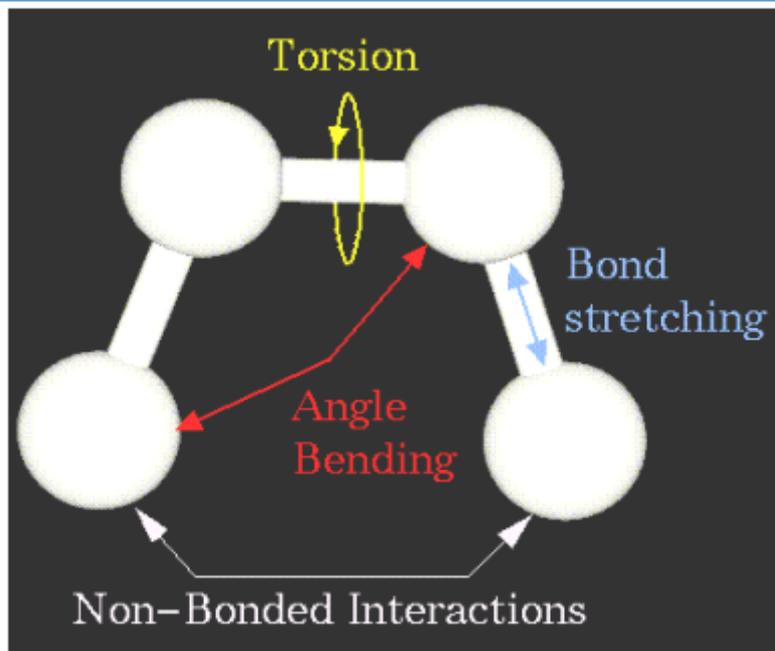
### II .1.2. La mécanique moléculaire:

#### II .1.2.1. Principes théoriques:

Les méthodes de mécanique moléculaire (MM) utilisent les lois de la physique classique pour la prédiction des structures et de leurs propriétés, comme l'énergie. Au même titre que les méthodes de mécanique quantique est un outil puissant utilisé pour mieux comprendre les petits systèmes moléculaires et pour répondre à certaines questions concernant la structure électronique de molécules. D'autre part, la mécanique moléculaire décrit les molécules en fonction de leurs noyaux et non pas de leurs électrons, elle définit une fonction purement empirique prenant pour variable, les positions des noyaux et impliquant de manière implicite la présence des électrons.

La mécanique moléculaire (Figure. II. 1) considère une molécule comme une série de masses (les atomes) reliés entre eux par des ressorts (liaisons chimiques). En fonction des interactions entre les masses, des déformations structurelles peuvent avoir lieu. Plus particulièrement, pour l'ensemble des méthodes, la fonction d'énergie est généralement décrite en termes internes reliés directement aux liaisons covalentes des atomes (interactions liantes) et en termes externes traduisant les interactions entre atomes non liés de manière covalente (interactions non liantes) [85]

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.



**Figure. II. 1 :** Mécanique moléculaire.

### II .1.2.2. Modélisation par champs de force :

Dans l'expression fonctionnelle des champs de forces classiques, l'énergie potentielle totale du système ( $E_{\text{tot}}$ ) est exprimée comme étant la somme des contributions énergétiques des termes liés et de celles des termes non liés [86] :

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{stretch}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{tors}} + E_{\text{Van der Waals}} + E_{\text{electro}} + \dots$$

{  
 $E_{\text{atomes-liés}}$

{  
 $E_{\text{atomes-non-liés}}$

On appelle champ de force le modèle mathématique représentant l'énergie potentielle d'une molécule en mécanique moléculaire. Sous ce terme sont en fait regroupés deux éléments:

- d'une part l'expression des différentes fonctions contribuant au calcul énergétique.
- d'autre part les valeurs des différentes constantes paramétrant ces fonctions.

Ce potentiel empirique est constitué de deux parties représentant les interactions entre atomes non liés (électrostatique et Lennard-Jones) et les interactions entre atomes liés (représentation harmonique des déformations des liaisons, des angles de valence et des barrières énergétiques des angles de torsion propres et impropres) [87].

Il existe de nombreux champs de force avec des versions successives et de nombreuses manières de définir l'énergie potentielle. Parmi les champs de forces le plus connus, figurent :

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

- ✓ MMFF (Merck Molecular Force Field),
- ✓ CFF (Conformément Field Force)
- ✓ CVFF (Consistent Valence Force Field), utilisés dans le traitement de petites molécules organiques et de biomolécules.
- ✓ GROMOS (Groningen molecular Simulation Program Package) [88]
- ✓ AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) [89]
- ✓ CHARMM (Chemistry at Harvard using Molecular Mechanics) [90,91], spécialisés dans le traitement de molécules biologiques, telles que les acides nucléiques et les protéines. [92]

### II .1.3. Les simulations de dynamique moléculaire :

#### II .1.3.1. Principes théoriques :

La dynamique moléculaire est une approche de simulation qui prend en compte les interactions entre atomes et molécules pendant une période de temps, à une certaine température, permettant ainsi une évaluation des mouvements atomiques [93]. On se trouve alors en présence d'un assemblage de masses, de ressorts et de vitesses et donc le problème peut être résolu en intégrant la seconde équation de mouvement de Newton.

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2}$$

$\vec{F}_i$  : Vecteur force agissant sur l'atome i.

$m_i$  : Masse de l'atome i.

$\vec{a}_i$  : Vecteur accélération de l'atome i.

$\vec{r}_i$  : La position de l'atome i.

Les vitesses sont appliquées de façon aléatoire sur les atomes (sphères) selon la température choisie pour l'expérience. En utilisant la DM, on peut étudier la flexibilité ou la rigidité des biomolécules, mesurer les interactions intermoléculaires entre la protéine et les ligands ou d'autres biomolécules, calculer l'énergie libre ou bien étudier l'effet du solvant sur la structure des biomolécules. Parmi les algorithmes intégrateurs les plus souvent implémentés dans les logiciels se trouvent les algorithmes de Verlet et de Verlet-Leapfrog. [94]

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

### II .1.3.2. Calcul de dynamique moléculaire :

Une simulation de dynamique moléculaire se réalise généralement en quatre étapes:

1. Une étape de minimisation de la structure initiale destinée à éliminer les contacts stériques.
2. Une étape dite de thermalisation au cours de laquelle les vitesses des atomes sont augmentées progressivement afin d'atteindre la température finale choisie.
3. Une étape d'équilibration pendant laquelle les vitesses ne sont plus modifiées. L'énergie cinétique se répartit sur toute la molécule afin d'atteindre son état d'équilibre.
4. Enfin, pendant la dernière étape, appelée dynamique productive, les coordonnées et les vitesses sont sauvegardées pour une analyse de la dynamique. [95]

Deux points importants doivent être pris en compte :

La température d'une molécule ou agitation thermique correspond en réalité à l'énergie cinétique des atomes de la molécule puisque :

$$E_{\text{cinétique}} = \frac{1}{2} \sum m_i v_i^2 = \frac{3}{2} N K_b T$$

Ou :

$v_i^2$  : Valeur de la moyenne carrée de la vitesse.

N : Nombre d'atomes du système.

$K_b$  : Constante de Boltzmann.

T : Température absolue.

### II .1.4. Minimisation d'énergie (optimisation de géométrie) :

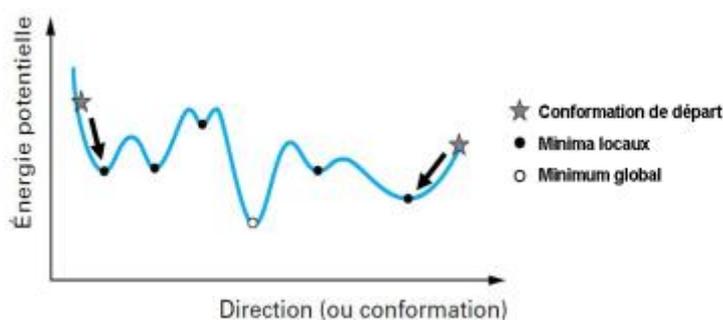
Une simulation typique de mécanique moléculaire est la minimisation d'énergie, le but étant de trouver une conformation de faible énergie d'une molécule ou d'un système moléculaire. La fonction d'énergie potentielle E, possède 3N variables (N = nombre d'atomes du système étudié). C'est cette fonction objective E (ri) qu'il faut minimiser, où ri = (xi, yi, zi) représente les coordonnées de chaque atome i du système. Formellement, la minimisation de l'énergie potentielle d'un système moléculaire consiste donc à résoudre un problème d'optimisation à plusieurs variables indépendantes : à partir des coordonnées cartésiennes des atomes dans la structure initiale (xi, yi, zi), on recherche un nouveau jeu de coordonnées optimisées (x\*i, y\*i,

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

$z^*i$ ) qui réduit à son minimum l'énergie du système,  $E(x^*i, y^*i, z^*i)$ . Pour cette raison, la minimisation d'énergie est aussi appelée optimisation de géométrie, les deux phénomènes étant indissociables. Le principe consiste à prendre la dérivée première de l'énergie  $E$  par rapport à chacun des degrés de liberté du système et à trouver l'endroit sur son hyper surface énergétique où, pour chaque coordonnée :

$$\partial E / \partial r_i = 0$$

Les algorithmes numériques qui exécutent cette tâche sont itératifs et ont, au moins, un point en commun : on commence en un endroit donné de l'hypersurface et on descend vers le minimum le plus proche, sans savoir si ce minimum est local ou absolu (Figure. II.2).



**Figure. II.2.** Représentation schématique du principe d'une minimisation d'énergie « statique» :

à partir d'un ensemble de coordonnées atomiques (conformation) de départ, l'algorithme retrouve le minimum local de la fonction d'énergie le plus proche, ainsi que la nouvelle conformation correspondant à ce minimum.

Les procédures sont de deux types : les unes utilisent uniquement la pente de la surface (dérivée première), comme les algorithmes Steepest Descent (SD) et les Conjugate Gradients (CG) ; les autres, utilisent à la fois cette pente et la courbure de la surface (les dérivées première et seconde), comme l'algorithme Adopte-basis Newton-Raphson (ABNR[95 ,96]). Il est important de noter que, étant donné le nombre important de variables de la fonction d'énergie  $E(x_i, y_i, z_i)$ , celle-ci présente, généralement, plusieurs minima et maxima. Ces algorithmes de minimisation ne permettent de trouver que le minimum local le plus proche de la configuration de départ, sans franchir les barrières énergétiques.

### II .2. Technique basée sur la structure de la protéine :

Les protéines sont les molécules les plus complexes et les plus variées des êtres vivants. Un être humain fabriquerait au total 100000 sortes différentes de protéines. Chaque cellule en fabrique en moyenne 15000 sortes en que leurs fonctions sont incroyablement complexes et

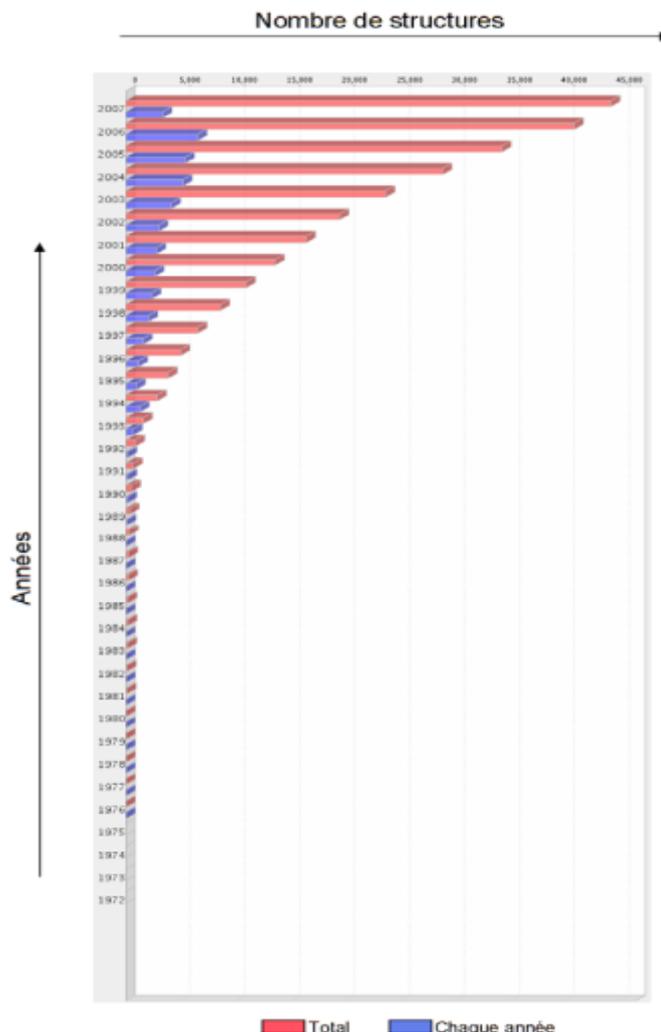
## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

variées. Par exemple, certaines protéines, les enzymes, jouent le rôle de catalyseurs de réactions biochimiques, tandis que l'hémoglobine se charge du transport de l'oxygène dans le sang, ou que l'actine et la myosine permettent la contraction musculaire et donc, le mouvement. En résumé, on peut dire que les protéines régulent un grand nombre de processus biologiques et sont indispensables au bon fonctionnement de tout organisme. [97]

### II .3. L'évolution des structures des protéines :

Trois méthodes expérimentales permettent aujourd'hui de déterminer la structure des protéines : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X. Cette dernière technique est responsable de la majorité des structures issues d'une base de données de structures accessibles gratuitement appelée la «protéines data bank» (PDB), [98] c'est-à-dire plus de 40 000 structures protéiques (juin 2007). (Figure .II.3) La RMN fournit, quant à elle, 6 200 structures contre seulement 150 dans le cas de la microscopie électronique. Nous avons représenté le nombre de structures définies les 30 dernières années, toutes techniques confondues

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.



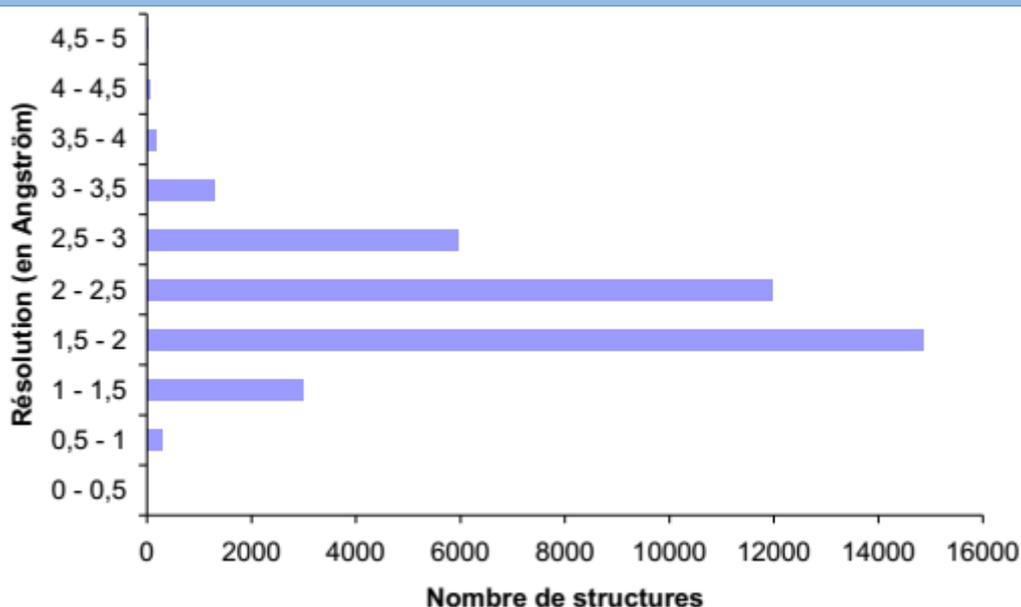
**Figure II.3. Evolution du nombre de structures protéiques disponibles dans la PDB**

L'histogramme montre une évolution exponentielle du nombre de structures définies chaque année (en bleu). Le nombre de structures totales (en rouge) suit également une courbe exponentielle de croissance, prouvant la progression des techniques. Une autre preuve du succès de ces méthodes est la qualité des structures. [99]

### a) La résolution

La résolution en angström de la protéine est une des données reflétant la qualité des structures ayant permis de construire le modèle cristallographique. Généralement, la résolution est limitée par la manière dont les cristaux diffractent, le temps nécessaire pour collecter des données de meilleures résolutions, la dynamique de la protéine, la qualité de l'appareillage et la température du système. Une résolution proche de 1 Å permet de distinguer tous les atomes y compris les hydrogènes. Une résolution de l'ordre de 6 Å permet seulement de distinguer que des structures de types «hélice  $\alpha$ » ou «feuille  $\beta$ » par exemple (Figure II.4).

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.



**Figure .II.4 : Nombre de structures protéiques par intervalle de résolution donné.**

L'histogramme précédent illustre parfaitement la répartition de la qualité des structures au sein de la PDB. La majorité des structures ont une résolution comprise entre 1,5 et 2,5 Å. Cet intervalle de résolution prouve que les structures sont de bonne qualité.

### **b) Le facteur R**

Un autre indicateur est le facteur R qui est une grandeur indicatrice de l'écart entre les facteurs de structures observés et calculés. Le facteur R est compris entre 0 et 1 (plus le facteur R est proche de 0 et plus la prédiction est juste)

### **c) Choix d'une structure cristallographique**

La combinaison des deux facteurs évoqués précédemment permet de réaliser un choix pertinent de structure cristallographique. Par exemple, une structure de protéine dont le facteur R est proche de 0 mais possédant une mauvaise résolution n'a aucune signification. Typiquement, une structure dont le facteur R avoisine la valeur de 0,2 et possédant une résolution correcte (inférieure ou égale à 2 Å) correspond la plupart du temps à une structure précise et bien définie. Il existe à ce jour des outils capables d'évaluer la qualité des structures cristallographiques (REDUCE [100]) [101]

### **d) Facteur d'agitation thermique**

Les atomes du cristal bougent autour d'une position atomique moyenne. Les rayonnements ne voient pas les atomes exactement à la même position dans les différentes mailles du cristal. Ce facteur permet d'observer la flexibilité des résidus.

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

### e) Détermination du site actif

Une étape fondamentale dans la stratégie de criblage virtuel est l'identification des résidus d'acides aminés pouvant intervenir dans le processus de reconnaissance du ligand. Un ligand cristallisé avec le récepteur est susceptible de renseigner sur l'emplacement du site actif. Malgré tout, cette information doit être interprétée avec prudence car, pour un même récepteur, le site actif peut être différent selon le profil pharmacologique de la molécule (agoniste, antagoniste, agoniste inverse). [102]

### II .4. Interaction protéine-ligand :

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Les forces intervenant dans la formation du complexe peuvent être de nature stérique, électronique ou les deux avec des contributions différentes. Les états conformationnels choisis lors de l'interaction ne sont pas nécessairement ceux de plus basse énergie en solution, mais des états transitoires stabilisés par celle-ci. Les complexes formés sont alors plus stables que les formes dissociées. Cette association intermoléculaire est stabilisée par plusieurs effets et des liaisons non covalentes. Au niveau du processus biochimique, elles s'expriment par différentes interactions : électrostatiques, hydrophobiques, de Van Der Waals et des ponts hydrogène [103]

#### II .4.1. Interactions de Van Der Waals : [86]

Les interactions de Van Der Waals sont des dipôles non permanents de faible rayon d'action (figure 5). Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice.

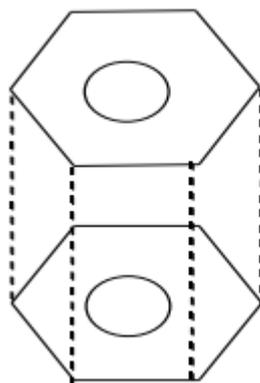


Figure. II. 5 : Interactions de Van Der Walls.

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

### II .4.2. Ponts hydrogène :

Les ponts hydrogène avec une force de l'ordre de 2 à 4 Kcal/mol agissent, dans les systèmes biologiques, à très courte distance (0,9 à 2,8 Å) entre un H lié à un O ou un N avec un O ou un N (Figure. II. 6). Ils sont peu nombreux et s'adaptent très bien à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°)

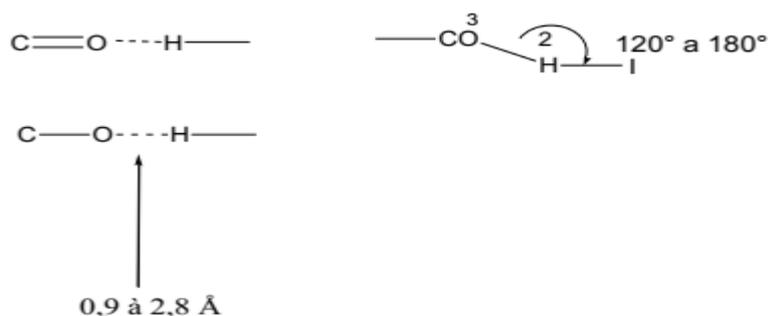


Figure. II. 6 : ponts hydrogène.

### II .4.3. Interactions électrostatiques :

Les interactions électrostatiques agissent à plus grande distance entre dipôles chargés. La distance pour une liaison saline, par exemple, est de 3,7 à 4,5 Å (Figure. II. 7), et sa force est de l'ordre de 8 Kcal/mol. En présence de solvant, ces interactions sont favorisées du fait de la polarité et de la petite taille de la molécule d'eau. [86]

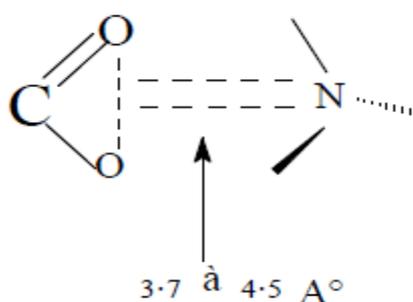


Figure. II. 7 : Interaction électrostatiques.

## II .5. Principes théoriques de docking moléculaire:

Docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en

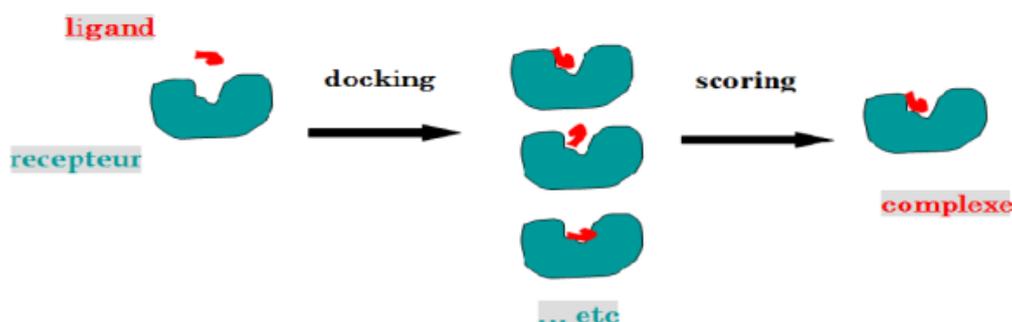
## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique. Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine, le terme docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand » [104]

Le docking moléculaire a pour but de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur [105]

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (Figure. II.8).

- La première (le docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- La deuxième (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées [106]



**Figure. II.8.** Principe général d'un programme de docking.

### II .6. Algorithmes de docking :

En principe, un docking peut être fait de façon «manuelle», directement par le modélisateur, en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine à l'aide d'une interface graphique. Ensuite, la géométrie de l'ensemble est optimisée de manière à corriger les problèmes stériques et obtenir un complexe énergétiquement stable. Cette approche est appliquée quand on a une idée précise du mode d'interaction réel du ligand [107]

Néanmoins, le plus souvent, le mode d'interaction réel n'est pas connu. Dans ce cas, tester manuellement toutes les conformations et orientations des ligands s'avère impossible d'un point

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

de vue pratique, même en considérant la protéine comme un corps rigide. Pour contourner cette difficulté, les algorithmes de docking ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association protéine-ligand les plus favorables [108]

Les algorithmes de docking peuvent être séparés en deux grandes classes : ceux qui ne tiennent pas compte de la flexibilité de la protéine, en traitant celle-ci comme un corps rigide, et ceux qui sont capables de prendre en compte, partiellement la flexibilité du récepteur. - Dans les procédures de docking considérant la protéine comme un corps rigide, la flexibilité du ligand seule est prise en compte pour l'obtention de complexes. Selon la méthode utilisée pour générer les conformères du ligand et les placer dans la cavité catalytique du récepteur, les algorithmes peuvent être sous-divisés en algorithmes de simulation de MM et DM [109, 110, 111,112], de forme, systématique et stochastique. Plusieurs articles de revue décrivant le principe, les points forts et les limitations de ces méthodes sont disponibles [113, 114, 115,116]. Toutefois, cette classification doit être considérée avec précaution, puisque un bon nombre d'algorithmes combinent plus d'une méthode pour la génération et l'échantillonnage de conformères du ligand. Dans la plupart des cas, l'utilisation d'algorithmes considérant la protéine comme un corps rigide mène à de bons résultats, principalement quand la protéine a une flexibilité limitée. En effet, dans de tels cas, la structure cristallographique peut être considérée comme plus représentative de l'état du naturel, ce qui augmente les chances de simuler correctement la complexation des ligands [117, 118,119], protéine dans son environnement.

▪ Certaines protéines présentent naturellement des régions de grande flexibilité, subissant des réarrangements considérables en présence d'un ligand. Dans ce cas, négliger la flexibilité de la protéine peut mettre en péril la fiabilité des résultats de docking, et rend nécessaire l'utilisation d'approches capables de tenir compte de la flexibilité du système entier [111, 112]. Des méthodes indirectes ou directes, où la flexibilité de la protéine est partiellement ou totalement prise en compte, sont décrites dans la littérature. Néanmoins, ces méthodes ne sont pas souvent utilisées car le gain en précision par rapport aux algorithmes traditionnels est généralement trop petit par rapport à l'augmentation du temps de simulation [119, 120, 121,122]

### II .7. Choix de logiciel de MolDock (MVD) :

Dans le domaine de docking moléculaire, plusieurs logiciels ont été utilisés pour étudier les différentes interactions existantes entre deux entités moléculaires (Enzyme ligands). MolDock est un logiciel récemment développé a donné de bons résultats (algorithme génétique) [123]. La fonction de score de Moldock est une fonction empirique. Ce type de fonction nous

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

permet de choisir les composés ayant la plus grande probabilité d'interagir avec la cible, ne nécessite pas une grande puissance de calcul, ce qui permet de cribler la cible plus rapidement. Ainsi que se démarque par sa capacité à mieux évaluer les ponts H ainsi que les interactions électrostatiques. La procédure d'accueil est composée de trois éléments :

- a) L'identification de site de liaison.
- b) La recherche de la meilleure pose parmi les poses possibles.
- c) La fonction de score [124]

### II .8. Protocole général de docking:

Les approches utilisées actuellement sont exclusivement calculatoires et évaluées par des outils de visualisation. Ces approches peuvent être décomposées en quatre à cinq phases successives (Figure. II.9) :

- Choix du mode de représentation des protéines (tout atome, pseudo-atome, grille, etc.),
- Exploration conformationnelle (corps-rigide position/orientation du ligand et/ou flexible position/orientation/forme du ligand)
- Minimisation de la fonction d'évaluation de l'énergie d'interaction (ou fonction de score) des conformations issues de l'exploration.
- Regroupement par ressemblances et classification par évaluation plus fine du score, accompagnée d'une étape non automatique d'évaluation visuelle des résultats lorsque le score ne permet pas de discriminer la conformation native des différentes conformations générées
- Une étape optionnelle d'affinement des complexes sélectionnés par minimisation ou dynamique moléculaire.

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

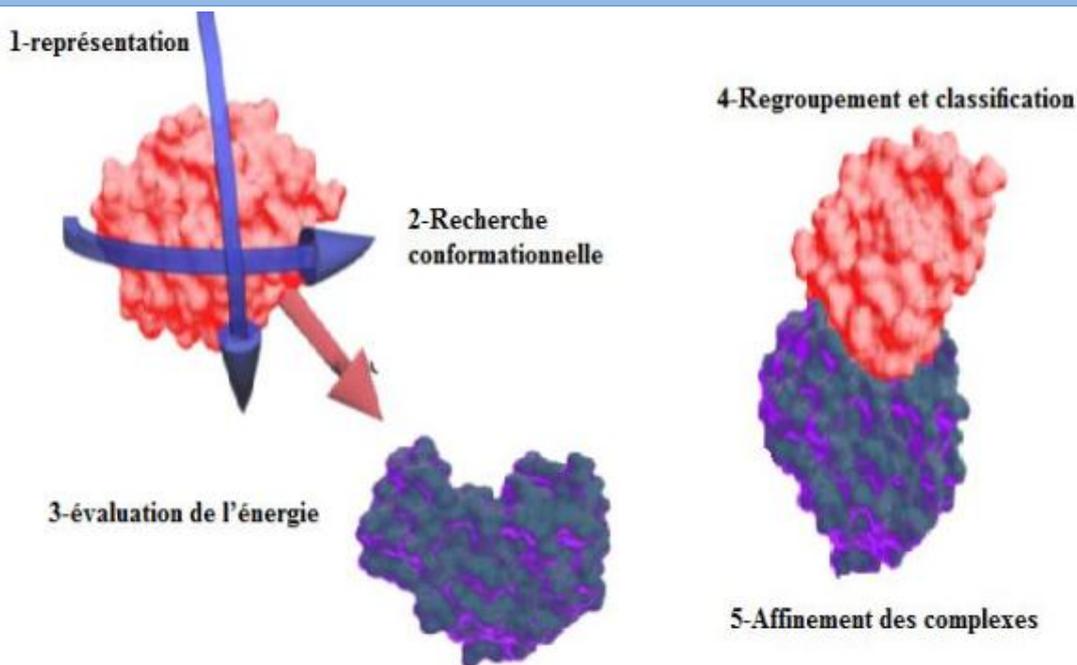


Figure. II.9. Protocole général de docking [124]

### II .9. Adme :

Le terme ADME appelé à l'origine des processus in vivo qui régissent la pharmacocinétique (PK).

Il a été dépensé pour inclure in vitro physico-chimiques et propriétés biochimiques qui affectent PK in vivo. En général, ADME approprié.

Les propriétés sont essentielles au succès des essais in vitro et des études in vivo. Pharmacocinétique est une branche de la pharmacologie dédiée à la détermination du sort des substances administrées à l'extérieur d'un organisme vivant. [125]

On peut schématiser la pharmacocinétique d'un médicament en 4 grandes étapes :

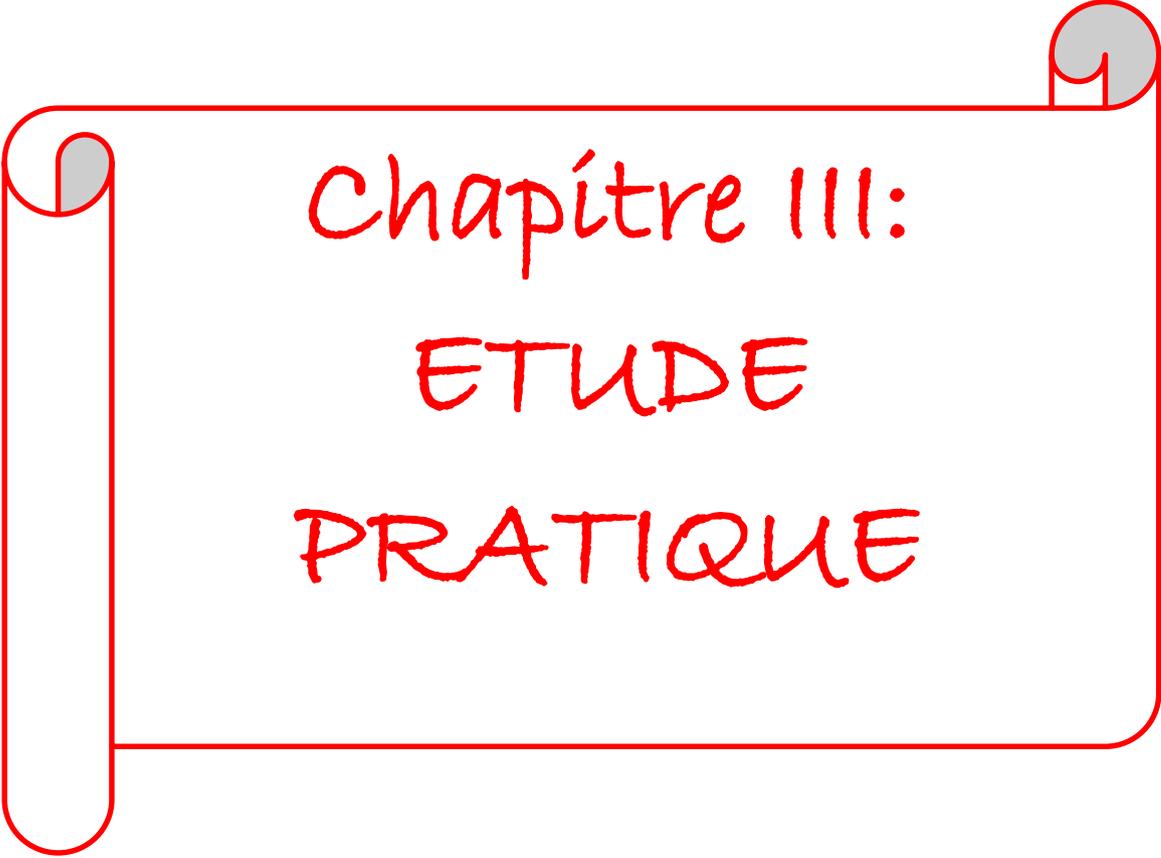
- La résorption ou absorption : Le médicament après absorption se trouve dans les liquides extracellulaires dont le compartiment plasmatique qui est facilement accessible, permettant ainsi la mesure de la concentration plasmatique du médicament.
- La distribution dans l'organisme : une fois le compartiment plasmatique atteint, le médicament se distribue dans différents compartiments soit pour accéder à son récepteur et entraîner une réponse tissulaire, soit pour être métabolisé et ensuite éliminé, soit pour se fixer de manière non spécifique ou être stocké de manière prolongée dans des secteurs constituant un compartiment profond tel que la masse adipeuse.

## Chapitre II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.

- Le métabolisme :

Le métabolisme est la transformation par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs métabolites actifs ou inactifs. De nombreux organes peuvent réaliser ces transformations (rein, poumon, foie..). Le foie est le principal organe impliqué dans le métabolisme des médicaments. Le métabolisme est souvent la première étape de l'élimination d'un médicament de l'organisme.

- L'élimination de l'organisme : un médicament et/ou ses métabolites peuvent être éliminés par la sueur, la salive, la bile ou l'urine. Les principales voies d'élimination sont l'élimination rénale (urine) et l'élimination biliaire. [126]



Chapitre III:

ETUDE

PRATIQUE

### III .1. Introduction :

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement c'est définir quels sont les résidus mis en jeu:

- L'affinité entre deux molécules.
- Les distances entre les acides aminés du site actif de l'enzyme et ceux des inhibiteurs.
- L'énergie d'interaction.

La flexibilité des molécules biologiques résulte de la haute dimensionnalité des systèmes, mais aussi de l'intervention d'un grand nombre d'interactions faibles (Van der Waals, liaison hydrogène, effet hydrophobe, ...). Il est connu qu'elle fait partie intégrante de la dynamique des macromolécules et de leur bon fonctionnement. La négligence de ce paramètre dans les calculs introduit des erreurs, il convient donc de déterminer la flexibilité intrinsèque d'une molécule mais aussi de pouvoir l'introduire, au moins partiellement, dans une procédure de docking.

Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée. [127]

Ce travail consiste à étudier les interactions entre le cyclooxygénase-2 et une série de dérivés de pyrazole (30 ligands) par la méthode de la modélisation moléculaire (Docking moléculaire). pour mieux comprendre les mécanismes d'action de cette enzyme afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs en faisant appel aux approches in silico de modélisation des interactions enzyme-inhibiteur par docking moléculaire. Détermination des paramètres PK Afin d'identifier des nouvelles molécules susceptibles de devenir des médicaments.

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

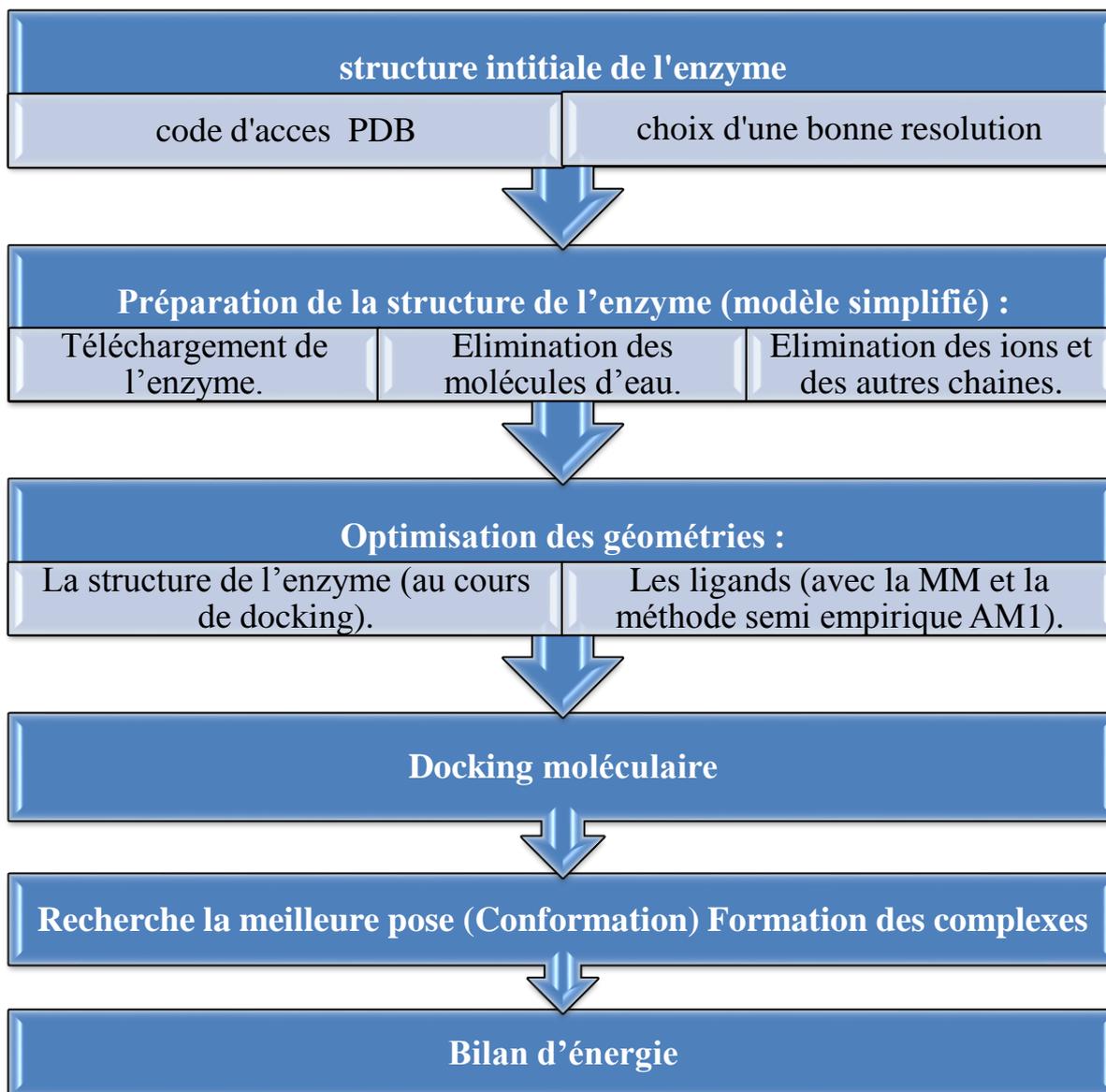


Figure III.1 : protocole de calcul.

### III .2. Préparation de l'enzyme :

Le téléchargement de l'enzyme de la cyclooxygénase a été fait à partir de la base de données " **Protein Data Bank**" (code d'accès **5KIR**) (Figure III.2). La PDB contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayons X) [128], soit par RMN. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la Bank, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée.

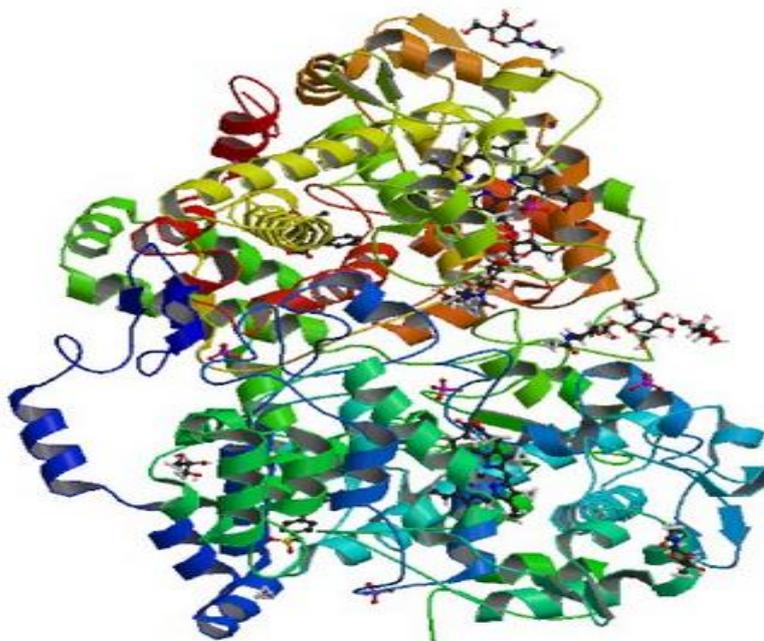


Figure III.2 : Enzyme de la cyclooxygénase.

### III .3. Préparation des ligands :

- Les inhibiteurs utilisés dans notre travail sont des dérivés pyrazole (Figure III.3). [129]
- L'optimisation de tous les ligands (Tableau III.1) a été effectuée par le programme HyperChem (8.07) en utilisant la mécanique moléculaire avec le champ de force (MM+), puis la méthode semi empirique AM1, Ils sont enregistrées au format pdb ou mol2.

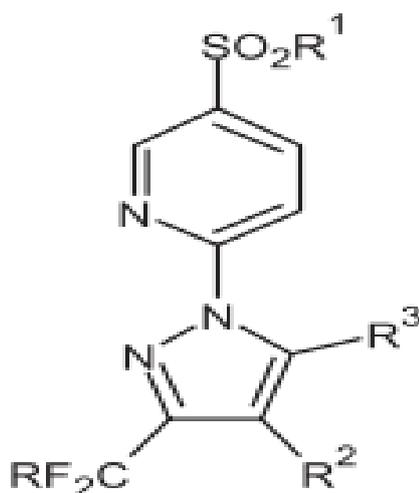
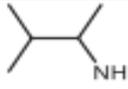
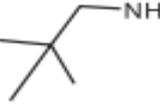
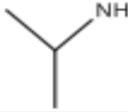
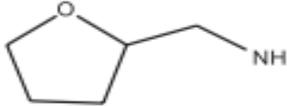
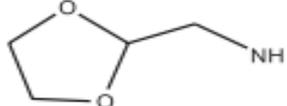
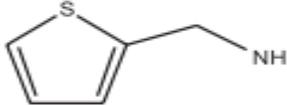
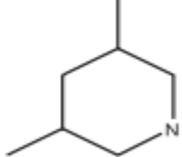
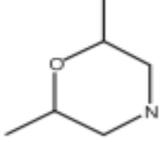
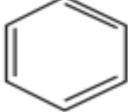
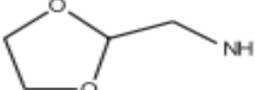


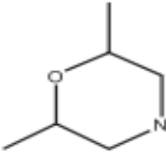
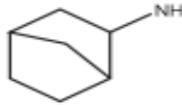
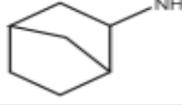
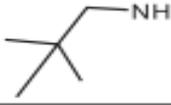
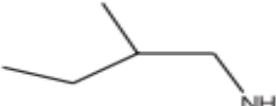
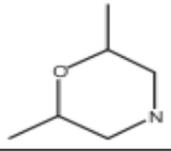
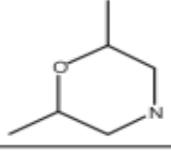
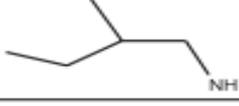
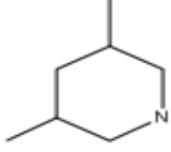
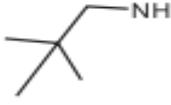
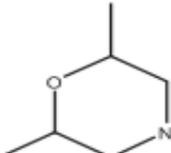
Figure III.3 : General structure de pyrazole tétrasubstituée.

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

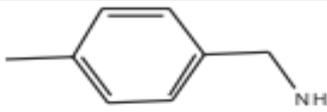
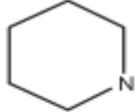
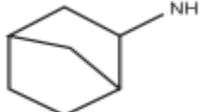
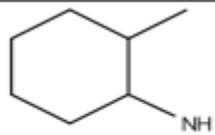
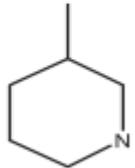
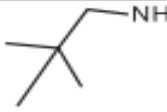
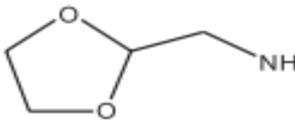
**Tableau III.1 : Structure des composés de la série bioactive**

Compound	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
1	F	Me	CN	
2	F	Me	CN	
3	F	Me	CN	
4	F	Me	CN	
5	F	Me	CN	
6	F	Me	CN	
7	F	Me	CN	
8	F	Me	CN	
9	F	Me	CN	
10	F	Me	CN	
11	F	Me	H	
12	H	Me	CN	
13	H	Me	CN	

### Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

14	H	Me	CN	
15	H	Me	CN	
16	F	NH <sub>2</sub>	CN	
17	F	NH <sub>2</sub>	CN	
18	F	NH <sub>2</sub>	CN	
19	F	NH <sub>2</sub>	CN	
20	F	NH <sub>2</sub>	CN	
21	H	NH <sub>2</sub>	CN	
22	H	NH <sub>2</sub>	CN	
23	H	NH <sub>2</sub>	CN	
24	H	NH <sub>2</sub>	CN	

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

25	F	Me	CN	
26	F	Me	CN	
27	F	Me	CN	
28	F	Me	CN	
29	H	Me	CN	
30	H	Me	CN	
31	F	NH <sub>2</sub>	CN	

### III .4. Détection des cavités :

Pour obtenir des meilleurs sites de liaison potentiels dans la ROX-2, un maximum de cinq cavités a été détecté en utilisant des paramètres par défaut. Le volume et la surface de la région ont été donnés dans le tableau III.2. Le volume de la cavité 1 (723.456 Å<sup>3</sup>) et la cavité2 (314.368 Å<sup>3</sup>) se sont avéré être supérieure à celle des autres cavités, aussi nous avons trouvé que le ligand de VIOXX la Co-cristallisation est fixé dans la cavité 3( 66.56 .Å 3), et En fonction des données expérimentales concernant les résidus du site actif nous avons choisi la cavité3 pour notre étude ultérieure (Figure III.4).

**Tableau III.2** : volume et surface des 5 cavités détectées

Cavités	Volume(A <sup>3</sup> )	Surface (A <sup>2</sup> )
1	723.456	2179.84
2	314.368	962.56
3	<b>66.56</b>	<b>204.8</b>
4	29.696	130.56
5	28.16	128

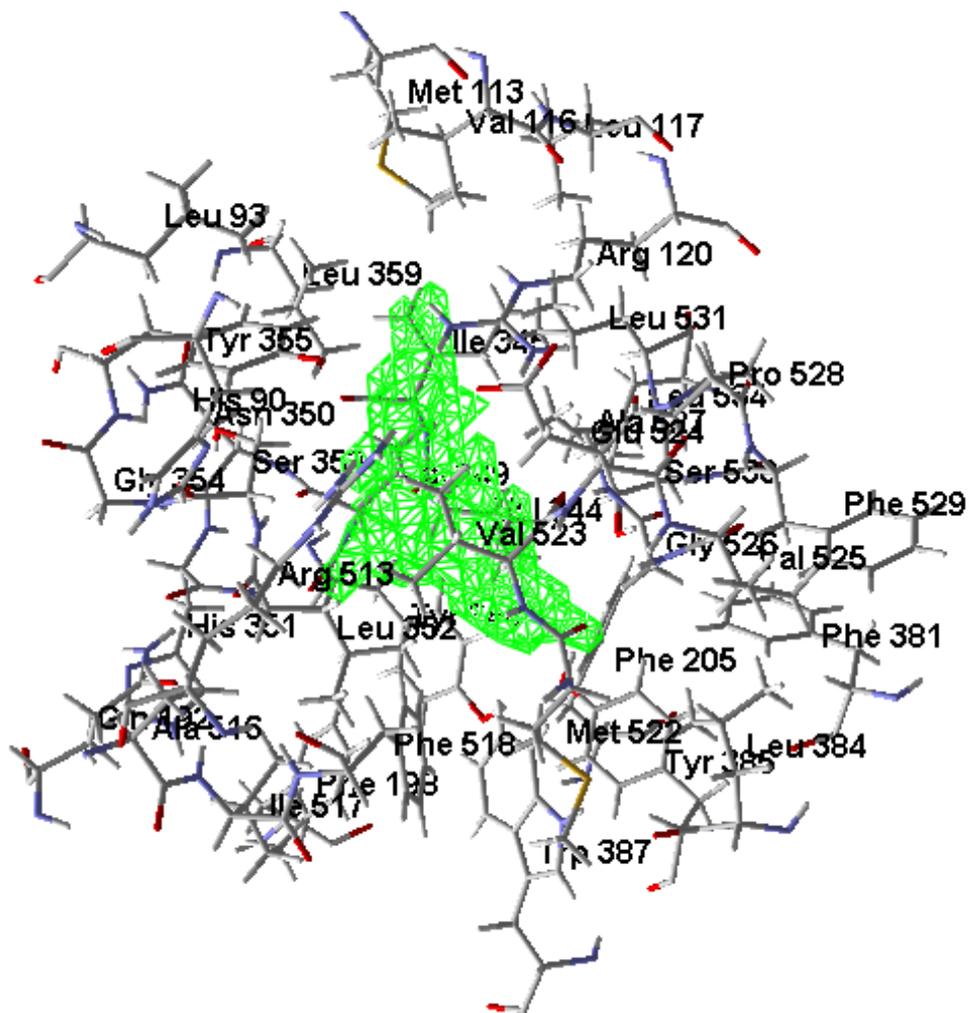


Figure III.4 : Interface graphique des cavités 3 par MolDock.

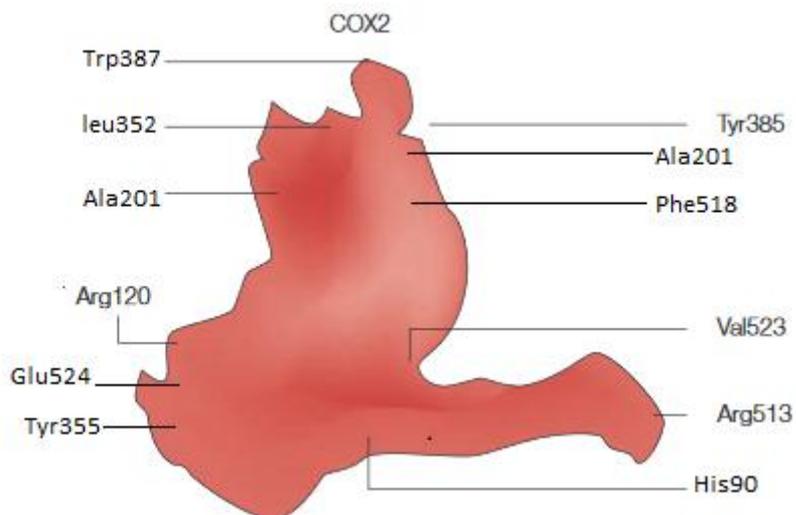


Figure III.5 : Les résidus essentiels constituant les sites actifs de COX-2.

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

Les sites actifs de la COX-1 et de la COX-2 présentent des structures tridimensionnelles très similaires et parmi les acides aminés conservés entre les 2 isoforme, certains se révèlent être essentiels :

L'Arg 120 (située à l'entrée du site et intervenant dans la liaison des anti-inflammatoires Non-stéroïdiens (AINS) et de l'AA), la Tyr 385 (qui intervient dans la réaction de cyclooxygénation) et la Ser 530 (qui établit une liaison covalente notamment avec l'aspirine lors de la réaction d'acétylation). [130]

Le site actif de COX-2 est divisé en trois régions importantes, la première étant une poche hydrophobe définie par Tyr385, Trp387, Phe518, Ala201, Tyr248 et Leu352; la deuxième région étant l'entrée du site actif bordée des résidus hydrophiles Arg120, Glu524, Tyr355 et la troisième est une poche latérale bordé par His90 Arg513 et Val523. (Figure III.5)

### III .5. Etude de docking moléculaire:

La fonction docking utilisée était le MolDock [GRILLE] avec une résolution de grille de 0.30Å°. "L'optimiseur" MolDock a été choisi comme l'algorithme de recherche avec un nombre de tour égale à 30.

La meilleure pose du ligand dans le site actif de l'enzyme a été choisie selon le meilleurs MolDock Score.

La fonction docking "MolDock Score" employée par MVD est une dérivée de la fonction PLP, proposées par Gehlhaar et al, et développée par Yang et al. [131]

Cette fonction contient des termes additifs des énergies des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, et des interactions hydrophobiques.

Escore =  $E_{inter} + E_{intra}$  D'où  $E_{inter}$  : Energie d'interaction protéine-ligand.

$E_{intra}$  : Energie interne de ligand.

### III .6. Résultats du Docking moléculaire :

Le logiciel Molegro Virtuel Docker (MVD) par le programme Moldock, nous a permis de positionner les inhibiteurs dans le site actif de l'enzyme simplifié.

Le score de MVD des meilleures poses pour l'étude l'interaction entre les ligands et les résidus du site actif, dans la cavité 3 sont reportés dans le Tableau III.2, qui présente l'énergie d'interaction entre le ligand et la protéine, marqué par MolDock et l'énergie de liaison hydrogène de chaque ligand.

### Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

**Tableau III.3** : Résultats de docking moléculaire des ligands avec la cavité 3 de COX-2 :

Ligand	Moldock	E (stérique)	E (VdW)	E-Total	H Bond	MW
L1	-177.519	-12.8384	40.4403	-170.121	-5.50069	415.433
L2	-121.582	41.5932	249.344	-79.9779	-1.05452	285.27
L3	-170.447	-11.2574	29.232	-174.507	-4.45309	401.407
L4	-158.5	-9.03247	-161.899	-161.899	-5.04025	373.353
L5	-181.128	-10.4841	26.2609	-183.453	-5.06945	415.39
L6	-179.768	-16.2868	21.9249	-182.78	-3.84607	417.363
L7	-168.657	-10.6916	27.0461	-170.521	-5.93798	385.364
L8	-181.801	-11.1645	25.3666	-191.366	-4.42354	427.424
<b>L9</b>	<b>-193.324</b>	-17.1261	34.0142	-191.776	-5.12482	427.444
<b>L10</b>	<b>-185.912</b>	-10.7334	36.5667	-184.156	-5.16162	429.417
L11	-165.954	-2.75859	50.6849	-165.031	-2.39265	381.372
L12	-174.504	0.723175	51.7502	-165.797	-4.2579	395.427
L13	-154.194	-6.27316	86.4669	-151.283	-4.78626	393.409
<b>L14</b>	<b>-188.853</b>	-17.1345	36.0732	-184.887	-4.15972	411.426
L15	-163.358	-11.0753	39.5019	-164.884	-5.85897	407.438
L16	-185.096	-6.95936	35.2927	-185.619	-7.08129	426.416
L17	-167.259	-6.63164	33.2056	-164.384	-7.35345	402.395
L18	-179.401	-8.81854	25.8542	-182.247	-7.69268	402.395
L19	-169.925	-11.2633	37.1173	-161.154	-8.43139	430.405
L20	-174.939	-7.28207	27.6444	-170.342	-8.46983	384.404
L21	-170.645	-7.71431	33.7465	-168.841	-9.17782	384.404
<b>L22</b>	<b>-192.334</b>	-10.4746	32.9726	-191.237	-6.79275	410.442
L23	-185.795	-14.6877	52.8036	-185.973	-5.27666	435.423
<b>L24</b>	<b>-193.372</b>	-10.6588	35.3855	-190.945	-7.91839	412.414
L25	-176.607	-8.40608	35.9004	-170.967	-4.05289	399.391
L26	-182.678	-12.411	38.9099	-184.16	-3.71214	427.444
L27	-171.706	-11.6936	43.1515	-160.674	-4.47127	425.428
L28	-175.126	-7.33196	37.1394	-173.733	-3.45611	395.427
L29	-152.521	-9.15945	33.5496	-153.876	-3.94277	383.416
L30	-177.201	-19.2971	19.8442	-184.447	-8.16918	418.351
L Réf	-151.467	-3.06071	51.9089	-152.256	-3.93439	314.356

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

- ✓ Liaison-H : Liaison d'hydrogène ; E (stérique) : Énergie stérique ; E (VDW) : Énergie de Van der Waals.
- ✓ MolDock Score calculé par la somme d'interaction externe et interne de ligand (interaction protéine-ligand).
- ✓ Énergie d'interaction totale entre la pose et les molécules cibles.

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Les forces intervenant dans la formation du complexe peuvent être de nature stérique, électronique ou les deux avec des contributions différentes. Les états conformationnels choisis lors de l'interaction ne sont pas nécessairement ceux de plus basse énergie en solution, mais des états transitoires stabilisés par celle-ci. Les complexes formés sont alors plus stables que les formes dissociées. Cette association intermoléculaire est stabilisée par plusieurs effets et des liaisons non covalentes. Au niveau du processus biochimique, elles s'expriment par différentes interactions : électrostatiques, hydrophobiques, de Van Der Waals et des ponts hydrogène [132].

D'après les résultats obtenus, on remarque que les complexes formés par les ligands L9, L10, L14, L22 et L24 possèdent une énergie (MolDock Score) le plus faible possible par rapport aux autres ligands.

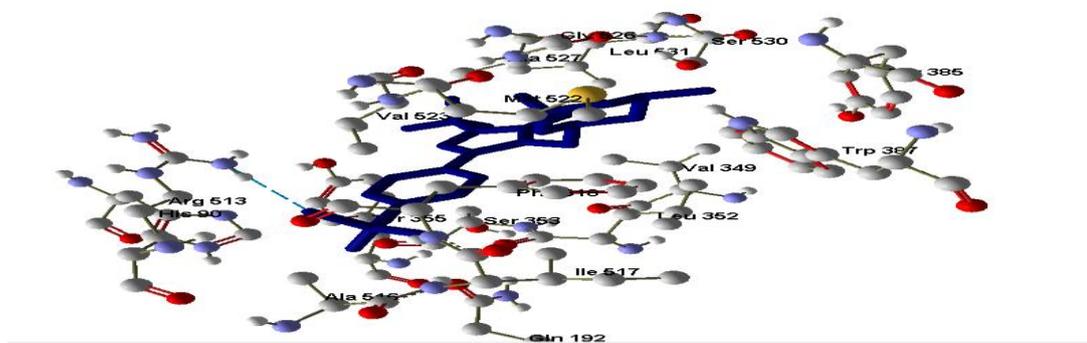
On peut citer aussi que le complexe formé par le ligand **L24** a une énergie d'interaction plus basse que celle des autres complexes.

L'énergie d'interaction, l'interaction d'hydrogène et E<sub>stérique</sub> pour les cinq ligands L9, L10, L14, L22 et L24 classés dans l'ordre suivants :

L24 < L9 < L22 < L14 < L10

Pour confirmer nos résultats nous avons représenté dans la figure suivante les différentes interactions entre les résidus du site actif et les 5 ligands.

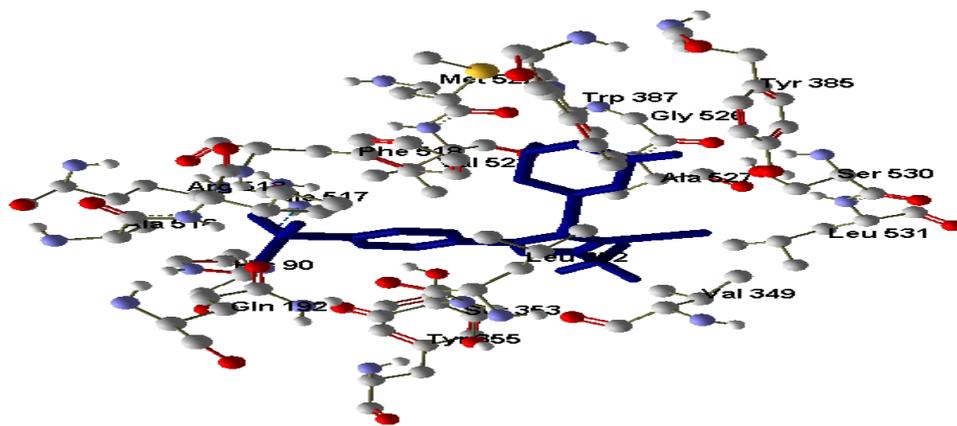
L9



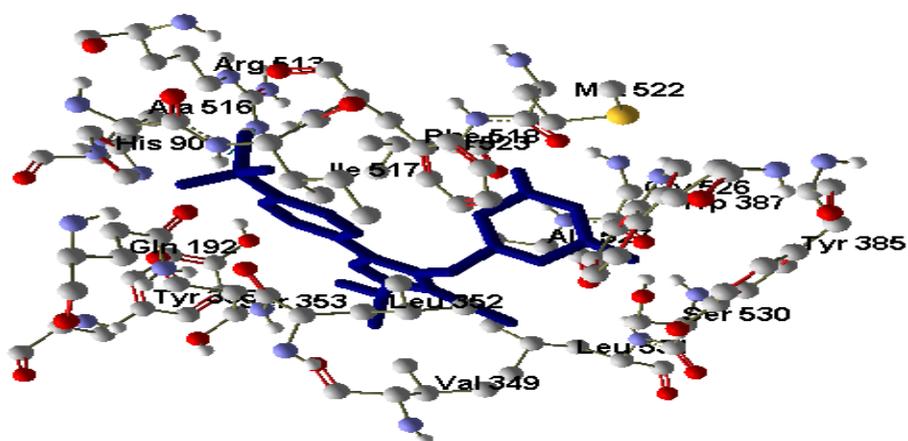
**Figure III.6 :** Interaction entre les ligands et les résidus du site actif de la cavité 1

(suivre)

L10



L14



L22

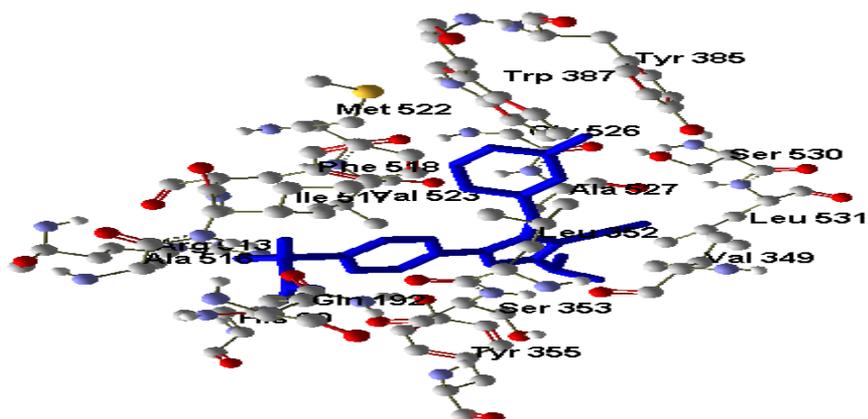
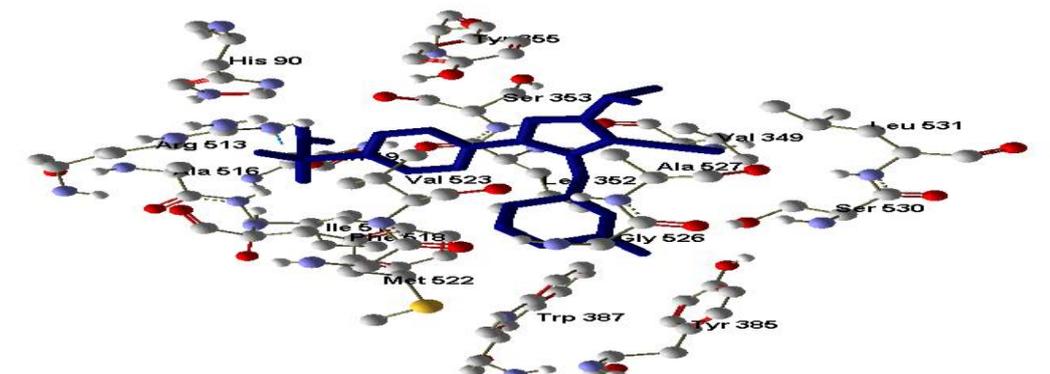


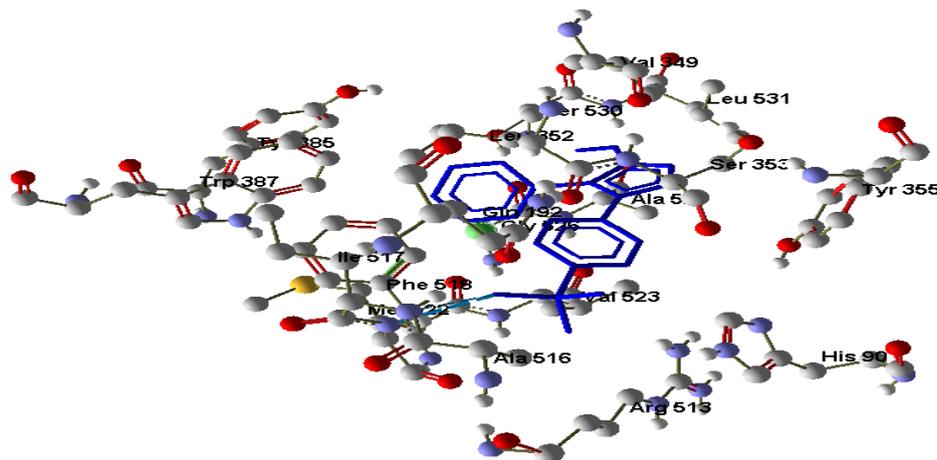
Figure III.6 : Interaction entre les ligands et les résidus du site actif de la cavité 1

(suivre)

L24



Lref

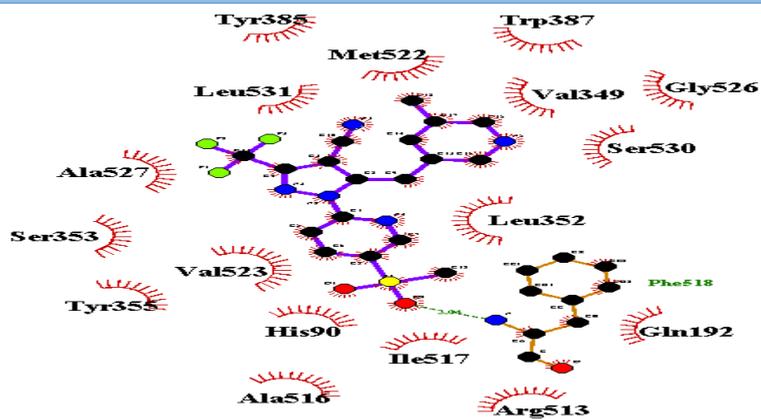


**Figure III.7:** Interaction entre les ligands et les résidus du site actif de la cavité 1.

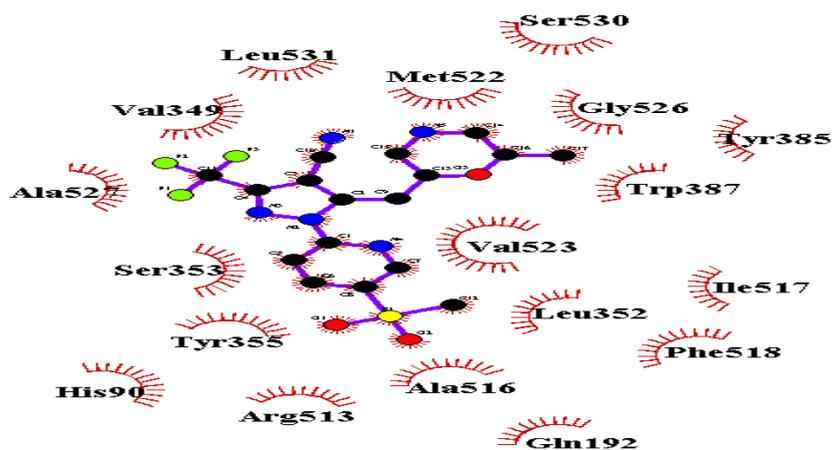
Les représentations bidimensionnelles de la meilleure pose de docking pour les composés de pyrazole et du vioxx dans l'enzyme cible ont été générées en utilisant **LigPlot+ v.1.4.5**. C'est un programme informatique qui génère l'image bidimensionnelle schématique des complexes protéine-ligand ancrés. La structure tridimensionnelle du complexe ancré est entrée en tant que fichier PDB et le logiciel produit leurs résidus et liaisons interagissant. Dans la présente étude, LigPlot + a été utilisé pour identifier les résidus en interaction ainsi que les liens d'interaction entre 5KIR et les inhibiteurs ancrés.

# Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

L9

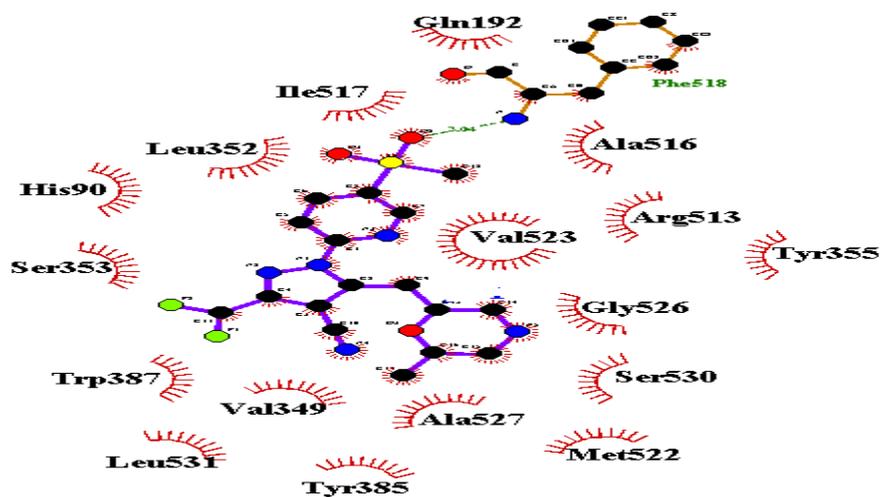


L10



Skir

L14

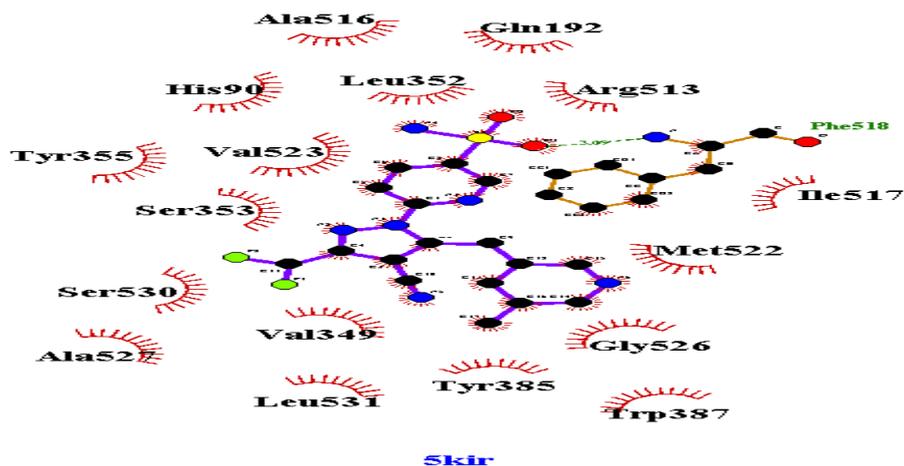


Skir

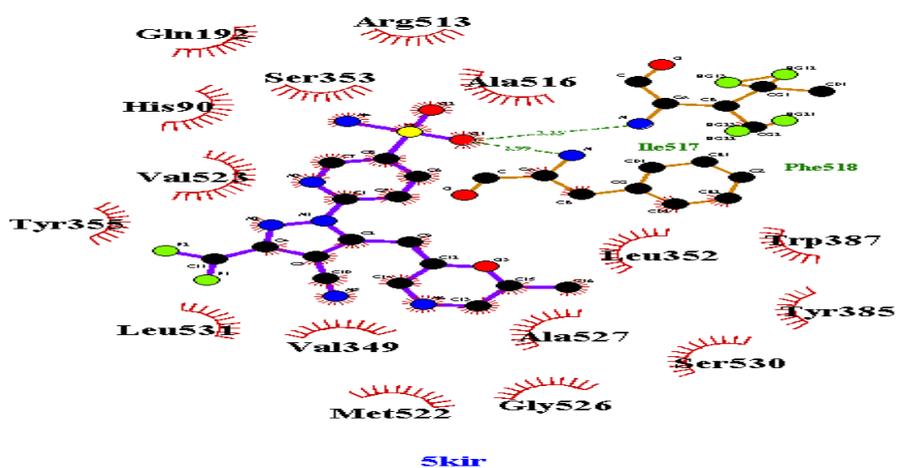
**Figure III.7 :** résultats DE Ligplot + montrant les interactions des 5 composés et VIOXX avec 5KIR. (suivre)

# Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

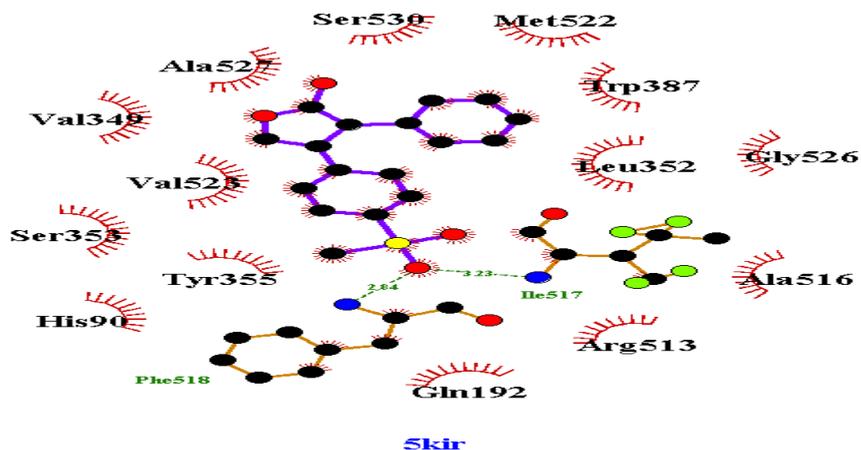
L22



L24



Lref



The meaning of the items on the plot is as follows:

- Ligand bond
- Non-ligand bond
- Hydrogen bond and its length
- Non-ligand residues involved in hydrophobic contact(s)
- Corresponding atoms involved in hydrophobic contact(s)

**Figure III.7** : résultats de Ligplot + montrant les interactions des 5 composés et VIOXX avec 5KIR.

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

Les résultats montrent que l'inhibiteur voixx (ligand de référence) nombreux contacts avec des résidus d'acides aminés (principalement de nature hydrophobe), tandis que fragment méthylsulfone occupe la poche latérale du canal cyclooxygénase et le cycle phényle étendu vers la chaîne latérale de Tyr385 (Figure III.7). Les atomes d'oxygène (O) de la fraction méthylsulfone de l'inhibiteur ont fait les seules interactions hydrophiles significantes avec les atomes N de la chaîne latérale de His90 et Arg513, respectivement, positionnés à la base de la poche latérale.

On observe la présence de deux ponts hydrogène formés entre l'atome d'oxygène de fonction méthylsulfone et les résidus Phe315, Ile517.

Les interactions de chaque composé avec les résidus fonctionnels de 5kir ont démontré que tous les ligands interagissent avec la plupart des résidus dans la poche de liaison comme le montre la Figure III.7.

Les cinq meilleurs composés en interaction sont:

Le composé L9 s'est avéré présenter 4 interactions de liaisons hydrogène avec Ile517, Phe518, Met525 et Tyr355. Il a une interaction hydrophobe avec Ala516, Leu352, Arg513, Ala516, Val523, Ser 353, Met522, Trp387, Tyr385, His90, Tyr385.Gln192. Val349, Gly526. . et Ser530 La fixation des AINS sur la Ser530 bloque l'accès du canal hydrophobe l'acide arachidonique qui ne peut plus être converti en PGs [133]

Le composé L10 a montré deux liaisons hydrogène interaction avec les résidus d'acides aminés du site actif Met522 et Tyr355 et La molécule est stabilisée par d'autres interactions de type hydrophobique faisant intervenir les résidus Ala516, Leu352, Arg513, Ala516, Val523, Ser 353, Met522, Trp387, Tyr385, His90, Gln192. Val349, Gly526.

L10 occupe la poche adjacente contenant l'His90 et l'Arg513.

Le composé L14 s'est avéré n'avoir trois interactions de liaison hydrogène avec la protéine Tyr355, Phe 518 and Ile517 et a obtenu une interaction hydrophobe avec Ala516, Leu352, Arg513, Ala516, Val523, Ser 353, Met525, Trp387, Tyr385, His90, Tyr355.Gln192. Val349.

Le composé L24 pour montrer 6 liaisons hydrogène interaction avec Gln192, Leu 352, Phe518 ; Ile517, Tyr355 and Met522. Et l'interaction majeure de ce composé avec l'enzyme est principalement hydrophobe avec Ala527, Leu352, Arg513, Ala516, Val523, Ser 353, Met522, Trp387, Tyr385, Phe 518, His90, Tyr355 du site actif COX-2.

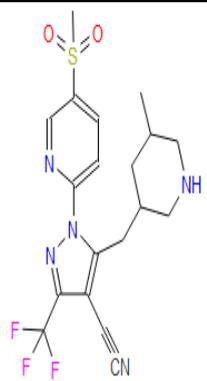
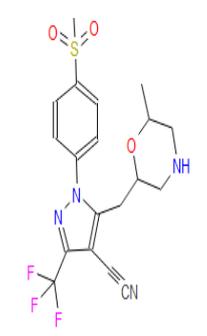
## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

Cependant, on a trouvé que le composé L22 présentait 7 interactions de liaisons hydrogène Gln192, Leu 352, Phe518, Ile517, Tyr355, Ser353and Met522 et l'interaction hydrophobe avec Ala516, Leu352, Arg513, Val523, Ser 353, Met522 ; Ile517 ; Tyr385, His90, Tyr355.

Parmi les amino acides du site actif de l'enzyme qui ont établi des liaisons H, deux interagissent avec tous les ligands, ce sont : Phe518, Ile517.

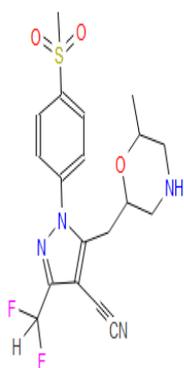
D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les interactions mises en jeu entre les résidus de site actif et les ligands L9, L10, L14, L22 et L24 peut former des complexes stables. Les distances mesurées entre ces résidus et les cinq ligands sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau III.4 :** Distance (Hydrogènes) mesuré en Å entre les résidus du site actif et les atomes des ligands L9, L10, L14, L22 et L24

Ligands	<i>E-Inter total</i>	Interaction	Interaction distance(Å)	Interaction strength (Kcal/Mol)	
	<b>-193.324</b>	<b>H-bond</b>	Ile517.....O	3.36	-0.83
			Phe518....O	3.04	-2.47
			Met525....N	2.60	-1.00
			Tyr355...N	3.35	-1.26
	<b>-185.912</b>	<b>H-bond</b>	Met522...N	2.61	-1.17
			Tyr355....N	3.22	-1.88

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

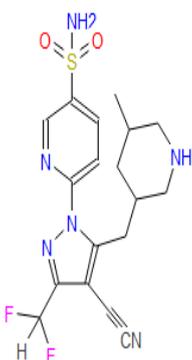
L14



**-188.853**

H-bond			
	Tyr355.....N	3.39	-1.07
	Phe518.....O	3.04	-2.47
	Lle517.....O	3.37	-0.81

L22



**-192.334**

H-bond			
	Gln192....N	2.61	-0.97
	Leu352....N	3.29	-1.19
	Phe518...O	3.09	-2.49
	Lle517...O	3.37	-0.85
	Tyr355...N	3.10	-2.50
	Met522...N	2.65	-0.67

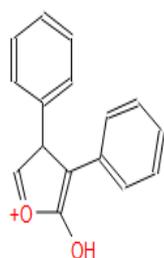
L24



**-193.372**

H-bond			
	Gln192....N	2.61	-1.13
	Leu352....N	3.31	-0.94
	Phe518...O	2.99	-2.50
	Lle517...O	3.25	-1.19
	Tyr355...N	3.28	-1.61
	Met522...N	2.67	-1.23
	Ser353...N	3.33	-0.72

LRé  
f



**-151.467**

H-bond			
	Phe518...O	2.84	-2.50
	Lle517...O	3.23	-1.16

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

En se basent essentiellement sur les liaisons hydrogènes, la liaison hydrogène joue un rôle important dans de nombreux processus chimiques et biologiques, y compris la liaison du ligand et la catalyse enzymatique. La considération des propriétés de liaison hydrogène dans la conception de médicaments est importante en raison de leur forte influence sur la spécificité des propriétés de liaison, de transport, d'adsorption, de distribution, de métabolisation et d'excrétion des petites molécules.

Les interactions ayant des distances comprises entre 2.5 Å et 3.1 Å sont considérés comme fortes, celles ayant des distances comprises entre 3.1 Å et 3.55 Å sont supposés moyennes et quand leurs distances sont supérieures à 3.55 Å, elles sont considérées faibles [134].

Dans les Tableau III.4 précédent nous pouvons facilement constatés que les distances entre les résidus du site actif et les ligands L9, L10, L14, L22 et L24 varient dans l'intervalle 2.60 - 3.36, 2.61 – 3.22, 3.04 – 3.39, 2.61– 3.37 et 2.61 – 3.31 respectivement, ceci montre qu'il existe deux types d'interactions : forte et moyenne entre ces résidus et le ligand L9, L10, L14, L22 et L24.

### III .7. La règle de Lipinski:

Les conditions empiriques pour satisfait la règle de Lipinski et manifeste une bonne biodisponibilité orale impose un équilibre entre la solubilité aqueuse d'un composé et sa perméabilité par diffusion passive dans les différentes membranes biologiques.

Ces paramètres permettent de déterminer l'absorption orale ou la perméabilité de la membrane qui se produit lorsque la molécule évaluée suit la règle de cinq de Lipinski :

- ✓ la masse moléculaire  $\leq 500$  u.m.a,
- ✓ le coefficient de partage octanol-eau  $\log P \leq 5$ ,
- ✓ liaison hydrogène donneurs, atomes d'azote ou oxygène avec un ou plusieurs atomes d'hydrogènes  $\leq 5$ ,
- ✓ liaison hydrogène accepteurs, atomes d'azote ou oxygène  $\leq 10$ .

Les molécules qui ne réalisent pas au moins deux de ces conditions présentent des violations et peuvent y avoir des problèmes de biodisponibilité orale. Cette règle stabilise quelques paramètres structuraux on basant sur la prédiction théorique de la biodisponibilité, et souvent utilisée pour la recherche de nouveaux médicaments. [135].

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

**Tableau III.5:** les paramètres de Lipinski des dérivés de pyrazole :

Composé	N°ON	N°OHNH	M (uma)	LogP	Nombre de violations
L9	7	1	427.45	2.58	0
L10	7	1	428.44	1.40	0
L14	7	1	410.45	1.04	0
L22	8	3	410.45	1.61	0
L24	9	3	412.42	0.56	0
LRéf	2	1	237.28	-0.17	0

Note : Le calcul de ces paramètres est réalisé par : molinspiration. [136]

**M** : poids moléculaire ;

**nOH,NH** : nombre de donneurs de liaisons H ;

**nO,N** : nombre d'accepteurs de liaisons H ;

**logP** : logP ou coefficient de partition calculé ;

### III .7.1. Interprétation :

Les liaisons hydrogène augmentent la solubilité dans l'eau et doivent être rompues pour que le composé pénètre dans et à travers la membrane bicouche lipidique. Ainsi, un nombre croissant de liaisons hydrogène se divise de la phase aqueuse dans la membrane bicouche lipidique pour la perméation par diffusion passive [137].

Le poids moléculaire (MW) est lié à la taille de la molécule. Lorsque la taille moléculaire augmente, une cavité plus grande doit être formée dans l'eau pour solubiliser le composé.

Le poids moléculaire est inférieur à 500 DA. Plus le MW est petit, meilleure absorption. Les cinq composés de la série choisie sont inférieurs à 500 DA, ainsi ils peuvent facilement passer à travers la membrane cellulaire.

La Log P est utilisée pour prédire la solubilité du médicament oral, ceci se fait en divisant la molécule entre l'eau et le solvant hydrophobe n-octanol et en déterminant la valeur de P comme le rapport de la concentration du composé dans le n-octanol et celui dans l'eau. Si la Log P augmente, la solubilité dans l'eau diminue de sorte que l'absorption diminue. D'une part, une valeur négative pour le log P indique que le composé est trop hydrophile. Il a donc une bonne

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

solubilité dans l'eau, une meilleure tolérance gastrique et une élimination efficace par les reins. D'autre part, une valeur positive pour le log P indique que le composé est trop lipophile. Donc, il a une bonne perméabilité à travers la membrane biologique, une meilleure liaison aux protéines plasmatiques, l'élimination par le métabolisme, mais une mauvaise solubilité et la tolérance gastrique [138].

Les cinq composés de la série choisie ayant les valeurs de la logP inférieure à 5 (tableau III-5).donc ils ont une bonne solubilité dans l'eau, une meilleure tolérance gastrique et une élimination efficace par les reins et une bonne perméabilité à travers la membrane cellulaire.

Le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène (O et N atomes) et le nombre de donneurs de liaison hydrogène (NH et OH) se sont révélés critiques dans un contexte de développement de médicaments car ils influencent l'absorption et la perméation [139].

Ceux-ci se trouvent être dans la limite de Lipinski, c'est-à-dire moins de 10 et 5, respectivement, dans les composés testés.

Les résultats du tableau montrent que les 5 composés s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères imposés par la règle de Lipinski

### **III .8. Admet (absorption, distribution, métabolisme, élimination et toxicité) :**

Les principales raisons de l'échec des molécules en cours de développement d'un médicament sont le manque d'efficacité chez l'homme et les problèmes de pharmacocinétique. Chaque médicament éventuel doit se conformer à plusieurs critères de base, tels son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité.

Les propriétés pharmacocinétiques telles que l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité des composés peuvent être prédites à l'aide de la base de données ADMETSAR ([http:// www.admetexp.org](http://www.admetexp.org)). Cependant, la pénétration de BBB (Blood Brain Barrier), la perméabilité des cellules Caco-2 HIA (Human Intestinal Absorption) et le test d'Ames ont été calculés en utilisant ADMETSAR.

Dans l'ADMETSAR, des outils de requête basés sur le Web pour la création d'une interface de construction moléculaire permettent à la base de données d'être interrogée par SMILES et la

### Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

recherche de similarité structurelle. Il fournit les données les plus récentes et les plus complètes sur commande pour divers produits chimiques associés aux profils ADMET connus [140]

Les données ADMET prédites ont été résumées dans le tableau.

Les composés **L9, L10, L14, L22 et L24** ont des meilleurs scores d'absorption intestinale humaine (HIA) que ligand référence. Une plus grande valeur de HIA indique le composé pourrait être mieux absorbé de la région intestinale sur l'administration par voie orale.

La pénétration à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB) a été la meilleure pour 19 et était significativement plus élevée que la molécule de référence (0,9 et 0,8, resp.).

La super famille du cytochrome P450 joue un rôle important dans le métabolisme et la clairance du foie, et les isoformes les plus importantes sont le CYP1A2, le CYP2A6, le CYP2C9, le CYP2C19, le CYP2D6, le CYP2E1 et le CYP3A4 [141]. Ainsi, l'inhibition des isoformes du cytochrome P450 peut provoquer des interactions médicamenteuses dans lesquelles les médicaments coadministrés ne sont pas métabolisés et s'accumulent à des niveaux toxiques [142]. Le CYP 2D6 et le CYP 3A4 sont des enzymes isoformes importantes impliquées dans le métabolisme des médicaments, Le CYP 3A4 est connu pour métaboliser la moitié des médicaments. Ainsi, la prédiction de l'inhibiteur de CYP est d'une grande importance dans le développement de médicaments.

Les résultats ont montré que tous les composés n'étaient pas des inhibiteurs du CYP 2D6 et non-substrat pour tous les paramètres cinétiques (Tableau III.6). Les résultats suggèrent que ces composés pourraient être bien métabolisés par le CYP 2D6, facilement éliminés du corps et causant ainsi peu de toxicité.

Cependant, il a également été noté que tous les composés inhibaient l'enzyme CYP 3A4 (Tableau III.6), tandis que L21, assimilé à L ref était non-substrats aux CYP 3A4 suggérant d'être éliminés sans provoquer de toxicité significative. Une analyse plus poussée a montré que les dérivés L10.L14 .L9 et L23 étaient prédits être substrat au CYP 3A4.

Le test de toxicité AMES est employé pour savoir si un composé est mutagène ou non. Similaire au ligand référence, tous les ligands de test affichés test de toxicité AMES négatif qui signifie que les ligands sont non mutagènes. Profile cancérigène a également révélé que les ligands étaient non cancérigènes similaires à ligand référence.

Informations importantes obtenues de Le serveur admetSAR était la dose de LD50 calculée dans le modèle du rat. En comparant les doses de DL50, un composé à dose plus faible est plus

## Chapitre III : ETUDE PRATIQUE

mortel que le composé ayant une DL50 plus élevée. De notre observation, nous avons constaté que tous les ligands avaient la plus élevée le DL50, comparé au ligand référence (2,2047).

Notre étude admetSAR a révélé que, en comparant et en analysant tous les paramètres, L9 pouvait être projetée comme un puissant inhibiteur de COX2. Ses propriétés ADMET ont montré beaucoup de similitude avec ligand référence VIOXX qui est déjà dans l'essai clinique avancé.

Le composé 19 présentait le meilleur score de bioactivité en ce qui concerne tous les composés et le voixx.

**Tableau III.6:**L'ADMET profile des ligands de test et ligand référence.

ligand	HIA	BBB	CYP3A4	CYP2D6	AMES toxicité	Carcinogènes	LD50 in rat
<b>L Réf</b>	0.9244	0.7799	Non-inhibiteur/Non-substrat	Non-inhibiteur/Non-substrat	Non AMES toxic	Non-carcinogènes	2.2047
<b>L9</b>	1.0000	0.9195	Inhibiteur/substrat	Non-inhibiteur/Non-substrat	Non AMES toxic	Non-carcinogènes	2.7467
<b>L10</b>	1.0000	0.7924	Inhibiteur/substrat	Non-inhibiteur/Non-substrat	Non AMES toxic	Non-carcinogènes	2.6688
<b>L14</b>	1.0000	0.7994	Inhibiteur/substrat	Non-inhibiteur/Non-substrat	Non AMES toxic	Non-carcinogènes	2.6534
<b>L22</b>	1.0000	0.8859	Inhibiteur/Non-substrat	Non-inhibiteur/Non-substrat	Non AMES toxic	Non-carcinogènes	2.5630
<b>L24</b>	1.0000	0.7310	Inhibiteur/substrat	Non-inhibiteur/Non-substrat	Non AMES toxic	Non-carcinogènes	2.5290

**BBB:** Blood-Brain Barrie Non-Inhibiteur.

**HIA:** Human Intestinal Absorption.



*CONCLUSIÓN  
GÉNÉRALE*

## Conclusion Générale

Notre travail avait pour but de nous initier aux outils de la simulation informatique et de développer nos compétences en particulier en docking moléculaire afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la cyclooxygénase-2. Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé plusieurs étapes :

La première étape : L'optimisation de tous les ligands (Tableau III.1) a été effectuée par le programme HyperChem (8.07) en utilisant la mécanique moléculaire avec le champ de force (MM+), puis la méthode semi empirique AM1.

La deuxième étape :

Le docking moléculaire des 30 inhibiteurs étudiés envers le site actif de la COX-2 a permis d'étudier les mécanismes d'inhibition mises en jeu tout en évaluant leur affinité.

Suite à cette étude, il ressort que les cinq composés se présentent comme meilleurs inhibiteurs de COX-2 avec un MolDock égale à -151.467.

Nous avons pu élucider les mécanismes d'interaction entre cyclooxygénase-2 et 30 inhibiteurs par visualisation des différents types des interactions mis en jeu.

Tous les composés interagissent avec la plupart des résidus de COX-2 dans la poche de liaison.

Les résultats de docking ont indiqué que les meilleurs des composés ont montré des interactions de liaison hydrogène avec Phe518, Tyr355 et Ile 517 et des contacts hydrophobes avec His90, Tyr385, Trp387 et Ser353.

La troisième étape : il est important de noter que les 5 meilleurs inhibiteurs de la Cyclooxygénase-2. Sont, en général, conformes aux critères imposés par la règle de Lipinski.

Les résultats montrent que les 5 composés s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères imposés par la règle de Lipinski.

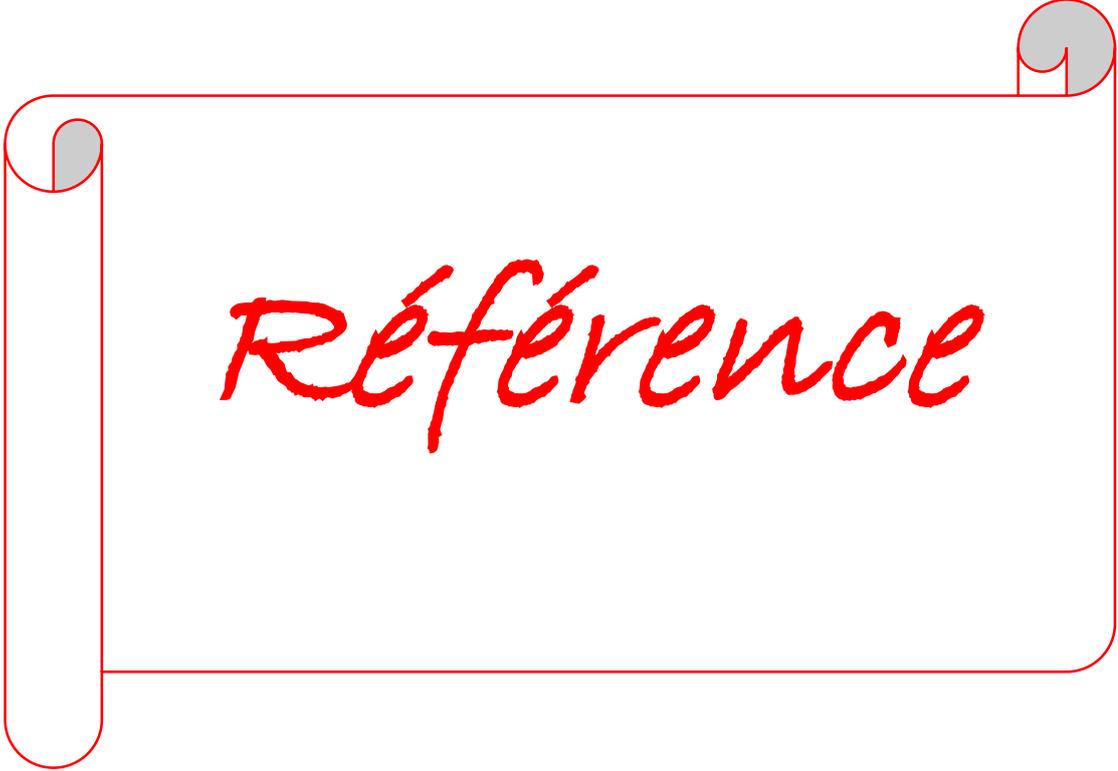
La quatrième étape : en fin La dernière partie de ce travail nous a permis nous renseigner sur les éventuelles propriétés biologiques d'absorption, de digestion, de métabolisme et d'excrétion des 5 composés.

Les résultats montrent que Le composé 19 présentait le meilleur score de bioactivité ( $bbb=0.9195$ ,  $ld50=2.7467$ ) en ce qui concerne tous les composés et le vioxx.

## *Conclusion Générale*

Les résultats ont montré que tous les composés n'étaient pas des inhibiteurs du CYP 2D6 et non-substrat pour tous les paramètres cinétiques. Les résultats suggèrent que ces composés pourraient être bien métabolisés par le CYP 2D6, facilement éliminés du corps et causant ainsi peu de toxicité.

Le résultat prometteur pour le composé 19 pourrait en outre être évalué pour générer de meilleurs candidats médicaments pour servir d'inhibiteurs de cyclooxygénase-2 pour le traitement anti inflammatoires.



*Référence*

## Références

- [1] Copeland R.A., Williams J.M., Giannaras J., Nurenb S., Covington M., Pinto D., et al.- Mechanism of selectiv inhibition of the isoform of prostaglandin G/H Shyntyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994 ., 91: 11202-1120. 2015 – 2016.
- [2] A. Grosdidier, Conception d'unlogiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives, thèse de doctorat, université Joseph Fourier, Grenoble, 2007.
- [3] Zheng, S.; Luo, X.; Chen, G.; Zhu, W.; Shen, J.; Chen, K.; Jiang, H. A New Rapid and Effective Chemistry Space Filter in Recognizing a Druglike Database *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2005**, *45*, 856-862.
- [4] Lipinski, C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today* **2004**, *1*, 337-341.
- [5] Eicher T, Hauptmann, S, (2003), Edition IInd, 'The Chemistry of Heterocycles : Structure, Reactions, Syntheses, and Applications', Wiley-VCH, ISBN 3527307206.
- [6] T. Eicher, S. Hauptmann, *the Chemistry of Heterocycles, Edition George ThiemeVerlag Stuttgart-New York*, **1995**, 179.
- [7] L. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1883**, *16*, 2597.
- [8] H. v. Pechmann, *Chem Ber*, **1898**, *31*, 2950.
- [9] (a) R. Huisgen, R. Grashley, H. Gotthardt, R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1962**, *1*, 48. (b) J. S. Clovis, W. Fliege, R. Huisgen, *Chem. Ber*, **1983**, *116*, 3062.
- [10] Terret, N. K.; Bell, A. S.; Brown, D.; Ellis, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 1996,1819
- [11] A- Gosselin, F.; O'Shea, P. D.; Webster, R. A.; Reamer, R. A.; Tillyer, R. D.; Grabowski, E. J. J. *Synlett* **2006**, 3267. b- Nakamichi, N.; Kawashita, Y.; Hayashi, M. *Synthesis* **2004**, 1015. c- Martin, R.; Rivero, M. R.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **45**, **2006**, 7079. d- Rosa, F. A.; Machado, P.; Vargas, P. S.; Bonacorso, H. G.; 28 Zanatta, N.; Martins, M. A. P. *Synlett* **2008**, 1673. e- Deng, X.; Mani, N. S. *J. Org. Chem.* **73**, **2008**, 2412. f- Hari, Y.; Tsuchida, S.; Sone, R.; Aoyama, T. *Synthesis* **2007**,3371.
- [12] LeBlanc R.; Dickson J. ; Brown T., M Stewart, Pati, H. N.; VanDerveer, D.; Arman, H.; Harris, J.; Pennington, W.; Holt, Jr., H. L.; Lee M., *Bioorg. Med. Chem.* **13**, **2005**, 6025.
- [13]a- Gerstenberger, B. S.; Rauckhorst, M. R.; Starr, J. T. *Org. Lett.* **11**, **2009**, 2097. b- Zhu, J., Bienamy, H., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**. c- Simon, C.; Constantieux, T.; Rodriguez, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4957. d- Murakami, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **42**, **2003**, 718. e- Jacobi Von Vangelin, A.; Neumann, H.; Gördes, D.; Klaus, S.; Strübing, D.; Beller, M. *Chem. Eur. J.* **9**, **2003**, 4286. f- Balme, G.; Bossharth, E.; Monterio, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4101.

## Références

- [14] Heller, S. T.; Natarajan, S. R., *Org. Lett.*, 8,13, 2006,2675.
- [15]Mikhaylichenko, S. N.; Patel, S. M.; Dalili, S.; Chesnyuk, A. A.; Zaplishny, V.N.; *Tetrahedron Lett*, 50, 2009, 2505.
- [16] Touzot A, Soufyane, M.; Berber, H.; Toupet, L.; Mirand, C., *J. fluorine Chem.*, 125, 2004, 1299.
- [17] Foster, R. S.; Jacobi, H.; Harrity, J. P. A., *Tetrahedron Lett.*, 52, 2011, 1506.
- [18] a- Padwa, A., *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, JohnWiley & Sons, NewYork, 1984, vol I. b- Gribble, G. W., in *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition toward Heterocycles and Natural Products*, ed. A. Padwa and W. H. Pearson, John Wiley & Sons, New York, 2002, pp. 68755.c- F. Dumitras cu, C.Draghici, D. Vuluga and M. T. Caproiu, *Rev. Roum. Chim.*, 51, 2006, 255.
- [19] Bendeddouche C.K. thèse de Doctorat, 2012 Université d’Oran.
- [20] Murat, B.S.; Valerija, M. Z.; Jochim, S.; Valerij, A. N.; *Tetrahedron Lett.*, 52, 2011, 341.30.
- [21]Kira M A, Abdel-Rahman M O, Gadalla K Z, *Tetrahedron Lett*, 2, **1969**, 109.
- [22]Kira M A, Nofal Z M, Gadalla K Z, *Tetrahedron Lett*, 48, **1970**, 4215.
- [23] Tewari R S, Parihar P, *Indian J Chem*, 19B, **1980**, 217.
- [24] Mazumdar A K D, Das S C, Karmakar P K, Saha N K, Banerji K D, *J Indian Chem Soc*, 69, **1992**,761.
- [25] Ram V J, Nath M, Chandra S, *Indian J Chem*, 33B, **1994**, 1048.
- [26]Kidwai M, Kumar P, Goel Y, Kumar K, *Indian J Chem*, 36B, **1997**, 175.
- [27]H. J. Roth; A. Liemann, <<*Pharmaceutical Chemistry*>>, Ed 2, Vol. 1, **1988**, p.213.
- [28]D. M. Bailey; P. E. Hansen; A. G. Hlavac; E. R. Baizman; J. Pearl; A. F. DeFelice ; M. E. Feigenson, *J. Med.Chem.*, **1985**, 28, 256.
- [29] F. H. H. Leenen; D. L. Smith; W. P. Unger, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1988**, 26, 481.
- [30]R. N. Mahajan; F. H. Havaladar; P. S. Fernandes, *J. Indian Chem. Soc.*, **1991**, 68, 245.
- [31]F. Lepage; B. Hubiot, *Eur. Pat. Appl. EP.*, 459, 887; [*Chem. Abstr.*, **1992**, 116, 128914].
- [32] G. A. Dutra; B. C. Hamper; D. A. Mischke; K. Moedritzer; M. D. Rogers, *PCT Int. Appl.*, WO 8206, 962; [*Chem. Abstr.*, **1992**, 117, 69859].
- [33] B. Natsume; N. Kyomura; K. Kikutake; T. Fukuch, *Eur. Pat. Appl. EP.*, 462, 573; [*Chem. Abstr.*, **1992**, 116, 128–916].
- [34]M. Londershausen, *Pestic. Sci.*, **1996**, 48, 269.

## Références

- [35] Windholz, << The Merck Index >>, 9th Ed.; Merck and Co., Rahway: New Jersey, **1976**, p.8851.
- [36] T. Nagametsu; T. Fujita; K. Endo, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2000**, *1*, 33.
- [37] A. Palomer; F. Cabre; J. Pascual; J. Campos; M. A. Trujillo; A. Entrena; M. A. Callo; L. Garcia; D. Mauleon; A. Espinosa, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1402.
- [38] S.G. Kucukguzel; S. Rollas; H. Erdeniz; M. Kiraz; A. C. Ekinici; A. Vidin, *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, *35*, 761.
- [39] M. J. Genin; D. A. Allwine; D. J. Anderson; M. R. Barbachyn; R. Michael; D. E. Emmert; S. A. Garmon; D. R. Graber; K. C. Grega; J. B. Hester; D. K. Hutchinson; J. Morris; R. J. Reischer; J. Robert; C. W. Ford; G. E. Zurenko; E. Gray; J. C. Hamel; R. D. Schaadt; D. Ronda; D. Stapert; B. H. Yagi, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 953.
- [40] M. J. Genin; C. Biles; B. J. Keiser; S. M. Poppe; S. M. Swaney; W. G. Tarpley; Y. Yagi; D. L. Romero, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 1034.
- [41] G. Daidone; B. Maggio; S. Plescia; D. Raffa; C. Musiu; C. Milia; G. Perra; M. E. Marongiu, *Eur. J. Med. Chem.*, **1998**, *33*, 375.
- [42] R. N. Comber; R. J. Gray; J. A. Secrist, *Carbohydrate Research*, **1991**, *216*, 441.
- [43] V. K. Tandon; D. B. Yadav; A. K. Chaturvedib; P. K. Shukla, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 3288.
- [44] L. M. Cole; R. A. Nicholson; J. E. Casida, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **1993**, *46*, 47.
- [45] M. Hosie; H. A. Baylis; S. D. Buckingham; D. B. Sattelle, *Br. J. Pharmacol.*, **1995**, *115*, 909.
- [46] M. E. Scharf; B. D. Siegfried, *Arch. Insect. Biochem.*, **1999**, *40*, 150.
- [47] E. Akbas; I. Berber, *Euro. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*, 401.
- [48] M. A. Ortega; M. E. Montoya; B. Zarranz; A. Jaso; I. Aldana; S. Leclerc; L. Meijerc; A. Mongea, *Bio. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 2177.
- [49] Jouzeau J.Y., Daouphars M., Benani A., Netter P. - Gastroentérologie clinique et biologique. 2011., *111*(10): 5821- 5865.
- [50] Knights K., Mangoni A., Miners J. -Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: Implications for understanding toxicity. *Expert Rev.*, 2011. *3*: 769-776.
- [51] Chandrasekharan V., Simmons D.L. – The cyclooxygenases, *Génome Biol.*, 2004., *5*(9): 241.

## Références

- [52] FLETCHER et al., 1992; KOSAKA et al., 1994
- [53] HINZ et BRUN, 2002
- [54] <http://atlasgeneticsoncology.org/extdef.html#GENECARD>
- [55] KNIGHTS et al. , 2010.
- [56] SPENCER et al. , 1998.
- [57] 31- Eschwège P., De Ledinghen V., Camilli T., Kulkarni S., Dalbagni G., Droupy S., Jardin A., Benoît G., Weksler B.B. Les cyclooxygénases. La presse médicale 2001 ; 30(10) : 511-514.
- [58] Picot Daniel, Loll Patrick J., Garavito Michael. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase 1. Nature 1994 ; 367(6460) : 243-249.
- [59] [http://untori2.crihan.fr/unspf/2009\\_Bordeaux\\_Nuhrich\\_AINS/co/Module\\_AINS\\_10.html](http://untori2.crihan.fr/unspf/2009_Bordeaux_Nuhrich_AINS/co/Module_AINS_10.html)
- [60] Hinz B., Brun K. - Cyclooxygenase-2 10 years later. *J. Pharmacol Exp.*, 2002. 300:367-75.
- [61] Rizzo M.T. - Cyclooxygénase-2 in oncogenesis. *Clinica Acta.*, 2011., 412 : 671-687
- [62] Astudillo A. M., Balgoma D., Balboa M.A., Balsinde J. - *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2012., 1821 (2) : 249-256.
- [63] Warner T.D., Mitchell J.A., - *Proceedings of the National Academy of Sciences. United States of America*, 2002., 99 : 13371-13373.
- [64] PHILIP et al., 2004 ; CHOI et al., 2005 ; PALAYOOR et al., 2005 ; CHAN et al., 2007 ; JOHNSON et al., 2008 ; ZRIEKI et al., 2008
- [65] FAURE S. ; Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, *Actualités pharmaceutiques*, 2009, n°489, 53-58.
- [66] Smith W.L. et Song I., 2002.
- [67] Figure établie à partir de Blomberg L.M. et coll., 2003
- [68] Figure établie à partir de Wang D. et DuBois R.N., 2004
- [69] Mitchell, J.-A. ; Evans, T.-W Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target *Inflamm Res* **1998**, 47, 88-92.
- [70] Defranceschi M. - *Chimie et médicaments* Ellipses Edition, Paris, 2011., p 79-85.
- [71] García A., Guillamon E., Villares A., Rostagno M.A., Martínez J. A., - *Inflammation Research* . 2009, 58 (9): 537-552.

## Références

- [72] Gallin J. I., Synderman R. - In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Lippincott Williams & Wilkins. *Washington*, 1999., 349-360.
- [73] Sobolewski C., Cerella C., Dicator M., - The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int.J. Cel. Biol* , 2010., 215 :53-58
- [74] A.R. Leach. *Molecular Modelling: Principles and Applications*, Prentice Hall, New Jersey, 2001.
- [75] J. Debord, *Introduction à la modélisation moléculaire*, 2004, 37-41.
- [76] Frenkel D, Smit B, *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. Academic Press, London, 2nd ed., 2002.
- [77] Leach A.R, *Molecular modeling. Principles and applications*. Prentice Hall, Harlow, 2nd ed, 2001.
- [78] Santiso E.E., Gubbins K.E., *Multi-scale molecular modeling of chemical reactivity*. *Molecular Simulation*, 2004, 30, 699-748.
- [79] G.S. Mala, S. Tekeuchi. *Understanding structural features of microbial lipases – an overview*. *Analytical Chemistry Insights*, 2008, 9-19.
- [80] H.Toulhoat. *Modélisation moléculaire - Bases théoriques : des propriétés microscopiques aux propriétés macroscopiques*. *Techniques de l'Ingénieur J*, 2007, 1-13 .
- [81] W.J. Geldenhuys, K.E. Gaasch, M. Watson, D.D. Allen, C.J. Van Der Schyf. *Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery*. *Drug Discovery Today*, 2006, 11, 127-132.
- [82] P. Braiuca, C. Ebert, A. Basso, P. Linda, L. Gardossi. *Computational* 2006, 24, 419-425.
- [83] A.J. Mulholland. *Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis*. *Drug Discovery Today*, 2005, 10, 1393-1402.
- [84] J.Damborsky, J. Brezovsky. *Computational tools for designing and engineering biocatalysts*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13, 26-34.
- [85] M. Laguerre, *Modélisation moléculaire et conception de nouvelles molécules*. *Bull Cancer* vol., 2007, 7, 94.
- [86] A. Soldera. *Modélisation moléculaire des polymères linéaires*. *Techniques de l'Ingénieur AF*, 2007, 6-042.
- [87] Bensegueni. A. *Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage)*

## Références

- moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Thèse de Doctorat : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie, 2007, 91p.
- [88] I. Soury-Lavergne Navizet, thèse de doctorat, Université Paris 6, France, 2004.
- [89] D. Van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen. GROMACS: fast, flexible and free. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26, 1701- 1718.
- [90] D.A. Pearlman, D.A. Case, J.W. Caldwell, W.S. Ross, T.E. Cheatham III, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, P. Kollman. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications*, 1995, 91, 1-41.
- [91] M. Rueda, C. Ferrer-Costa, T. Meyer, A. Pérez, J. Camps, A. Hospital, J.L. Gelpi, M. Orozco. A consensus view of protein dynamics. *PNAS*, 2007, 104, 796-801.
- [92] O. Guvench, A.D. MacKerrel Jr. Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 443, 63-88
- [93] R.R.S. Pissurlenkar, M.S. Shaikh, R.P. Iyer, E.C. Coutinho. Molecular mechanics force fields and their applications in drug design. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 2009, 8, 128-150.
- [94] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26, 1781-1802.
- [95] P. Rabinowitz, P.J. Davis. *Methods of Numerical Integration* 2007.
- [96] M.R. Hestenes, E. Stiefel. Methods of conjugate gradients for solving linear systems. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 1952, 49, 409-438.
- [97] [http://www.cegep-ste.foyy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/fya/chimcell/notesmolecules/proteines\\_1.htm](http://www.cegep-ste.foyy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/fya/chimcell/notesmolecules/proteines_1.htm).
- [98] J. Nocedal, S.J. Wright. *Numerical Optimization* 2006.
- [99] Morris, A.L.; MacArthur, M.W.; Hutchinson, E.G.; Thornton, J.M. Stereochemical quality of protein structure coordinates *Proteins* **1992**, 12, 345-364.
- [100] <http://kinemage.biochem.duke.edu/software/reduce.php>

## Références

- [101] Word, J.M.; Lovell, S.C.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of sidechain amide orientation *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1733-1745.
- [102] <http://sts.bioengr.uic.edu/castp>.
- [103] Lee, B.; Richards, F.M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol* **1971**, *55*, 379-400.
- [104] Bensegueni. A. Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Thèse de Doctorat : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2007. 91p.
- [105] D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson, Efficient unbound docking of rigid molecules, 2002
- [106] B. Coupez, R.A. Lewis. Docking and Scoring - theoretically easy, practically impossible? *Current Medicinal Chemistry*, 2006, *13*, 2995-3003.
- [107] A.R. Leach, B.K. Shoichet, C.E. Peishoff. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, *49*, 5851-5855.
- [108] D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson, Efficient unbound docking of rigid molecules, 2002.
- [109] B. Coupez, R.A. Lewis. Docking and Scoring - theoretically easy, practically impossible? *Current Medicinal Chemistry*, 2006, *13*, 2995-3003.
- [110] A.R. Leach, B.K. Shoichet, C.E. Peishoff. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, *49*, 5851-5855.
- [111] I. Helperin, B. Ma, H. Wolfson, R. Nussinov. Principles of dockings: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, 2002, *47*, 409-443.

## *Références*

- [112] B.D. Bursulaya, M. Trotoev, R. Abagyan, C.L. Brooks III. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2004, 17, 755-763.
- [113] M. Kontoyianni, L.M. McClellan, G.S. Sokol. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, 47, 558-565.
- [114] S.F. Sousa, P.A. Fernandes, M.J. Ramos. Protein-ligand docking : current status and future challenges. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, 2006, 65, 15-26.
- [115] N. Moitessier, P. Eglebienne, D. Lee, J. Lawandi, C.R. Corbeil. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: à long way to go. *British journal of Pharmacology*, 2008, 153.
- [116] J.A. Erickson, M. Jalaie, D.H. Robertson, R.A. Lewis, M. Vieth. Lessons in molecular recognition: the effects of ligand and protein flexibility in molecular docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, 47, 45-55.
- [117] S.J. Teague. Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2, 527-541.
- [118] O. Sperandio, M.A. Miteva, F. Delfaud, B.O. Villoutreix. Receptor-based computational screening of compounds databases: the main docking-scoring engines. *Current Protein and Peptide Science*, 2006, 7, 369-393.
- [119] M.I. Zavodszky, L.A. Kuhn. Side-chain flexibility in protein–ligand binding: The minimal rotation hypothesis. *Protein Science*, 2005, 14, 1104-1114.
- [120] J. Meiler, D. Baker. ROSETTALIGAND: Protein–small molecule docking with full side-chain flexibility. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 65, 538- 548.
- [121] C.R. Corbeil, P. Englebienne, N. Moitessier. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules-1. Development and validation of FITTED 1.0. *Journal of Chemical Informatic Modelling*, 2007, 47, 435-449
- [122] Helen M.Berman et col, The protein data bank, *nucléique acids research*, (2000), 28: 235-242.

## Références

- [123] B. Florent, Cours on line;" le docking moléculaire", Université de Paris7, ITODYS (CNRS UMR 7086), 2014.
- [124] Férey N, Bouyer G, Martin C, Drif A, Bourdot P, Ammi M, Nelson J, Burkhardt J-M, Autin L. Docking de protéines en Réalité Virtuelle : une approche hybride et multimodale. 2-soumission à RSTI, 2008, p 10.
- [125] ADMET FOR MEDICINAL CHEMISTS. Edited by KATYA TSAIOUN. STEVEN A. KATES. 2011 by John Wiley & Sons, Inc.
- [126] Pharmacokinetics in drug discovery and development / edited by Ronald D. Schoenwald. 2002 by CRC Press LLC.
- [127]El hadj said kenza, Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire ; univ Tlemcen ; 2016.
- [128]Protein Data Bank (PDB). Biological Macromolecular Resource. [En ligne]. <http://www.pdb.org/pdb/home>. Consulté le: [20-03-2017].
- [129] Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research, Vol. 69 No. 4 pp. 763ñ772, 2012
- [130] KNIGHTS K., MANGONI A., Miners J., 2010.- Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs:Implications for understanding toxicity. Expert Rev. Clin. Pharmacol. 3:769–776.
- [131] A. Imberty, K. D. J.Hardman,J.P.Caerver, S. Pérez :''Glycobiology,1991,1,631-642.
- [132] Bensegueni. A. Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Thèse de Doctorat : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2007. 91p.
- [133] Vane J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat. New Biol. ; 231 ; 232-235.
- [134] A.Imberty, K.D.Hardman, J.P.Carver, S.Pérez, '' Molecular of protein-carbohydrateinteractions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavaleine A''.Glycobiology., 1, 631-42 (1991).
- [135] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Adv. Drug. Deliv. Rev. 23,3. (1997).

## *Références*

- [136] Université de Bratislava. 1986. Molinspiration. <http://www.molinspiration.com/>.
- [137] T. Salah, S. Belaidi, N. Melkmi, and N. Tchouar, *Rev. Theor. Sci*, 3, 355 (2015).
- [138] S. Schultes, C. Graaf, E. Haaksma, J. P. Iwan, and O. Kramer, *J. Drug Discov. Today: Technologies* 7, 157 (2010).
- [139] G. W. Bemis and M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* 39, 2887 (1996).
- [140] (ADMETSAR @ LMMD).
- [141] Vasanthanathan P., Taboureau O., Oostenbrink C., Vermeulen N., Olsen L. and Jørgensen F., (2009) Classification of Cytochrome P450 1A2 Inhibitors and Noninhibitors by Machine Learning Techniques *Drug Metab Dispos* 37: (3), 658-664.
- [142] Lynch T. & Price A. (2007) The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects *Am Fam Physician*. 76: 391-396.

## Résumé :

L'inflammation fait partie de la réponse biologique complexe des tissus vasculaires aux stimuli nocifs, tels que les agents pathogènes, les cellules endommagées ou les irritants. La cyclooxygénase-2 (COX-2) joue un rôle important dans l'inflammation et constitue ainsi une cible moléculaire prometteuse pour le traitement de nombreuses maladies inflammatoires.

Le but de cette étude est de révéler les interactions de mode de liaison et de liaison hydrogène de nouveau pyrazoles avec l'enzyme Cyclooxygenase-2. Dans la présente étude nous décrivons les études de docking moléculaire pour une série de 30 nouveaux pyrazoles contre COX-2 en utilisant l'outil MolDock (Le logiciel Molegro Virtuel Docker (MVD)).

Une étude de docking moléculaire a suggéré que L9, L10, L14, L22 et L24 étaient de puissants inhibiteurs de COX-2, Les résultats de docking ont indiqué que les meilleurs des composés ont montré des interactions de liaison hydrogène avec Phe518, Tyr355 et L1e 517 et des contacts hydrophobes avec His90, Tyr385, Trp387 et Ser353. .

De plus, Molinspiration et les serveurs Web ADMETSAR permettent de calculer respectivement les propriétés ADMET et physico-chimiques des composés cibles.

Aucun des cinq meilleurs composés n'a violé les paramètres de Lipinski et d'admet, ce qui en fait des agents potentiellement prometteurs pour les activités biologiques.

Ces résultats fournissent une stratégie potentielle pour développer des inhibiteurs de la COX-2.

**Mots clés :** Molegro Virtuel Docker ; Docking moléculaire; Inhibiteur la cyclooxygénase-2; Interaction hydrophobique ; Liaison hydrogène.

### Abstract:

Inflammation is part of the complex biological response of vascular tissues to harmful stimuli, such as pathogens, damaged cells, or irritants. Cyclooxygenase-2 (COX-2) an important role in inflammation and thus they act as a promising molecular target for the treatment of many inflammatory diseases.

The aim of this study is to reveal the binding mode and hydrogen bond interactions of novel pyrazoles with Cyclooxygenase-2 enzyme. In the present study; we describe the molecular docking studies for a series of 30 novel pyrazoles against COX-2 using Glide tool (Le logiciel Molegro Virtuel Docker (MVD)).

Molecular docking study suggested that L9, L10,L14 ,L22 et L24 to be potent inhibitors of COX-2,The docking results indicated that best of the compounds have shown hydrogen bond interactions with Phe518, Tyr355 et L1e 517 and hydrophobic contacts with His90, Tyr385,Trp387 and Ser353.

Moreover, Mol inspiration and ADMETSAR web servers used to calculate ADMET and physicochemical properties of the target compounds respectively.

None of the five best compounds violated Lipinski's and admet parameters, making them potentially promising agents for biological activities.

These finding provides a potential strategy towards developing COX-2 inhibitors.

**Keywords:** Virtual Molegro Docker; Molecular Docking; cyclooxygénase-2, inhibitor;, Hydrophobic interaction; Hydrogen bond.