

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N°:



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE

FILIÈRE : CHIMIE

OPTION : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par:

ABED RAHMA
BELKAIBECH IKRAM

Intitulé:

**Etude 3D-QSAR et docking moléculaire de dérivés de pyrazoline
l'activité anti-amibienne contre la souche HM1:IMSS d'*E. histolytica*.**

Encadré par:

Dr. BOUACHA SAMIR

Année universitaire: 2021/2022

Remerciements

Au terme de cette étude, nous tenons à présenter nos sincères remerciements au bon dieu de nous avoir accordé la connaissance de la science et de nous avoir aidé à réaliser ce travail.

*Nous voulons très sincèrement remercier M. **BOUACHA Samir**, Enseignant à l'Université de M'sila pour avoir assuré l'encadrement de ce travail. Sa disponibilité, son expérience, son savoir scientifique et ses qualités humaines ont été déterminants dans l'aboutissement de ce travail.*

Nous remercions les membres de jury pour nous faire l'honneur d'examiner notre travail.

Pour terminer, nous adressons nos profondes reconnaissances à toutes celles et tous ceux que nous n'avez pas cités ici et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, sans oublier nos famille, sans eux nous n'aurions pas pu continuer.

Dédicaces

Je dédie ce travail aux êtres les plus chers du mon cœur :

A Mon cher père

Aucune dédicace, ne saurait exprimer mon grand respect, et ma reconnaissance pour les sacrifices que tu as consentis pour mon éducation. J'implore dieu le tout puissant de vous accorder bonne santé, longue vie.

A la mémoire de ma chère mère.

Je ne saurais exprimer mon grand chagrin en ton absence. J'aurais aimé que tu sois à mes côtés ce jour, que ce travail soit une fierté pour toi. Puisse dieu puissant l'avoir en sainte miséricorde

A mes sœurs et mes frères

Ames chères sœurs et mon frère, que le dieu puissant vous donne de santé, bonheur, courage et surtout réussite. A toutes mes amies de près ou de loin, . «À toute personne qu'elle m'a encouragée depuis que j'ai commencé ».

Rahma

Je dédie:

A ma chère mère,

A mon chère père,

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs

A mes chères sœurs

Rihab, Khawla, Tasnime , les plus belles-sœurs

A mes grand-père et grand-mère,

Ahemd et Mouhammed et Oum barka, que dieu ait pitié d'eux, j'espère qu'ils sont fiers de moi

A mon grand-mère

Aicha ,qui je souhaite une bonne santé.

A ma chère binome

Rahma, pour sa entente et sa sympathie.

A mes chères amies

Chaima, Selma, Khaira, Fatima, Aya, Djomana, pour leur aides et supports dans les moments difficiles.

A toute mes collègues.

A toute ma famille.

Ikram

ملخص:

نشاط ضد سلالة IMSS : Histolytica HM1 باستخدام برنامج PHASE (برنامج Schrodinger). تم تطبيق نموذج D-QSAR3 القائم على المجال على سلسلة (44 مركبًا) من مشتقات البيرازولين. تم الحصول على أفضل التنبؤات باستخدام الحقول الغاوسية التي تجمع بين المجالات الساكنة ، والكهرباء الساكنة ، والكارهة للماء ، والمانحين المرتبطين بالهيدروجين والمقبول ($r = 0.83$ ، $q = 0.76$). تم استخدام خرائط الكنتور التي تم إنشاؤها بواسطة النماذج الميدانية المثلى QSAR لاكتشاف الخصائص الهيكلية المرتبطة بالنشاط البيولوجي لهذه العائلة من الجزيئات المتشابهة. تم إجراء دراسات الالتحام القائمة على الهيكل لتوضيح التفاعلات بين الجزيئات بين مشتقات البيرازولين ومستقبل ZEF5. يظهر الرابطان النشطان 35 و 36 أعلى درجة من النشاط والتوحيد. تم إجراء ADMET أيضًا في تحليل السيليكو لهذه الروابط التفاعلية المحددة وكانت قيم جميع الخصائص ضمن نطاق القيمة الموصى به.

كلمات المفاتيح:

الأميبي ، نشاط بيولوجي ، بيرازولين ، DQSAR 3 ، الإرساء ، ADMET

Résumé:

L'activité anti-amibienne contre la souche HM1 : IMSS d'E. histolytica a été réalisée à l'aide du programme PHASE (Schrodinger software). Les modèles 3D-QSAR basés sur le champ ont été appliqués à une série (44 composés) de dérivés de la pyrazoline. La meilleure prédiction a été obtenue avec un champ gaussien combinant les champs stérique, électrostatique, hydrophobe, donneur et accepteur de liaison d'hydrogène ($r^2 = 0,83$, $q^2 = 0,76$). Les cartes de contour résultant du meilleur modèle QSAR basé sur le champ ont été exploitées pour découvrir les propriétés structurales liées à l'activité biologique de cette série de molécules analogues. Des études de docking basées sur la structure ont été réalisées pour élucider l'interaction intermoléculaire entre les dérivés de la pyrazoline et le récepteur 5ZEF. Les ligands actifs 35 et 36 présentent la plus grande activité et les meilleurs scores de docking. Le criblage ADMET insilico de ces ligands actifs sélectionnés a également été réalisé et les valeurs de toutes les propriétés sont dans les limites des valeurs recommandées.

Mots clés :

Activité anti-amibienne, Modèle 3D-QSAR, Docking, Criblage ADMET, Dérivés de pyrazoline.

Abstract :

Activity against E. histolytica strain HM1: IMSS was performed using the PHASE program (Schrodinger software). Field-based 3D-QSAR models were applied to a series (44 compounds) of pyrazoline derivatives. The best prediction was obtained with a Gaussian field combining steric, electrostatic, hydrophobic, hydrogen bond donor and acceptor fields ($r^2 = 0.83$, $q^2 = 0.76$). The contour maps resulting from the best field-based QSAR model were exploited to discover structural properties related to the biological activity of this series of analogous molecules. Structure-based docking studies were performed to elucidate the intermolecular interaction between pyrazoline derivatives and the 5ZEF receptor. Active ligands 35 and 36 show the highest activity and docking scores. ADMET in silico screening of these selected active ligands was also performed and the values for all properties are within the recommended values.

Keywords:

Antiamibienne Activity, 3D-QSAR, Docking, Criblage ADMET, Pyrazoline derivative.

Table des matières

Introduction Générale	10
Chapitre I Activité anti-amibienne contre HM1 : souche IMSS d'E. histolytica	13
I.1 Introduction	14
I.2 Le parasite	14
I.2.1 La morphologie.....	14
I.2.2 L'épidémiologie	16
I.3 Le cycle parasitaire de l'amibiase	18
I.3.1 Symptômes	19
I.3.2 Diagnostic de l'amibiase	20
I.4 Les pyrazolines.....	22
I.4.1 Historique	22
I.4.2 Synthèse des pyrazolines.....	23
I.4.3 L'intérêt des Pyrazolines	24
I.4.4 L'intérêt biologique	24
Références	25
Chapitre II Méthode de criblage virtuel in silico.....	27
II.1 Le criblage virtuel.....	28
II.1.1 Criblage virtuel « ligand-based ».....	28
II.1.2 Criblage virtuel « structure-based ».....	29
II.2 Docking moléculaire	30
II.2.1 Principe du docking.....	31
II.2.2 Détermination des structures	31
II.2.3 Préparation des structures	31
II.2.4 Docking moléculaire.....	31
II.2.5 Prédiction et évaluation	32
II.3 Pharmacophore.....	32
II.3.1 Modélisation du pharmacophore dans le criblage virtuel	33
II.3.2 Applications des pharmacophores dans le domaine de l'adme-toxicité.....	36
II.4 criblage adme-tox.....	37

II.5 QASR	38
II.5.1 2D QSAR.....	39
II.5.2 3D-QSAR.....	39
II.5.3 Modèles statistiques.....	40
II.5.4 Test de la signification globale de la régression.....	40
Références	41
Chapitre III Résultats expérimentale et discussion.....	43
III.1 Introduction.....	44
III.2 Matériels et méthodes.....	44
III.2.1 Base de donnés.....	44
III.2.2 Préparation des ligands	44
III.2.3 Préparation de la protéine	48
III.2.4 Génération de grilles de récepteur	49
III.2.5 Amarrage (docking).....	49
III.3 Résultats et discussion.....	49
III.3.1 Modèle 3D-QSAR.....	49
III.3.2 Doking	57
Références	66
Conclusion Générale.....	68

Liste des Abréviations

AD	: Arabe Dialectal
MIF	: Méthionate Iode formol
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
PCR	: Polymérase chain reaction
OMS	: Organisation mondiale de la santé
IFI	: immunofluorescence
HAI	: hémagglutination indirecte
E. histolytica	: Entamoeba histolytica
HM1	: Helminthes multicellulaire
PDB	: Protein Data Bank
RMSD	: Root-mean-square-deviation
OPLS	: Optimized Potentials for Liquids simulation
IC50	: La concentration d'inhibiteur pour laquelle la vitesse initiale de formation de produit diminue jusqu'à la moitié de sa valeur mesurée en absence d'inhibiteur.
QSAR	: Quantitative Structure-Activity Relationship.
RD-QSAR	: Receptor Dependent Quantitative Structure-Activity Relationship
RMN	: Résonance magnétique nucléaire.
HAR	: androgènes humains
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
3D	: Trois dimensions.
2D	: Deux dimensions
COMFA	: Comparative Molecular Field Analysis.
COMSIA	: Comparative Molecular Similarity Indices Analysis
GLY	: Glycine
PHE	: Phénylalanine
LEU	: Leucine
VAL	: Valine
HIE	: Histidine
MET	: Méthionine
LYS	: Lysine
ASN	: Asparagine
GLN	: Glutamine
ADMET	: Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité.

Liste des Figures

Figure I.1 : Kyste d' E. histolytica ou E. dispar d'après Fotedar Obj. X100	15
Figure I.2 : Trophozoïte d'E. histolytica ou E. dispar d'après Fotedar Obj. X100	15
Figure I.3 : Trophozoïtes d'E. histolytica phagocytant des hématies d'après Fotedar Obj. X100.....	16
Figure I.4 : Répartition géographique de l'amibiase d'après l'IDEEP	17
Figure I.5 : Cycle parasitaire de l'amibiase.....	19
Figure II.1 : Illustration schématique des approches (a) ligand-based et (b) structure-based	29
Figure II.2 : Docking protéine-ligand.....	30
Figure II.3 : Modèle de pharmacophore.....	32
Figure II.4 : Quatre situations différentes pour la recherche de pharmacophore.....	33
Figure II.5 : Représentation schématique de devenir d'un médicament dans l'organisme	38
Figure III.1 : Dérivés de pyrazoline.....	48
Figure III.2 : Graphique de corrélation de pIC50 expérimental et prédit des ensembles d'apprentissage et de test	52
Figure III.3 : Aires du champ gaussien stérique pour le ligand 32 (ligand de référence).....	54
Figure III.4 : Aires du champ gaussien électrostatique pour le ligand 32.	55
Figure III.5 : Aires du champ gaussien d'hydrophobe pour le ligand 32.....	55
Figure III.6 : Aires du champ gaussien donneur de liaison d'hydrogène pour le ligand 32.....	56
Figure III.7 : Aires du champ gaussien accepteur de liaison d'hydrogène pour le ligand.....	56
Figure III.8 : Interaction de liaison en 2D /3D de ligand 32 au niveau du site actif de 5ZEF	59
Figure III.9 : Interaction de liaison en 2D /3D de ligand 33 au niveau du site actif de 5ZEF	60
Figure III.10 : Interaction de liaison en 2D /3D de ligand 35 au niveau du site actif de 5ZEF	61
Figure III.11 : Interaction de liaison en 2D /3D de ligand 36 au niveau du site actif de 5ZEF	62
Figure III.12 : Interaction de liaison en 2D /3D de ligand 13 au niveau du site actif de 5ZEF	63
Figure III.13 : Interaction de liaison en 2D /3D de ligand 39 au niveau du site actif de 5ZEF	64

Liste des Tableaux

Tableau I.1: Prévalence srespectives du portage d'E. disparet d'E. histolytica.....	17
Tableau III.1: Données d'activité Exprérience /prédite pour l'apprentissage et le test de l'ensemble de ligands.....	50
Tableau III.2: Valeurs statistiques pour le modèle 3D-QSAR généré par PLS.....	51
Tableau III.3: Détails des calculs du modèle QSAR basé sur le champ.....	52
Tableau III.4: Résultats de score de docking des ligands sélectionnés.	58
Tableau III.5: . Criblage ADME in silico pour les ligands sélectionnés.	65



Introduction Générale

L'amibiase est une infection parasitaire du gros intestin fréquente dans les pays tropicaux. Elle se traduit par des diarrhées et des douleurs abdominales. Le traitement repose sur la prise d'un antiparasitaire imidazolé.[1]

L'amibiase occupe le troisième rang des maladies parasitaires les plus meurtrières au monde. Environ 10% de la population mondiale serait infectée par des amibes parasites du genre *Entamoeba* dont la plus pathogène est *Entamoebahistolytica*, l'agent de l'amibiase. L'infection est souvent asymptomatique, mais peut cependant entraîner des complications sévères, voire mortelles.[1]

L'amibiase est contractée par voie fécale-orale. L'infection est généralement asymptomatique et les signes cliniques vont d'une diarrhée discrète à une dysenterie aiguë qui peut survenir. Les infections extra-intestinales comprennent les abcès hépatiques ou pulmonaires. Le diagnostic repose sur l'identification de *E. histolytica* dans les selles et par des tests sérologiques si une maladie extra-intestinale est suspectée. Le traitement de la maladie symptomatique repose sur le métronidazole ou le tinidazole suivi de la paromomycine ou d'un autre médicament actif contre les kystes de la lumière du côlon.

Dans les programmes de conception de médicaments, une composante essentielle de la recherche de nouvelles pistes est la synthèse de molécules, qui sont nouvelles, mais qui ressemblent à des molécules biologiquement actives connues en vertu de la présence de caractéristiques structurales critiques. Certaines petites molécules hétérocycliques agissent comme des échafaudages hautement fonctionnalisés et sont des pharmacophores connus d'un certain nombre de molécules biologiquement actives et médicalement utiles. Les pyrazoles et leurs formes réduites, les pyrazolines, sont des composés hétérocycliques azotés bien connus. Composés hétérocycliques contenant de l'azote, et diverses procédures ont été développées pour leur synthèse. L'intérêt des scientifiques l'intérêt des scientifiques pour ces composés a été stimulé par leurs diverses propriétés pharmacologiques prometteuses.[2]

Le monde de la recherche pharmaceutique optimise continuellement toutes les étapes de sa procédure d'invention et de mise au point de remède. La chimioinformatique est un outil de choix pour réduire le temps et le coût de développement d'un médicament. La bio-informatique apporte elle aussi sa participation à l'étude des interactions protéine-ligand par des méthodes comme « dynamique moléculaire » et « protéine-ligand docking »[3]

Le docking moléculaire *in silico* vise à prévoir la structure d'un complexe moléculaire à partir des composées isolées, ce qui est notablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*. Les logiciels de docking sont donc des instruments très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la majorité des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, habituellement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée.[3]

L'étude 3D-QSAR et d'amarrage (docking) pourrait offrir plus d'informations pour comprendre les caractéristiques structurales du site de liaison de la protéine et le détail des interactions protéine-ligand pour diriger la conception de nouvelles molécules potentielles[3].

Dans la présente étude, les méthodes les plus utilisées dans les stratégies de découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutiques sont utilisées. Au cours de ce travail, nous nous basons sur le modèle 3D QSAR, la méthode d'amarrage(docking) et le criblage *in silico* ADMET afin de guider et de prioriser la synthèse des molécules comme des inhibiteurs anti-amibiens contre la souche HM1 : IMSS d'*E. histolytica*[3].

Pour faire ce travail d'une manière convenable on a divisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre est présenté un rappel bibliographique sur l'activité anti-amibienne contre la souche HM1 : IMSS d'*E. histolytica* et les inhibiteurs les plus significatifs de dérivés de pyrazoline.
- Le deuxième chapitre est consacré de l'intérêt du criblage dans le cadre de la recherche pharmaceutique pour répondre aux besoins de santé publique actuels en détaillant sur les différentes méthodes de criblage virtuel (Docking moléculaire, 3D-QSAR et ADMET).
- Le troisième chapitre (partie pratique) regroupe les données relatives aux matériels et les méthodes utilisées au cours de ce travail. Puis nous exposerons le criblage par l'étude 3D-QSAR, docking moléculaire sur une chimiothèque virtuelle de dérivés de pyrazoline les plus significatives dans le but de sélectionner les composés prometteurs qui réagissent plus favorablement sur l'activité anti-amibienne.

Enfin, ce mémoire se termine par une conclusion générale.

Chapitre I

Activité anti-amibienne contre HM1 : souche
IMSS d'E. histolytica & Dérivés de
pyrazoline.

I.1 Introduction

L'**amibiase** est une parasitose liée au péril fécal humain, due à un protozoaire, *Entamoeba histolytica*. Sa prévalence est très élevée en milieu tropical en raison principalement des mauvaises conditions d'hygiène fécale, et dans les pays du tiers-monde où les déjections humaines servent d'engrais. La transmission est consécutive à l'ingestion de kystes présents dans l'eau ou les aliments contaminés. Durant le passage dans le tractus gastro-intestinal, chaque kyste libère huit formes végétatives appelées trophozoïtes qui vont se loger dans le côlon. Dans certains cas, l'amibe peut développer des facteurs de virulence provoquant des ulcérations de la paroi colique, c'est l'amibiase intestinale. Lorsque l'infection est importante, une perforation intervient permettant à des parasites de migrer vers le foie en passant par la circulation sanguine. Ils peuvent alors former des abcès, c'est l'amibiase viscérale. Le diagnostic de l'affection repose sur la symptomatologie, l'épidémiologie (notion de séjour en zone d'endémie), les anomalies biologiques (syndrome inflammatoire, altération du bilan hépatique) et la mise en évidence des formes hématophages dans les selles ou le liquide de ponction de l'abcès. Seule l'observation directe de cette forme affirme le diagnostic parasitologique. Toutefois, cette recherche se révèle fréquemment négative, aussi des techniques sérologiques ont été développées pour la mise en évidence d'anticorps spécifiques.[4]

I.2 Le parasite

I.2.1 La morphologie

Le parasite responsable de la maladie est *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903). C'est la seule amibe intestinale dont la pathogénicité chez l'homme soit certaine [5]. Il a long temps été considéré que seulement 10% des porteurs développaient une pathologie amibienne bien que l'hypothèse de deux espèces, morphologiquement identiques, dont l'une serait pathogène (*E. histolytica*) et l'autre non pathogène (*E. dispar*), ait été évoquée dès 1925 (Brumpt)[6]. Ce n'est que depuis 1993 que l'existence de ces deux espèces a été reconnue [7].

Le parasite se présente sous trois formes :

- Une forme kystique (figure I.1) qui est la forme de résistance et de dissémination car les kystes sont éliminés dans les selles. Son portage traduit l'amibiase infestation. A ce stade-là, il est impossible de différencier morphologiquement *E. histolytica* d'*E. Dispar*.

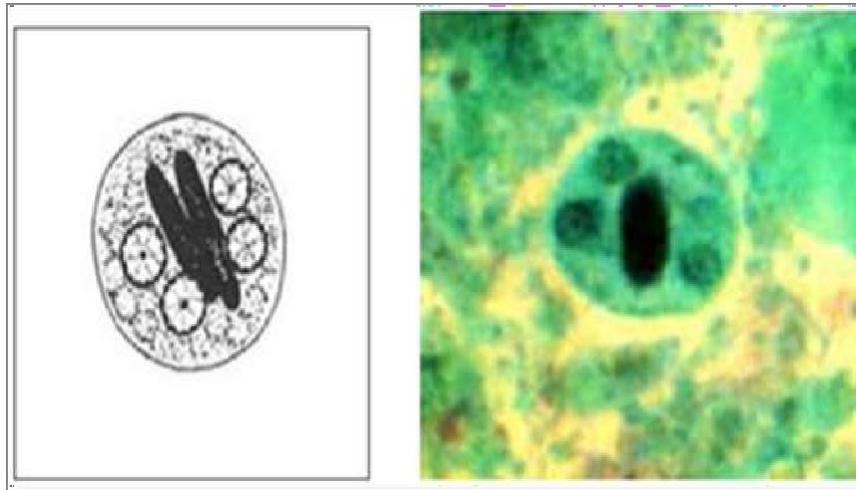


Figure I.1 : Kyste d' *E. histolytica* ou *E. dispar* d'après Fotedar Obj. X100

- Deux formes végétatives ou trophozoïtes (figure I.2) :
 - La forme minuta, non pathogène et non hématophage qui traduit l'amibiase infection ou portage asymptomatique.
 - La forme *histolytica*, hématophage, pathogène qui traduit l'amibiase maladie, caractérisée par son potentiel invasif et cytotoxique . C'est la présence d'une ou plusieurs hématies dans l'amibe, sa mobilité et sa taille qui permettent d'affirmer le diagnostic d'amibiase à *E. histolytica* (figure I.3) [8].

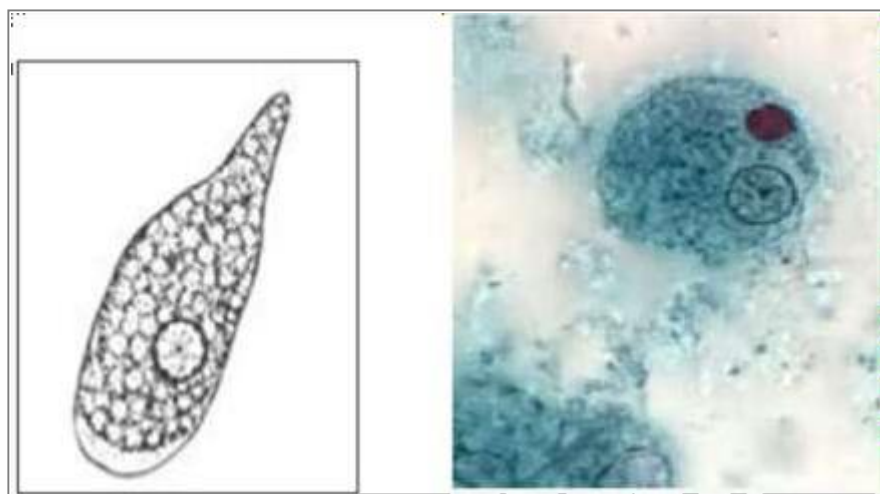


Figure I.2 : Trophozoïte d'*E. histolytica* ou *E. dispar* d'après Fotedar Obj. X100

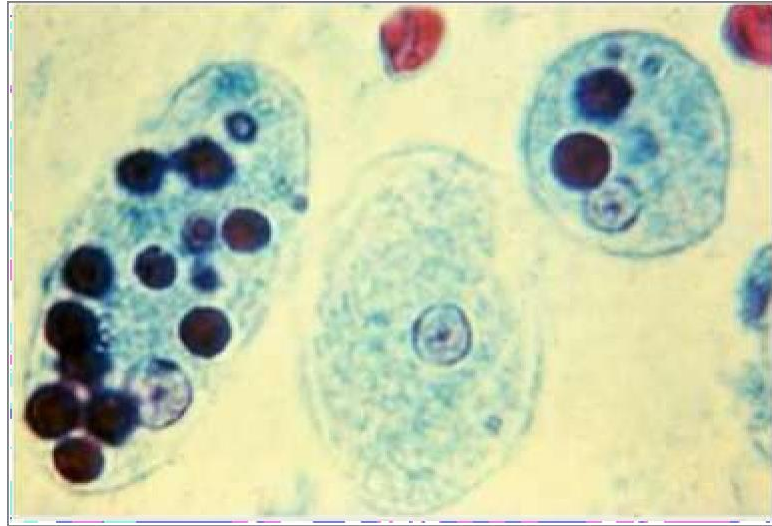


Figure I.3 : Trophozoïtes d'*E. histolytica* phagocytant des hématies d'après FotedarObj. X100

Les facteurs permettant le passage de la forme *minuta* à la forme *histolytica* ne sont pas encore tous connus. On sait que le génotype de l'hôte, celui du parasite ainsi que des facteurs environnementaux semblent être impliqués. Récemment, des études ont démontré que certains génotypes du parasite entraînent une plus forte probabilité d'apparition de la maladie [9]. Notamment il a été démontré l'implication de certains gènes dans le passage à la forme *histolytica* [10]. Ces gènes ont été retrouvés de façon plus répétée chez les souches les plus virulentes d'*E. histolytica*. En outre il existe des polymorphismes pour certains gènes de l'hôte qui sont corrélés avec une plus forte susceptibilité à la maladie. Par exemple un déficit en leptine constitue un facteur favorisant le passage à l'amibiase maladie [10]. Il semble que l'interaction avec la flore bactérienne digestive et l'immunité de l'hôte jouent également un rôle.

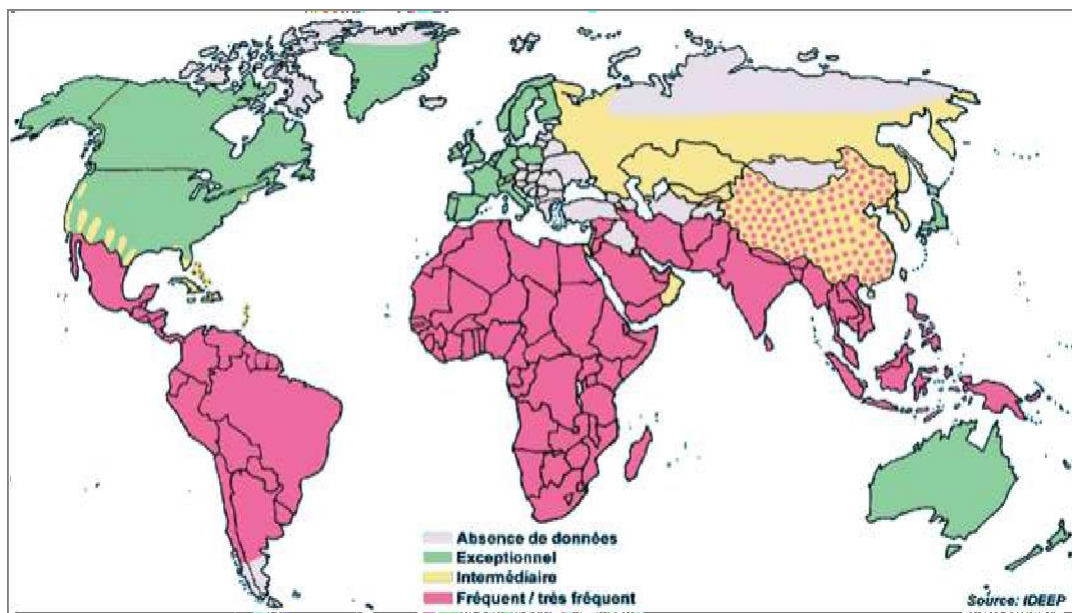
I.2.2 L'épidémiologie

On estime qu'environ 500 millions d'individus sont porteurs de kystes du complexe *E. histolytica*. *E. dispar* (2-5) et qu'en moyenne 10% sont porteurs de kystes d'*E. histolytica* (Tableau I). Dans 1% des cas seulement l'infection va évoluer vers la formation d'abcès généralement hépatiques et plus rarement pulmonaires ou cérébraux : c'est l'amibiase viscérale [11].

Tableau I.1: Prévalence respectives du portage d'E. dispar et d'E. histolytica[12]

Sujets asymptomatiques	Effectif de l'étude	Prévalence du portage d'E. dispar	Prévalence du portage d'E. histolytica
Afrique du Sud	1381	9%	1%
Bengladesh	1872	12%	5%
Bésil	564	9%	11%
Egypte	182	24%	21%
Grèce	322	8%	<1%
Philippines	1872	7%	1%

La prévalence de la maladie est élevée en milieu tropical car elle est principalement liée aux mauvaises conditions d'hygiène fécale et d'éducation sanitaire [13]. Dans certaines régions, comme en Egypte, 20% de la population est porteur sain. Le dépistage et le traitement de ces individus restent très difficiles dans ces zones pauvres et surpeuplées. L'homme étant le seul réservoir du parasite, la transmission inter-humaine se fait de manière manu portée ou par l'intermédiaire des aliments et de l'eau. Ce phénomène, associé avec les conditions sanitaires, explique que la prévalence de la maladie est plus forte dans les zones tropicales. En effet, la répartition géographique de l'amibiase correspond aux zones du globe où la densité de population est la plus forte (figure I.4). L'Amérique centrale, l'Afrique et l'Asie du sud sont les zones où la population croît le plus vite. Les problèmes d'hygiène et d'accès à l'eau salubre, liés à cette surpopulation, favorisent les infections à transmission fécale telle que l'amibiase.

**Figure I.4 : Répartition géographique de l'amibiase d'après l'IDEEP**

De 10 à 25% des personnes porteuses de kystes d'*E. histolytica* vont développer une amibiase intestinale [10], les enfants étant particulièrement concernés. Il a été observé que la malnutrition et la sous-nutrition sont des facteurs favorisant le passage de l'amibiase infestation à l'amibiase maladie. Et dans 1% des cas, l'infection va évoluer vers une amibiase viscérale et cela, plus fréquemment chez les hommes adultes [10]. Les homosexuels sont de même considérés comme une population à risque pour cette maladie.

Dans les pays développés, les cas d'amibiase concernent les immigrants, les touristes revenant des pays à forte endémicité et les homosexuels masculins. On peut d'ailleurs noter que le nombre de cas d'importation est en augmentation aux Etats-Unis [14]. On peut l'expliquer par l'accroissement du nombre de migrants du Sud vers le Nord et par la démocratisation des voyages professionnels et touristiques.

I.3 Le cycle parasitaire de l'amibiase

E. histolytica, qui existe sous trois formes :

- une forme kystique : le kyste, éliminé dans les selles, qui est la forme de résistance et de dissémination.
- deux formes végétatives ou trophozoïtes : trophozoïte non hématophage non pathogène (*Entamoeba histolytica minuta*) qui traduit l'amibiase-infection et trophozoïte hématophage pathogène (*E. histolytica*) responsable de l'amibiase-maladie.

Le cycle parasitaire est simple : le kyste, émis dans le milieu extérieur, est ingéré par l'homme et entraîne, suivant les relations hôte-parasite : - soit un cycle non pathogène : kyste - trophozoïte non hématophage - kyste : c'est l'amibiase-infection, - soit un cycle pathogène : kyste - trophozoïte hématophage : c'est l'amibiase-maladie. Les kystes ingérés se transforment en trophozoïtes qui se déplacent grâce à leur pseudopode jusqu'au côlon, se multiplient, adhèrent à la muqueuse par l'intermédiaire de lectines et phagocytent des particules alimentaires et des hématies (hématophagie). A ce niveau, les trophozoïtes libèrent des enzymes protéolytiques, cytotoxiques pour l'épithélium intestinal, à l'origine de multiples ulcérations de la paroi (réalisant des lésions typiques en coup d'ongle et des réactions locales œdémateuses).

Au cours de cette invasion intestinale (diffusion dans la muqueuse et sous la muqueuse), les trophozoïtes peuvent par extension des lésions ou par voie sanguine diffuser à d'autres organes (foie, poumon, cerveau, ...).[16]

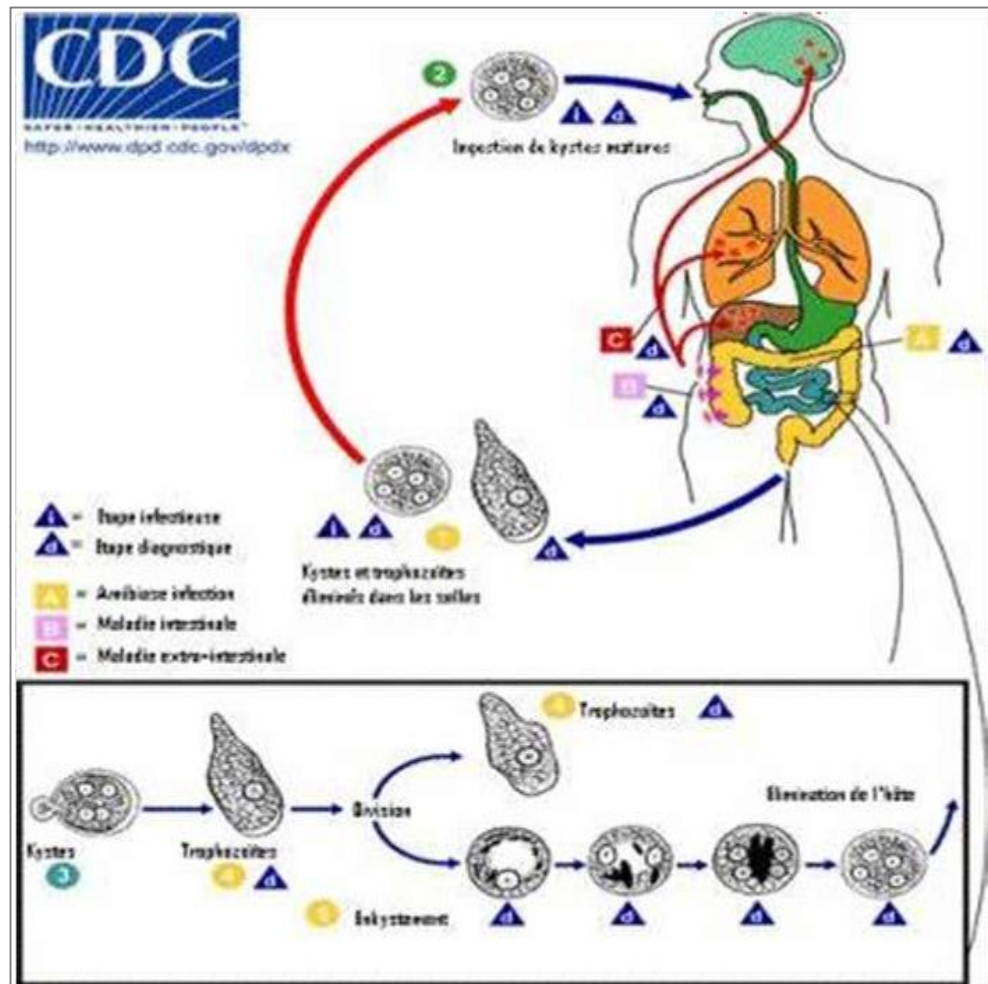


Figure I.5 : Cycle parasitaire de l'amibiase

I.3.1 Symptômes

Les amibes s'implantent dans la muqueuse de l'intestin. En la traversant, ils provoquent l'amibiase dont les symptômes peuvent aller de la diarrhée légère à la dysenterie avec sang et du mucus dans les selles. La destruction de la paroi intestinale peut par la suite entraîner la formation d'ulcères.

Lorsque le parasite parvient à gagner la circulation sanguine, il peut infecter le foie, et donner naissance à des abcès qui, non traités, conduisent à une issue fatale. La maladie peut en outre évoluer vers d'autres complications locales, comme des abcès au niveau des poumons et, beaucoup plus rarement, au cerveau.

I.3.2 Diagnostic de l'amibiase

Il est parasitologique dans l'amibiase intestinale :

- Examen parasitologique des selles :
 - **Au microscope** : examen à l'état frais à pratiquer dès l'exonération, examen de 3 échantillons de selles successifs prélevés entre 4 et 5 jours.
 - **Au laboratoire**: le prélèvement est traité en 3 temps : examen à l'état frais entre lame et lamelle pour recherche des forms mobiles hématophages d' *E. histolytica histolytica*, examen après coloration (lugol, méthionate Iode formol [MIF]) qui permet une meilleure étude morphologique des trophozoïtes et des kystes, techniques de concentration qui permettent de concentrer les kystes, mais détruisent les formes végétatives.

L'examen parasitologique des selles permet le diagnostic de certitude d'*E. histolytica* lorsqu'il met en évidence des trophozoïtes hématophages.

- Lorsque l'examen parasitologique des selles : met en évidence des kystes ou des trophozoïtes non hématophages, il est impossible de distinguer *E. dispar* et *E. histolytica* qui nécessite la mise en œuvre de techniques complémentaires qui mettent en évidence des coproantigènes spécifiques d' *E. histolytica* par ELISA au niveau des selles permettant de différencier *E. histolytica* et *E. dispar* (kystes, trophozoïtes non hématophages).

Le développement de techniques moléculaires spécifiques (PCR temps réel) pour l'identification des amibes fait actuellement partie des recommandations de l'OMS. Des techniques multiplex très sensibles associant la recherche d'autres parasites (*Giardia*, *Cryptosporidium*) constituent une alternative à l'examen parasitologique des selles.

Il est sérologique dans l'amibiase tissulaire : Plusieurs techniques sérologiques sont utilisées : immunofluorescence (IFI), ELISA, hémagglutination indirecte (HAI), test d'agglutination sur lame des particules de latex, électrosynérèse. Il faut demander 2 techniques sérologiques complémentaires :

- l'une utilisant les antigènes solubles : ELISA, HAI, test au latex
- l'autre utilisant les antigènes figurés : IFI (plus adaptée au suivi thérapeutique).

Les réactions immunologiques se positivent dans les amibiases viscérales, l'amibiase colique maligne et l'amoebome. Il faut souligner l'intérêt du test de diagnostic rapide au

latex dans le diagnostic d'urgence de l'amibiase hépatique. Une alternative à la sérologie est représentée par l'antigénémie (détection de la lectine Gal/GalNAc spécifique d'*E. histolytica* par technique ELISA) et par la RT-PCR.

❖ Deux techniques de diagnostic sont récentes :

La RT-PCR vient d'être approuvée par l'OMS comme méthode de choix pour le diagnostic de l'infection par *E. histolytica*.

La détection d'antigène par immunochromatographie (test Immunio Card STAT® CGE) présente 88% de sensibilité et 92% de spécificité (si appréciée sur les échantillons négatifs en RT-PCR), mais montre une forte proportion de réactions croisées entre *E. histolytica* et *E. dispar*.

❖ Stratégies diagnostiques actuelles dans l'amibiase

En cas de découverte de kystes chez un sujet asymptomatique, rechercher des coproantigènes d' *E. histolytica*,

En cas de suspicion d'amibiase intestinale aiguë : si formes mobiles hématophages d' *E. histolytica*, le diagnostic d'amibiase intestinale aiguë est porté ; si kystes ou trophozoïtes non hématophages, rechercher les coproantigènes d' *E. histolytica*: si recherche positive, amibiase intestinale aiguë, si recherche négative : rechercher une autre cause de colite.

- amibiase tissulaire : demander les réactions sérologiques,

- si positives : diagnostic d'amibiase tissulaire,
- si négatives : sérologie à renouveler 7 jours plus tard, le malade étant traité.[15]

❖ Traitement médicochirurgical

Pour les porteurs de kystes ou de trophozoïtes non hématophages d'*E. histolytica*, un amoebicide de contact est préféré, d'une part pour éviter le passage à une forme invasive, et d'autre part pour prévenir la contamination de l'entourage par transmission féco-orale. La classe thérapeutique utilisée est les hydroxyquinoléinesméthylées comme l'INTETRIX®, à raison de 4 gélules par jour en 2 prises pendant 10 jours

Pour l'amibiase intestinale en phase aiguë, ce sont des amoebicides diffusibles qui sont utilisés.

Les 5-nitro-imidazolés sont utilisés per os en première intention : FLAGYL®, 1,5 g/j en 3 prises pendant 10 jours, FLAGENTYL® 1,5 g/j en une prise pendant 5 jours ou SECNOL® 2 g en prise unique. En cas de complication, ils peuvent être administrés en injectable pour augmenter leur efficacité.

En cas d'amibiase viscérale, la prise seule de 5-nitro-imidazolés pendant 5 à 10 jours permet une guérison dans 50% des cas. Une ponction de l'abcès peut être envisagée si le patient est dans un état grave. Il convient de poursuivre le traitement par une cure d'amoebicide de contact (Intétrix 10 à 20 jours) pour éliminer les kystes présents dans l'intestin. Cela permet de diminuer le risque de rechute mais aussi la dissémination de kystes contaminants dans la nature. [16]

I.4 Les pyrazolines

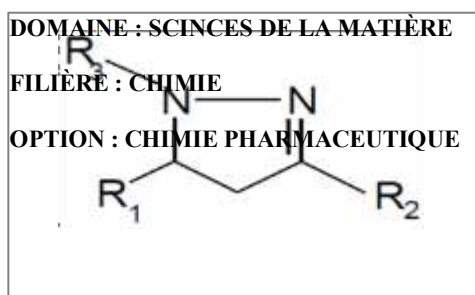
I.4.1 Historique

A l'époque de la découverte des dérivés des acides phénoliques et des acétanilides, la quinine tenait incontestablement le rôle de la vedette comme fébrifuge. La renommée de la poudre de quinquina, dont les emplois subsistent encore de nos jours, apportait à la réputation de cet alcaloïde un appoint non négligeable et aussi, présente un projet de préparation d'un médicament d'action voisine de celle de la quinine, suscita un grand nombre de recherches dans la série de la quinoléine obtenue lors de la pyrogénéation de la quinine (d'où son nom) .[17]

Par la ressemblance entre la phénylhydrazine et l'aniline, leur condensation avec les sources aldéhydiques et cétoniques donne de nouveaux composés dont l'activité est évidente. L'étude de l'action de ces composés sur l'ester acétylacétique devait donc en résulter fatalement.[17]

C'est ce qui réalisa Knorr par leur attribution de l'antipyrine qui est considérée comme une découverte extrêmement importante. La thérapeutique par les produits chimiques de synthèse se bornait alors à quelques dérivés, d'ailleurs assez simples, et l'action de l'antipyrine sur la fièvre était véritablement spectaculaire. L'action analgésique qui l'accompagne est largement dépassée par l'un de ses dérivés : le pyramidon[18] (amidopyrine). Les conceptions qui peuvent résulter de quelques constatations peu futiles et souvent même erronées. Le pharmacologiste Filehne a remarqué que la morphine

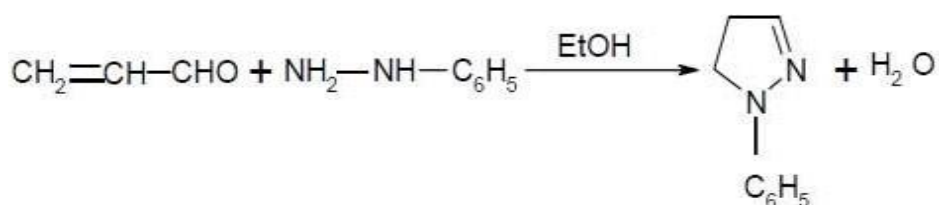
possédait un atome d'azote tertiaire, et il pensa que l'activité analgésique pourrait être rapportée à cette particularité. Il demanda alors aux chimistes de lui préparer un dérivé de l'antipyrine qui posséderait un atome d'azote tertiaire sur le noyau benzénique. Or, dans les collections de cette firme, il existait un produit possédant un groupement aminé tertiaire supplémentaire sur le noyau pyrazole. Ce composé fut essayé et se montra supérieur à l'antipyrine, il fit brillante carrière sous le nom de pyramidon[19]. Dans certaines nomenclatures, la numérotation est différente ; elle débute par l'atome porteur du méthyle.



I.4.2 Synthèse des pyrazolines

La méthode la plus utilisée pour la synthèse des pyrazolines est la condensation des différentes chalcones avec l'hydrazine, phénylhydrazine[20,21]. La synthèse de 2-pyrazolines est facile par le traitement des composés carbonyles α , β -insaturés avec l'hydrazine en milieu éthanolique[22,23], notant que l'hydrazone est formée comme un composé intermédiaire ; qui se cyclise en donnant les 2-pyrazolines en présence d'un réactif de cyclisation comme l'éthanol ou l'acide acétique [24,25].

Le simple exemple est la réaction de prop-2-ène-al avec la phénylhydrazine(SchémaI-03).



I.4.3 L'intérêt des Pyrazolines

Les différents dérivés pyrazoliniques ont une activité importante surtout dans le domaine biologique et pharmaceutique. Les pyrazolines peuvent être utilisées comme anti-tumeurs [26] anti-antibactériens comme le 3,5-binaphtyl-2-pyrazoline [27] antifongiques, antiviraux, antiparasitaires, antituberculeux et insecticides et comme agents anti-inflammatoires, antidiabétiques, anesthésiques et analgésiques de plus, les pyrazolines intervenant dans une phase cruciale de développement de la théorie de la chimie hétérocyclique et aussi utilisées dans la synthèse organique.

Les pyrazolines ont été testées pour l'activité antimicrobienne dans le cas de certains organismes : (*Escherichia Coli*, *Staphylocoques aureus*, *Klebsiellapneumoniae*, *portus mirabilis* *Shigella dysenterie* et *salmonella typhii* [28]. Les composés, contenant chlorohydroxy et diméthylamino-(N(CH₃)₂) comme substituant sur le cycle naphthalène et le carboxamido-CONH₂ comme substituant sur la position N-1 du cycle pyrazoline, sont des agents antimicrobiens très efficaces [29,30].

I.4.4 L'intérêt biologique

- *Effet antalgique*

Les dérivés pyrazoliniques sont de bons antalgiques contre la douleur d'intensité modérée, surtout si celles-ci est d'origine inflammatoire, leur actions sur les algies profondes est modeste [31,32].

- *Effet anti- inflammatoire*

Ces dérivés sont des anti-inflammatoires, leurs rapports entre les doses anti-inflammatoires et les doses antalgiques sont proches de l'unité, ils ne doivent donc pas être prescrits de la seule fin analogique [33]

Les dérivés des pyrazolines s'opposent aux signes cardinaux de l'inflammation, Douleur, rougeur, et oedème ainsi) qu'au déficit fonctionnel. La non sélectivité de leurs actions est illustrée par leurs efficacités dans des pathologies assez diverses telles que la goutte, les coliques Néphrétiques, les affections rhumatismales telles que l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde...etc. au cours de celles-ci, l'effet des dérivés du pyrazole est symptomatique et le permet que l'amélioration fonctionnelle [34,35].

- **Effet antiagregant plaquettaire**

Les dérivés des pyrazolines inhibent l'agrégation plaquettaire, par inhibition de la production de 4 romboxane A2 plaque taira, la durée de l'effet est à rapprocher de la durée de vie de ces médicaments dans l'organisme [36].

- **Effets digestifs**

Les effets digestifs des dérivés de pyrazoline sont à prédominance gastrique et comprenant des signes fonctionnels (brûlures, douleurs, nausées...) des lésions de la muqueuse (pétéchies, ulcérations) et des saignements de volumes et de gravité variable la toxicité digestive des dérivés du pyrazoline est cible de leurs puissances anti-inflammatoire.[37]

- **Effets renaux**

Chez les sujets ayant une fonction normale, les dérivés pyrazoliniques sont bien tolérés. En revanche, chez ceux qui ont une fonction rénale précaire ou déjà altérée, les dérivés du pyrazole peuvent entraîner une insuffisance rénale oligurique, d'apparition rapide et généralement réversible. Cet effet rénal peut être mis en relation avec l'inhibition de la production de prostaglandines vasodilatrices [38].

Références

- [1] https://www.doctissimo.fr/html/sante/encyclopedie/sa_1435_amibiase.htm
- [2] Mohammad Abid, Abdul Roouf Bhat, Fareeda Athar, Amir Azam, Synthesis, spectral studies and anti-amoebic activity of new 1-N-substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-2-pyrazolines Department of Chemistry, Jamia Millia Islamia, Jamia Nagar, New Delhi-110025.
- [3] these Master 2021
- [4] Nicolas Beyls. Diagnostic sérologique de l'amibiase à *Entamoebahistolytica* : validation d'un nouveau test ELISA au CHU de Grenoble. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00650326.
- [5] STANLEY SL. Amoebiasis. Lancet. **2003**, 361, 1025-34.
- [6] RAVDIN JI. Amebiasis. Clin Infect Dis. **1995**, 20, 1453-1466.
- [7] SARGEANT P.G. E. histolytica is a complex of two species. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.(1992), 86, 348.
- [8] FOTEDAR R, STARK D, BEEBE N, et al. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. Jul **2007**;20(3):511-32
- [9] ALI I.K, MONDAL U, ROY S, HAQUE R, PETRI W.A, CLARK C.G. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *E. histolytica*. J. Clin. Microbiol. **2007**, 45, 285-289.
- [10] RALSTON KS, PETRI WA. Tissue destruction and invasion by *Entamoebahistolytica*. Trends in Parasitology, June **2011**, 27(6), 253-262.

- [11] MADDISON S.E. Serodiagnosis of parasitic diseases. Clin. Microbiol. Rev **1991**, 4, 457-469.

- [12] MERENS A., RAPP C., FABRE R., CAVALLO J.D. Intérêt et limites du diagnostic au laboratoire de l'amibiase. *Med. Trop.* **2005**, 65, 167-175.
- [13] PARIS L., THELLIER M., FAUSSART A., DANIS M. Epidémiologie mondiale des maladies parasitaires. *La Revue du Praticien.* **2007**, 57, 131-136.
- [14] XIMÉNEZ C, MORAN P, ROJAS L, VALADEZ A, GOMEZ A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis : State of the art. *Infection, Genetics and Evolution.* **2009**, 9, 1023-1032.
- [15] Pierre Aubry, Bernard-Alex Gaüzère. 'Amoebose (amibiase)', Rapport d'experts, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux, **2017**.
- [16] Nicolas Beyls. Diagnostic sérologique de l'amibiase à *Entamoeba histolytica* : validation d'un nouveau test ELISA au CHU de Grenoble. *Sciences pharmaceutiques.* **2011**
- [17] P.Burger, *Medical and veterinary chemicals*, Vol.1, Pergamon, (1983).
- [18] E.Blokm; *Heterochemistry*, New York, (1980).
- [19] A.O. Fitton, R. K. Smalley, *Practical heterocyclic chemistry*, Academic press, London and New York, (1975).
- [20] I.G.Shuklar. *S. Ind. j chem.* 198.25b.983-988.
- [21] Y.Tomilori, V.Okonnishnikova, G.P.Shulishov, E.V.Nefedovo, M.Russ. *Chem.BT*, **1995**, 44, 2114-2118. 78.
- [22] Bhaskearreddy, D.Ghandasekhar, B. N. Padarvathi, V. Sumathi, R. P Synthesis.
- [23] Knorr, I. Ber. Dt. Chem. **1893**, 26, 100-105.
- [24] A.Ankinvala, M. D. Wadolkar, K.N. *Ind.J.Chem, Sec.* **1994**, 71, 580-587.
- [25] Thakare, V. G. Wadolkar, K. N. *Ind.J. Chem, Sect. B.* **1986**, 25-30.
- [26] S.K Mohanty, S, y, Padmanavan *Indian J chem*, **2003**, 20, 1877-1146.
- [27] R.L. Reeves, *chemistry of the carbonyl group*, S.Patai edition, New York, **1981**, 760-765.
- [28] S.Relfvan, G, C. Wellinga, *Agric Fond chem*, **1979**, 84-406.
- [29] E. Plaska, M. Aytmir, I. Tayfun, K. Errol, E. Ilk, *Eur.j.Med. Chem*, **2009**, 21, 3020-3025.
- [30] H. Garge, G, Chandraparkash, *J Pham. Sc.* **1986**, 14, 964-969
- [31] P. Lechat, *Dénominations communes des médicaments*, édition Doin **1972**, 43, 50-55.
- [32] H.P kanfmann, *Médicaments de synthèse*, TradiWinternitz, office International de librairie, Bruxelles, **1988**, 53-57.
- [33] Lespagnol, Bar. *Bull. Soc. Pharmacol*, **1969**.
- [34] G. See, *bull; Ac, Med, Paris* 6, 937-940.
- [35] S.S.Adams et al, *J, Pharm, Science.* **1987**, 6, 58-60.
- [36] Lespagnol, Bar, *Bull.Soc.Pharmacol*, **1969**, 9, 159-162.
- [37] M. Daoudi, N. Benlarbi, *Cristal structure of N, N, N', N', - tetra [(3, 5-dimethyl-1-Pyrazolyl) methyl] - para-phenylnediamine*, molecule, (2003).
- [38] H. Thurillier et Coll, *Chem.Ther*, **1983**, 5, 79-94.

Chapitre II

Méthode de criblage virtuel in silico

II.1 Le criblage virtuel

Le criblage virtuel est largement employé pour la recherche de nouveaux médicaments. La sélection de structures pour les méthodes de criblage virtuel basées sur la structure reste problématique. Nous avons montré que les propriétés physico-chimiques du site de liaison, critères simples et peu coûteux en temps de calcul, pouvaient être utilisées pour guider celle-ci. L'évaluation des méthodes de criblage virtuel, critique pour vérifier leur fiabilité, repose sur la qualité de banques d'évaluation.

Les nombres grandissants de cibles génomiques d'intérêt thérapeutique et de macromolécules (protéines, acides nucléiques) pour lesquelles une structure tridimensionnelle (3-D) est disponible rendent les techniques de criblage virtuel de plus en plus attractives pour des projets d'identification de molécules bio-actives. Par criblage virtuel, on entend tout procédé de recherche électronique dans des banques de données moléculaires permettant la sélection de molécules. La requête peut être effectuée sous différents types de contraintes (descripteurs physicochimiques, pharmacophore, topologie d'un site actif) et doit aboutir à la sélection d'un faible pourcentage (1-2%) de molécules présentes dans la chimiothèque (banque de données de ligands) de départ.

Tout criblage virtuel se décompose en trois étapes d'égale importance:

1. la mise au point de la chimiothèque de départ,
2. le criblage proprement dit,
3. la sélection d'une liste de touches virtuelles. Il est à noter que toute erreur à chacune de ces trois étapes aura des conséquences importantes se traduisant généralement par une augmentation du taux de faux positifs et de faux négatifs. Il convient donc d'être très attentif à chacune d'entre elles.

II.1.1 Criblage virtuel « ligand-based »

Les méthodes de criblage « ligand-based » reposent sur la connaissance préalable de ligands ayant une activité sur la cible thérapeutique. Il sera ainsi possible d'utiliser ces ligands comme une première base de « hits » afin d'identifier d'autres composés similaires, présentant des caractéristiques d'activité comme aux ligands connus de la cible [1]. Différents types de descripteurs moléculaires pourront être calculés pour quantifier la similitude entre composés. Suivant le nombre de ligands connus de la cible thérapeutique.

Plusieurs méthodes peuvent être employées : la recherche de similarité, le criblage de pharmacophores, ou les approches QSAR. [2]

II.1.2 Criblage virtuel « structure-based »

Le criblage virtuel « structure-based » est basé sur la structure de la cible en évaluant la capacité des ligands à établir des interactions avec le site de liaison étudié et ainsi sélectionner les molécules capables de se lier à cette cible. Lorsque la structure 3D de la cible biologique d'intérêt est disponible, des méthodes dites basées sur la structure peuvent être employées.

Il existe deux types de méthodes expérimentales pour obtenir la structure 3D d'une cible : la cristallographie aux rayons X et la RMN. Comme leur nom l'indique, ces méthodes utilisent la structure de la cible pour découvrir de nouveaux composés actifs. Pour cela, différentes approches peuvent être employées : la construction de modèles pharmacophoriques basés sur la structure, l'établissement de modèles RD-QSAR, la conception de novo (ou de novo design) et les méthodes de docking qui sont les plus populaires. Toutes ces techniques nécessitent l'identification préalable du site de liaison. [3]

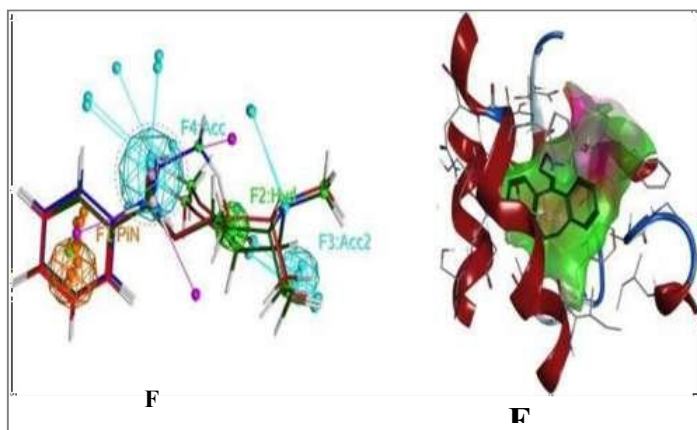


Figure II.1 : Illustration schématique des approches (a) ligand-based et (b) structure-based.

II.2 Docking moléculaire

Le docking moléculaire est un outil clé de la biologie moléculaire structurale et de la conception de médicaments assistée par ordinateur. L'objectif du docking ligand-protéine est de prédire le(s) mode(s) de liaison prédominant(s) d'un ligand avec une protéine de structure tridimensionnelle connue. Les méthodes d'accostage réussies explorent efficacement les espaces à haute dimension et utilisent une fonction de notation qui classe correctement les accostages candidats. Le docking peut être utilisé pour effectuer un criblage virtuel sur de grandes bibliothèques de composés, classer les résultats et proposer des hypothèses structurales sur la façon dont les ligands inhibent la cible, ce qui est très utile pour l'optimisation des pistes. La mise en place des structures d'entrée pour le docking est tout aussi importante que le docking lui-même, et l'analyse des résultats des méthodes de recherche stochastique peut parfois manquer de clarté. Ce chapitre aborde le contexte et la théorie du logiciel de docking moléculaire, et couvre l'utilisation de certains des logiciels de docking les plus cités [4].

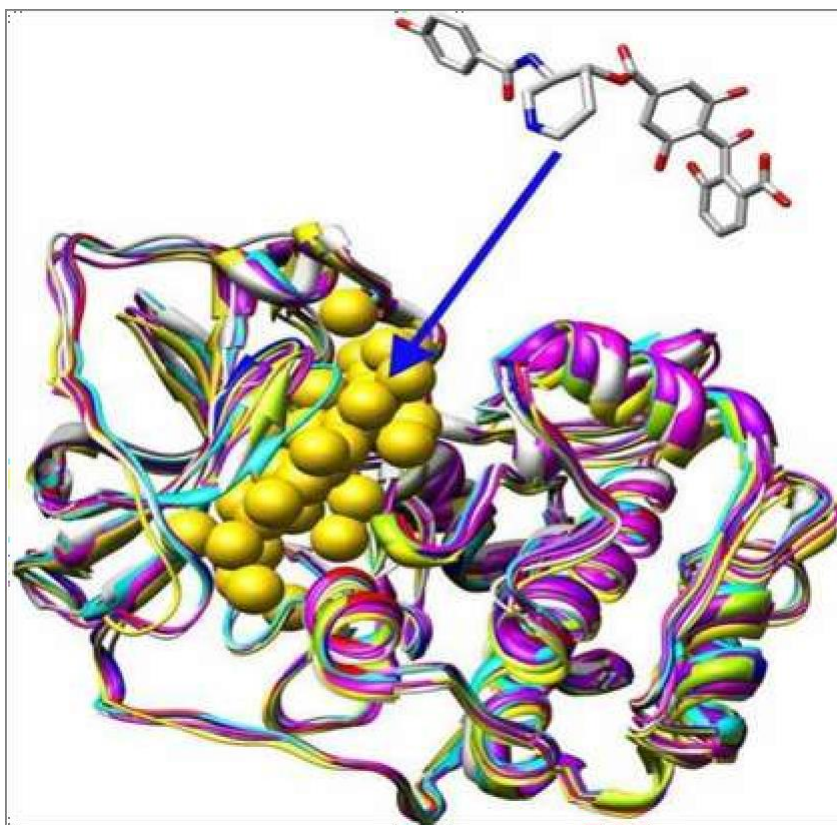


Figure II.2: Docking protéine-ligand

II.2.1 Principe du docking

Le processus de docking moléculaire consiste à faire interagir un ligand avec le récepteur (généralement de nature protéique). La technique de docking comprend quatre étapes principales.

II.2.2 Détermination des structures

Cette étape préliminaire du docking moléculaire est réalisée pour déterminer les structures moléculaires mises en jeu (le récepteur et le ligand). Ces structures sont obtenues en faisant appel à trois méthodes d'analyse (la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X). Ces méthodes expérimentales permettent aujourd'hui de déterminer la structure des protéines.

II.2.3 Préparation des structures

La préparation du récepteur en vue du docking ne peut être réalisée qu'une fois les structures mises en jeu sont identifiés. Il est indispensable de suivre les étapes ci-dessous pendant la préparation du récepteur qui sera utilisé pour le traitement du docking.

II.2.4 Docking moléculaire

Dans le domaine de la modélisation moléculaire, le docking est une méthode qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable. C'est-à-dire l'échantillonnage de l'espace des configurations du complexe ligand-récepteur. La complexité de ce problème est fonction de plusieurs paramètres tels que : le nombre de degrés de liberté obtenus pour la translation et la rotation vis-à-vis des conformations de départ possibles du ligand. Dans notre cas nous avons choisi le « Molegro Virtual Docker (MDL) » comme logiciel pour la modélisation. Ce dernier présente une plate-forme intégrée pour prédire - protéine ligand interactions qui permet de gérer tous les aspects du processus d'accueil la préparation des molécules, la détermination des potentiels sites des liaisons de la protéine cible, et la prévision des modes de liaison des ligands, On peut distinguer deux niveaux de docking :

- Le docking rigide est bien sûr le plus simple et demeure encore souvent employé pour l'amarrage protéine-protéine.

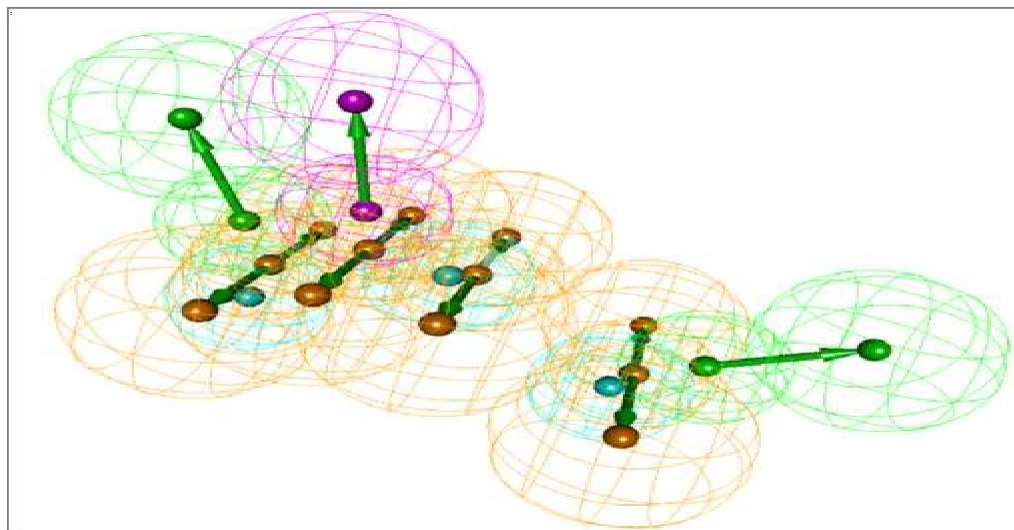
- Le docking flexible, traite la flexibilité des deux molécules, mais la flexibilité permise est limitée, simplifiée par des modèles. Afin d'éviter des calculs, que les machines ne peuvent résoudre ou seulement dans des temps bien trop importants.

II.2.5 Prédiction et évaluation

Une fois les paramètres du docking moléculaire sont établis, le programme passe à l'étape de prédiction et d'évaluation. Celle-ci permet la mise au point des modes d'interactions potentiels.

II.3 Pharmacophore

Un pharmacophore est une description abstraite des caractéristiques moléculaires qui sont nécessaires à la reconnaissance d'un ligand par une macromolécule biologique. L'UICPA définit un pharmacophore comme étant "un ensemble de caractéristiques stériques et électroniques qui est nécessaire pour assurer les interactions supramoléculaires optimales avec une cible biologique spécifique et pour déclencher (ou bloquer) sa réponse biologique"[4]. Un modèle de pharmacophore explique comment des ligands structurellement divers peuvent se lier à un site récepteur commun. En outre, les modèles pharmacophore peuvent être utilisés pour identifier, par la conception de novo ou le criblage virtuel, de nouveaux ligands qui se lieront au même récepteur.



FigureII.3: Modèle de pharmacophore.

II.3.1 Modélisation du pharmacophore dans le criblage virtuel

La modélisation du pharmacophore est le plus souvent appliquée au criblage virtuel afin d'identifier les molécules déclenchant l'effet biologique souhaité. À cette fin, les chercheurs créent un modèle pharmacophore (requête) qui code très probablement l'organisation 3D correcte du schéma d'interaction requis. En fonction de l'étendue des connaissances sur la cible protéique particulière, différentes options sont disponibles pour construire une telle requête.




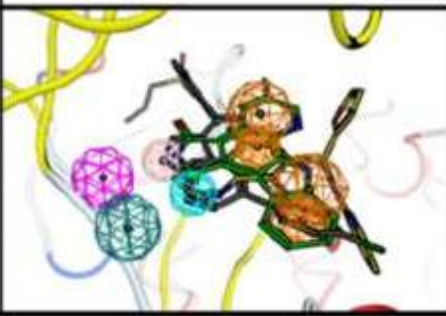
Données antérieures		Ligand actif connu	
		Non	Oui
Structure protéique connue	Non		
	Oui		

Figure II.4: Quatre situations différentes pour la recherche de pharmacophore

- *Aucune structure de protéine et aucune structure de ligand n'est connue*

Si la structure de la cible et tous ses ligands sont inconnus, la modélisation pharmacophore est impossible. La seule option pour utiliser le principe du pharmacophore serait de concevoir une bibliothèque diversifiée en utilisant une métrique de diversité basée sur les empreintes pharmacophore pour assurer une diversité optimale de la bibliothèque, contenant une grande variété de molécules avec une composition différente des caractéristiques pharmacophore. En effet, compte tenu du grand nombre de composés disponibles et potentiels, la tendance est de concevoir des bibliothèques très soigneusement afin de couvrir efficacement l'espace chimique dans tout processus de recherche.[4]

- ***Pas de structure de la protéine, mais les structures du ligand actif sont connues***

L'autre scénario est que la structure du récepteur (et de tout complexe avec le ligand) est inconnue. C'est souvent le cas dans la découverte de médicaments. Si l'on ne connaît qu'une seule molécule active, il est alors impossible de faire correspondre les principales caractéristiques pharmacophores à la molécule, et la seule option peut être d'utiliser des recherches de similarité (comme l'utilisation d'empreintes pharmacophores) pour retrouver des molécules similaires.[5] Une fois ces dernières testées, un ensemble de composés actifs et inactifs multiples peut être connu et une modélisation pharmacophores plus avancée peut être utilisée.

Lorsqu'un ensemble de ligands actifs de structure connue, avec des échafaudages similaires ou différents, est disponible, il est alors possible d'utiliser la modélisation pharmacophore basée sur le ligand.[6] L'élucidation du pharmacophore putatif implique deux étapes. Premièrement, l'espace conformationnel des molécules flexibles doit être largement couvert puisque les conformations bioactives sont inconnues. Ensuite, les molécules doivent être alignées par des caractéristiques pharmacophore communes, qui peuvent être retenues dans un modèle 3D. En utilisant des dérivés inactifs, l'essence des caractéristiques ainsi que l'arrangement stérique autorisé des ligands peuvent également être cartographiés. L'algorithme Catalyst-HypoGen, en particulier, se distingue de la variété des outils disponibles à cette fin. Il s'agit d'une combinaison de QSAR et de la méthode pharmacophore. Il tente de corrélérer les valeurs de structure et d'activité (K_i ou concentration inhibitrice semi-maximale [IC₅₀]) en construisant un modèle pharmacophore. Ainsi, HypoGen n'identifie pas seulement un composé de requête comme "actif" ou "inactif" dans la fonction traditionnelle d'un modèle pharmacophore, mais prédit également la valeur d'activité sur la base de la régression de l'ensemble de données d'entraînement.

- ***Les structures de la protéine et du ligand sont connues***

Les informations structurelles sont présentes à la fois pour les ligands et pour la protéine réceptrice. Habituellement, un modèle pharmacophore représente les caractéristiques clés d'une petite molécule qui lui permettent de se lier à une molécule réceptrice, mais cette idée peut être inversée et les requêtes pharmacophores construites à partir des caractéristiques du site actif d'une protéine.[7] Ces caractéristiques décrivent les

principales interactions entre la protéine et ses ligands, et peuvent être mises en correspondance avec la conformation bioactive du ligand. Idéalement, le modèle structurel est dérivé de données cristallographiques ou de résonance magnétique nucléaire, mais des modèles d'homologie ou d'autres données structurales peuvent également être utilisés. Bien qu'une structure pour un seul ligand puisse suffire, il est avantageux de disposer d'informations 3D pour plusieurs ligands afin d'identifier les interactions communes. Bien que cette approche soit compatible avec la majorité des méthodes de modélisation du pharmacophore, Ligand Scout est remarquable en tant que premier logiciel capable de construire automatiquement une requête à partir d'un ou plusieurs fichiers de la Protéine Data Bank (PDB) basés sur les interactions protéine-ligand[8].

Ces requêtes pharmacophore basées sur la structure ont de multiples applications. Elles peuvent être utilisées pour le criblage virtuel, la prédiction de la position de liaison du ligand et la comparaison des sites de liaison.

- ***Seule la structure de la protéine est connue***

Dans le dernier cas, on dispose d'informations structurales sur le récepteur protéique, mais pas de ligands actifs. Dans ce cas, un modèle pharmacophore putatif peut être construit en analysant les propriétés chimiques du site de liaison d'intérêt. Il existe plusieurs approches informatiques différentes qui peuvent convertir directement les structures atomiques 3D des sites de liaison des protéines en requêtes. Les cartes d'interaction de l'outil de conception de médicaments de novo LUDI peuvent être utilisées pour créer une requête pharmacophore.[9] HS-Pharm est une méthode basée sur la connaissance qui utilise des algorithmes d'apprentissage automatique pour hiérarchiser les atomes d'interaction les plus intéressants et générer une carte d'interaction dans le site de liaison. Ensuite, la carte d'interaction est convertie en caractéristiques pharmacophores.

Le paquet GRID est une autre approche pour analyser la poche afin d'identifier les interactions clés.[10] En utilisant les champs d'interaction moléculaire, les positions les plus favorables des sondes atomiques dans le site de liaison peuvent être identifiées et converties en caractéristiques pharmacophore. Bien que de nombreux succès aient été rapportés, l'absence d'informations structurales sur les ligands est un désavantage distinct pour la conception de médicaments, car en l'absence d'un échafaudage moléculaire, il est difficile de cartographier les caractéristiques dans l'espace 3D qui peut encore être couvert par des atomes qui sont limités par les longueurs de liaison et les angles dans les ligands.

Dans tous ces exemples, les requêtes pharmacophore sont utilisées pour identifier les molécules actives qui répondent à certaines contraintes géométriques et chimiques. En raison du caractère simple et polyvalent d'une requête pharmacophore, elle peut être utilisée non seulement pour identifier des molécules actives, comme le suggère la définition d'un pharmacophore de l'UICPA (Union internationale de chimie pure et appliquée), mais aussi comme requête négative, afin d'identifier des molécules aux propriétés indésirables.

Dans les travaux récents de Voet et, par exemple, une double requête pharmacophore a été utilisée pour identifier des antagonistes stricts du récepteur des androgènes humains (hAR). La thérapie du cancer de la prostate repose souvent sur des anti-androgènes qui antagonisent la fonction du hAR.[11] Cependant, des mutations résistantes ont tendance à apparaître dans le hAR de sorte que les antagonistes deviennent des agonistes. Dans leur travail, les informations structurales disponibles du hAR avec des composés dans les conformations agoniste et antagoniste ont été utilisées. Une requête pharmacophore a été générée sur la base des antagonistes connus en conformation agoniste, et remappée en 3D sur une seconde requête en conformation antagoniste. Une méthode combinée de criblage pharmacophore a permis d'identifier des composés qui ne répondaient qu'à la requête antagoniste, mais pas à la requête agoniste. L'évaluation expérimentale des composés a confirmé l'activité strictement antagoniste des composés à la fois pour le hAR de type sauvage et les mutants résistants aux médicaments.

II.3.2 Applications des pharmacophores dans le domaine de l'adme-toxicité

Une mauvaise ADME-tox est un facteur majeur contribuant aux échecs pendant le développement des médicaments et les essais cliniques. Il est donc largement accepté que les propriétés ADME-tox soient profilées tôt dans le processus de découverte des médicaments, et les approches de modélisation des pharmacophores sont souvent utilisées pour de telles prédictions ADME-tox. Les modèles de pharmacophores peuvent être utilisés pour identifier les interactions possibles des médicaments avec les enzymes de métabolisation des médicaments en faisant correspondre les groupes chimiques équivalents des molécules testées à ceux des molécules de médicaments ayant un profil ADME-tox connu.

II.4 criblage adme-tox

Les échecs dans le développement de médicaments étaient principalement la conséquence de mauvaises performances pharmacocinétiques. Ce problème a été en grande partie résolu grâce à l'utilisation d'un filtrage précédant l'utilisation des chimiothèques, réduisant les taux d'échec dans les phases de développement. Les filtres par ADME-Tox (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité) sont rapidement devenus populaires. Ils reposent sur plusieurs critères déterminant les propriétés pharmacocinétiques potentielles des molécules et sont désormais largement utilisés pour réduire le nombre de composés d'une chimiothèque en sélectionnant les plus aptes à devenir des Médicaments, avant tout processus de criblage. L'utilisation de ces filtres a donné de très bons résultats. [1]

❖ Absorption

En chimie, l'absorption est un phénomène physique ou chimique ou un processus dans lequel des atomes, des molécules ou des ions pénètrent dans une phase de masse - liquide ou solide. Il s'agit d'un processus différent de l'adsorption, car les molécules qui subissent une absorption sont prises par le volume, et non par la surface (comme dans le cas de l'adsorption)

❖ La distribution

La distribution est fonction de la capacité du médicament à franchir les barrières qui séparent les différents compartiments de l'organisme et à s'y accumuler ou à en être exclu. Ceci implique le passage de barrières membranaires qui peuvent être franchies par diffusion passive ou par l'action de transporteurs.

❖ Métabolisme

Le métabolisme définit l'ensemble des réactions couplées se produisant dans les cellules de l'organisme. Il est constitué de deux mécanismes opposés

- le catabolisme : il permet d'extraire l'énergie des nutriments, par dégradation des molécules énergétiques (glucides, lipides...);
- l'anabolisme : il permet de synthétiser les constituants nécessaires à la structure et au bon fonctionnement des cellules.[12]

❖ Elimination

En pharmacologie, on entend par élimination ou excrétion d'un médicament l'un des nombreux processus par lesquels un médicament est éliminé (c'est-à-dire éliminé et excrété) par un organisme, soit sous une forme inchangée (molécules non liées), soit sous une forme modifiée (métabolite)[13].

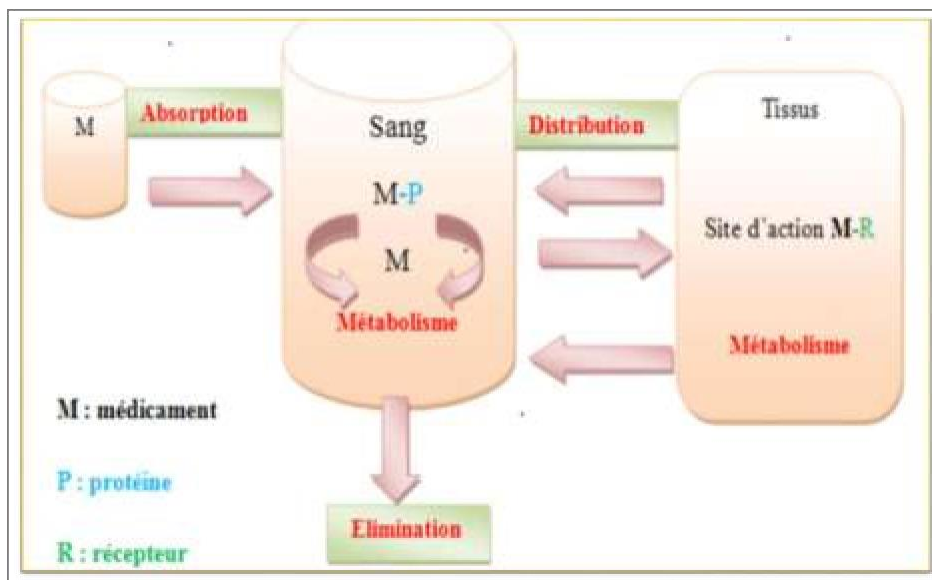


Figure II.5: Représentation schématique de devenir d'un médicament dans l'organisme.

❖ Toxicologie

La toxicité d'un candidat-médicament est l'un des paramètres les plus redoutés par les développeurs, surtout lorsqu'il entre phases cliniques. En effet, un candidat-médicament présentant des effets secondaires graves lors des phases cliniques. Est immédiatement abandonné, et ce généralement de manière définitive. Il est donc très important de tenter de prédire la toxicité d'un composé à partir de sa structure lors des phases précoces de développement R&D. la toxicité peut être classifiée selon l'organe affecté ou selon le mécanisme de toxicité.[14]

II.5 QASR

Les méthodes QSAR classiques décrivent les relations structure-activité en termes de paramètres physicochimiques et de propriétés stériques (analyse de Hansch, approche extra thermodynamique), ou de certaines caractéristiques structurales.

II.5.1 2D QSAR

Le QSAR 2D est un outil puissant pour expliquer les relations entre la structure chimique et les observations expérimentales. Les éléments clés de la méthode sont les descripteurs numériques utilisés pour traduire une structure chimique en variables mathématiques, la qualité des données observées et les méthodes statistiques utilisées pour dériver les relations entre les observations et les descripteurs. Il y a quelques réserves à ce qui est essentiellement une procédure simple : l'ajustement excessif des données, l'applicabilité du domaine à de nouvelles structures et la réalisation de bonnes estimations d'erreurs pour chaque prédiction. Les modèles QSAR 2D sont utilisés couramment au cours du processus d'optimisation d'une série chimique en vue d'un candidat aux essais cliniques. Au fur et à mesure que l'on acquiert des connaissances dans ce domaine, les QSAR 2D deviendront des substituts acceptables des observations expérimentales.[15]

II.5.2 3D-QSAR

Des modèles 3D-QSAR dit « receptor dependent » (RD-QSAR) peuvent être mis en œuvre lorsque la structure 3D de la cible biologique est résolue [16]. Les approches 3D-QSAR ont été développées pour corréler l'activité biologique d'une série de composés actifs de référence avec l'arrangement spatial de nombreuses propriétés de la molécule telles que les propriétés stériques, lipophiliques et électronique et pour fournir des indications pour l'optimisation par pharmacomodulation et la conception de nouveaux composés avec des profils d'activité améliorés [17].

En 1979, la première approche 3D-QSAR a été proposée en décrivant les propriétés de champs moléculaires de composés, les calculer sur une grille régulière puis les corréler à leur activité biologique par analyse en «composante principale» (PCA) [18]. Actuellement, différentes méthodes 3D-QSAR sont utilisées tel que CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) et CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis). Il est à noter que toutes ces méthodes nécessitent un alignement minutieux des ligands de référence. Cependant, ces approches sont considérées à la fois « ligand-based » et « structure-based ».

Le CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) ,Une méthode qui reflète l'interaction sans liaison entre le récepteur et le ligand, est largement utilisé dans la

conception des médicaments. Les énergies potentielles stérique (Lennard-Jones) et électrostatique (coulombique) des champs de force implémentés dans logiciel SYBYL ont été évaluées par CoMFA. Pour chaque ligand d'alignement de pharmacophore, un réseau cubique 3D avec un espacement de grille de 1,0 Å dans les directions x, y et z a été généré pour enfermer l'agrégat de molécule. Un atome de carbone sp³ avec une charge de +1,0 et un rayon de Van der Waals de 1,52 Å a été utilisé comme sonde ; cet atome a été placé à chaque point du réseau pour calculer divers champs stériques et électrostatiques. Une valeur de coupure d'énergie de 30 kcal / mol a été imposée à tous les calculs de CoMFA pour éviter des valeurs d'énergie excessivement élevées et irréalistes dans la molécule. Ensuite, l'analyse des moindres carrés partiels (PLS) a été appliquée pour obtenir le modèle final.[19]

Le CoMSIA(Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) a utilisé une fonction de type gaussien basée sur la distance. Ainsi, CoMSIA peut-être capable d'obtenir des modèles plus stables que CoMFA dans les études 3D-QSAR. Le modèle CoMSIA construit a fourni des informations sur les champs stériques, électrostatiques, hydrophobes, donneurs de liaisons hydrogène et accepteurs de liaisons hydrogène.[20]

II.5.3 Modèles statistiques

L'objectif de l'analyse statistique est justement de « démêler » ces descripteurs et d'identifier ceux qui sont corrélés à la variable cible, qui produisent du signal, de ceux qui ne le sont pas, qui produisent du bruit. L'analyse statistique permet également d'identifier les descripteurs qui sont corrélés entre eux pour ne garder que les principaux et réduire ainsi la redondance d'informations.

II.5.4 Test de la signification globale de la régression

❖ Coefficient de corrélation (R^2)

C'est le coefficient de corrélation de Bravais Pearson entre Y et Y', c'est à dire entre valeurs observées et prédites par le modèle de régression, il est noté R, sa valeur variée entre 0 et 1. Une bonne corrélation entre l'activité cible et l'activité initiale si r est plus proche de 1.

❖ Test Fisher-Snedecor (F)

Le test de Fisher-Snedecor est un test statistique qui compare les variances de deux échantillons statistiques.

❖ Coefficient de prédiction (Q^2)

Si R^2 est une mesure de la justesse de la corrélation, Q^2 est une mesure de la justesse de la prédiction. Il mesure la capacité prédictive d'un modèle.

Références

- [1] Schulz, K-P. Concepts and application of Molecular Similarity. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **1992**, (96), 1087.
- [2] Hawkins, P.C.D.; Skillman, A.G. & Nicholls, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as virtual screening Tools. *J Med Chem.* **2007**, 50.
- [3] Berman, H. M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235-242.
- [4] Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA (1998). "Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations)". *Pure and Applied Chemistry.* 1998, 70, 1129–1143.
- [5] Voet AR, Kumar A, Berenger F, Zhang KY. Combining in silico and in cerebro approaches for virtual screening and pose prediction in SAMPL4. *J Comput Aided Mol Des.* **2014**, 28, 363–373
- [6] Jones G, Willett P, Glen RC. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J Comput Aided Mol Des.* **1995**, 9, 532–549
- [7] Wolber G, Langer T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J ChemInf Model.* **2005**, 45, 160–169
- [8] Böhm HJ. The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors. *J Comput Aided Mol Des.* **1992**, 6, 61–78.
- [9] Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem.* **1985**, 28, 849–857.
- [10] Helsen C, Van den Broeck T, Voet A, et al. Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *EndocrRelat Cancer.* **2014**, 21, T105–T118.
- [11] Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *PharmacolRev.* **1997**, 49, 403–449.
- [12] ww.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-metabolisme-781/
- [13] Wikipedia
- [14] Valerio, L.G.; Jr. In *silicotoxicology for the pharmaceutical sciences ToxicolApplPharmacol*, **2009**, 241.
- [15] Modern 2D QSAR for drug discovery - Lewis - **2014** - WIREs Computational Molecular Science - Wiley Online Library.

- [16] J. Verma, V. Khedkar, and E. Coutinho, "3D-QSAR in Drug Design - A Review," *Curr. Top. Med. Chem.*, **2010**. 10. 95–115,.
- [17] T. Scior, J. L. Medina-Franco and Q. T. Do, *Curr Med Chem*, **2009**.16. 4297-4313.
- [18] W. Sippl, T. L. Puzyn and K. Cronin, M.T.D., Editor, **2010**, 414.
- [19] R. D. Cramer and M. Milne, American Chemical Society Meeting, 1979, Computer Chemistry Section.
- [20] A. Fortuné, "Techniques de Modélisation Moléculaire appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance." Université Joseph-Fourier-Grenoble I, **2006**.

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1 Introduction

Dans la présente étude, un modèle 3D-QSAR basé sur le ligand et des études d'amarrage moléculaire (docking) sur les dérivés de pyrazoline ont été réalisées pour élucider les caractéristiques structurelles de l'activité anti-amibienne. Pour cette étude on prend les 44 ligands illustrés dans la **figure 3.1**.

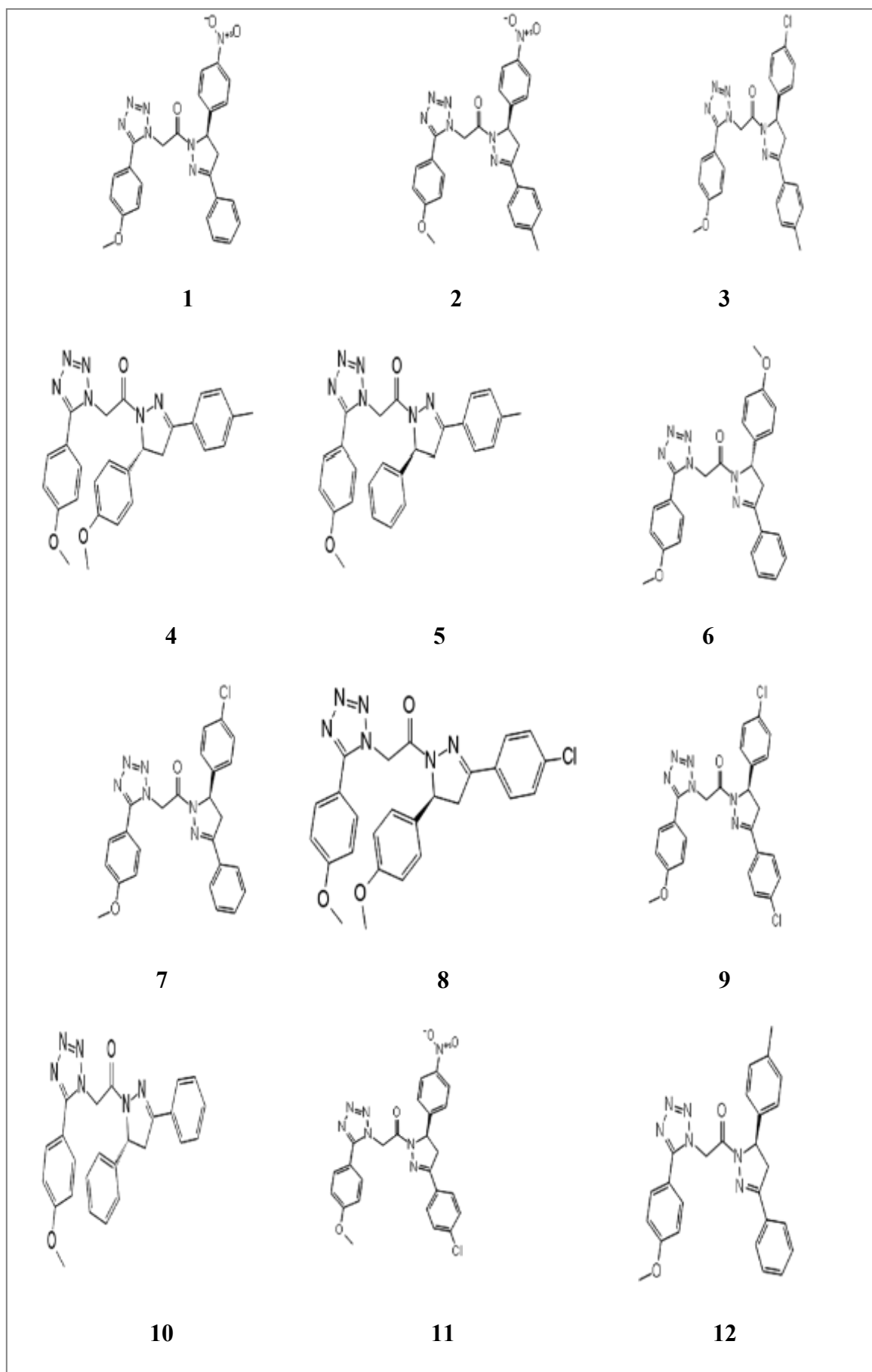
III .2 Matériels et méthodes

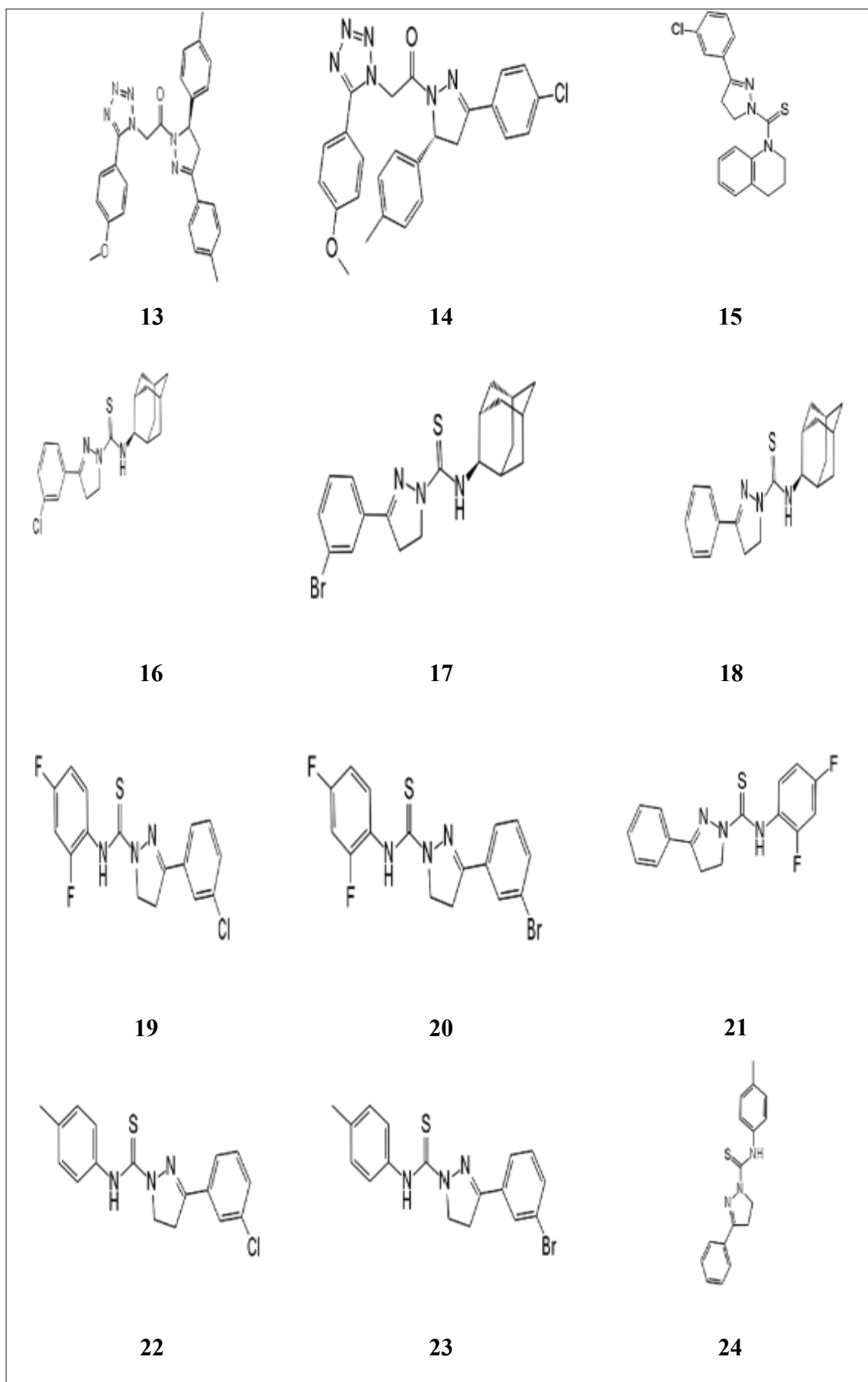
III .2.1 Base de donnéé

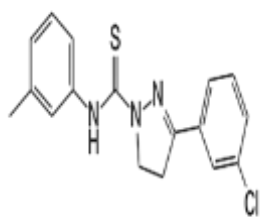
Un ensemble de 44 composés a été recherché dans la base de données PubChem [1] en fonction de l'activité anti-amibienne contre HM1, y compris la souche IMSS d'*E. histolytica*. L'ensemble de données a été divisé statistiquement en un ensemble d'entraînement et un ensemble de test, en considérant 70% du total des composés dans l'ensemble de training (32 composés) et 30% dans l'ensemble de test (12 composés). L'ensemble de training a été exploité pour développer des modèles 3D-QSAR, tandis que l'ensemble de test a été utilisé pour valider la qualité du modèle. Toutes les activités biologiques mises en œuvre dans cette étude ont été exprimées sous la forme $pIC_{50} = -\log_{10}IC_{50}$. Voir le (**tableau 3.1**).

III .2.2 Préparation des ligands

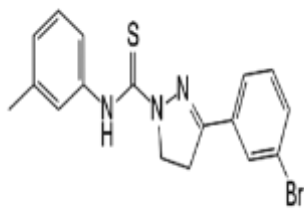
Toutes les molécules ont été construites dans la version 11.5 du programme Maestro [2] et préparées à l'aide de LigPrep (un module implémenté dans le logiciel Schrodinger) pour convertir des structures 2D en structures 3D, générant des stéréoisomères, en utilisant des conditions par défaut pour déterminer le plus probable l'état d'ionisation est à $pH 7,0 \pm 2,0$. En appliquant le champ de force OPLS 2005, un sous-programme **epike** a été utilisée pour neutraliser les structure schargées, ajouter de l'hydrogène et générer des conformères bioactifs à énergie réduite.



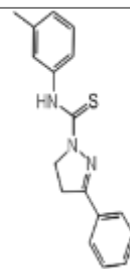




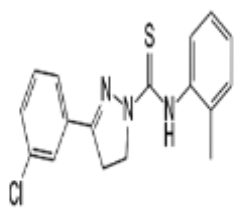
25



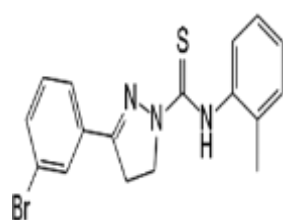
26



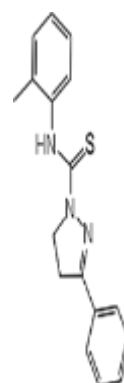
27



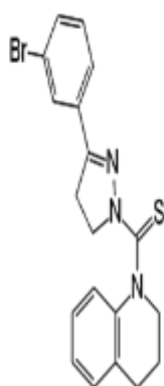
28



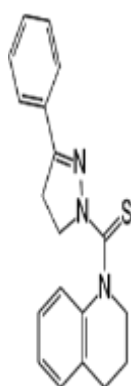
29



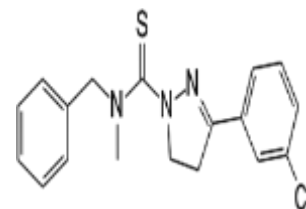
30



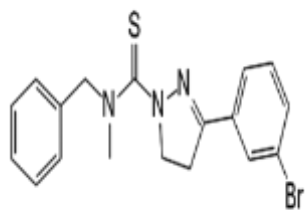
31



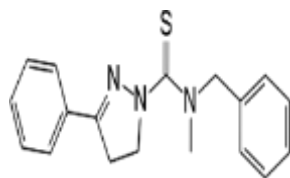
32



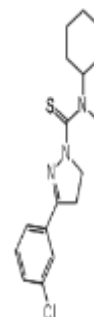
33



34



35



36

eaux ont été supprimées. La minimisation de l'énergie a été réalisée à l'aide du champ de force OPLS 2005 en réglant le RMSD de l'atome lourd à 0,30 Å.

III .2 .4 Génération de grilles de récepteur

Le module Glide [6] du logiciel Schrodinger a été utilisé pour générer des grilles de récepteurs. Les grilles de récepteur sont été définies pour les protéines préparées de manière à ce que les différentes poses de ligands soient situées dans le site actif prédit pendant le docking. Les grilles ont été développées avec les paramètres par défaut du facteur d'échelle de van der Waals de 1,00 et de la coupure de charge de 0,25 grâce à l'utilisation du champ de force OPLS 2005. Une boîte cubique de tailles spécifiques centrée autour du centroïde des résidus du site actif (*le site actif a été trouvé par site Map*) a été créée pour le récepteur. La boîte englobante a été fixée à 10 Å × 10 Å × 10 Å pour les calculs de docking.

III .2 .5 Amarrage (docking)

Quand la grille du récepteur a été générée, les ligands ont été s'amarrent à la protéine en utilisant le protocole d'amarrage de Glide [6]. Le ligand flexible et le mode XP (Extra Precision) ont été utilisés dans la procédure de docking. Les conformères amarrés ont été évalués à l'aide d'un score de docking en considérant les interactions de liaison hydrogène, électrostatique, hydrophobe et pi – pi (π - π).

III .3 Résultats et discussion

III .3.1 Modèle 3D-QSAR

Field-Based QSAR (dans le logiciel Schrödinger) est un outil pour construire un modèle pour la relation entre les valeurs d'activité connues et les caractéristiques 3D d'un ensemble de composés alignés (similaire à l'analyse comparative de champ moléculaire CoMFA / analyse comparative de l'indice de similarité moléculaire CoMSIA). Il pourrait être possible de visualiser le modèle QSAR dans l'espace pour évaluer qualitativement, ce qui nous permet d'ajouter ou de supprimer des groupes fonctionnels et d'utiliser le modèle pour prédire quantitativement les activités d'autres molécules. Le modèle 3D QSAR a été généré en PHASE (module implémenté dans le logiciel Schrödinger) [7] en utilisant 32 composés

comme de training, tandis que le modèle a été validé en utilisant 12 composés en tant que composés de test. Les activités expérimentales et prédites pour l'ensemble de training et l'ensemble de test sont données dans le **tableau III .1**

Tableau III .1: Données d'activité Expérience /prédite pour l'apprentissage (Training) et le test de l'ensemble de ligands.

N ^o de ligand	Ensemble QSAR	Activité Exp	Facteurs PLS	Activité prédite
1	Test	5.434	6	5.716
2	Training	5.580	6	5.645
3	Test	5.546	6	5.708
4	Training	5.966	6	5.906
5	Test	5.92	6	5.764
6	Training	5.535	6	5.832
7	Training	5.519	6	5.390
8	Training	5.58	6	5.781
9	Training	5.332	6	5.354
10	Test	5.27	6	5.712
11	Test	5.31	6	5.647
12	Training	5.89	6	5.715
13	Test	6.065	6	5.711
14	Training	5.582	6	5.646
15	Training	5.752	6	5.654
16	Training	6.328	6	6.236
17	Training	6.236	6	6.288
18	Training	5.747	6	5.843
19	Training	6.292	6	6.107
20	Training	6.173	6	6.152
21	Test	5.754	6	5.730
22	Training	5.619	6	5.824
23	Training	5.273	6	5.227
24	Training	5.019	6	5.125
25	Test	5.551	6	5.659
26	Training	5.474	6	5.698
27	Training	5.300	6	5.299
28	Training	5.774	6	5.662
29	Test	5.417	6	5.707
30	Training	5.302	6	5.244
31	Training	5.556	6	5.700
32	Test	5.208	6	5.259
33	Training	5.536	6	5.435
34	Training	5.352	6	5.429
35	Test	5.136	6	5.383
36	Training	5.43	6	5.336
37	Training	5.279	6	5.340
38	Training	5.226	6	5.312
39	Test	6.050	6	5.840
40	Training	5.962	6	5.882
41	Training	5.357	6	5.725

42	Training	5.636	6	5.524
43	Training	5.549	6	5.533
44	Training	5.428	6	5.363

Un modèle à six facteurs de PLS avec de bonnes statistiques et une capacité prédéterminée a été généré pour l'ensemble de données. Les valeurs statistiques ont été répertoriées dans le **tableau 3.2** Les résultats de QSAR montrent le meilleur coefficient de régression de R^2 (0,837), une grande valeur de F (35.3) et une valeur P (1,11e-014), une petite valeur de l'écart type (0,135), RMSE (0,14) et des valeurs élevées de Pearson-P (0,913) indiquent un modèle de régression statistiquement significatif. Le modèle a été validé par un bon coefficient de corrélation pour l'ensemble de test ($Q^2 = 0,766$). Le graphique de l'activité biologique observée par rapport à l'activité biologique prévue des ensembles de training et de test est illustré dans la **figure III .2**

Tableau III .2: Valeurs statistiques pour le modèle 3D-QSAR généré par PLS.

Facteurs	SD	R^2	F	P	RMSE	Q^2	Pearson-r
1	0.260	0.328	22.5	2.04e	0.30	0.284	0.670
2	0.436	0.436	17.4	2.48e	0.38	0.355	0.749
3	0.578	0.576	20.0	2.58e	0.23	0.581	0.860
4	0.178	0.704	25.6	6.79e	0.16	0.781	0.911
5	0.149	0.798	33.3	1.38e	0.21	0.632	0.816
6	0.135	0.837	35.3	1.11e	0.14	0.766	0.913

Avec : **SD:** écart type de la regression ; **R^2 :** coefficient de regression ; **F:** rapport de la variance du modèle à la variance de l'activité observée (ratio de variance).**P:** niveau de signification du rapport de variance ; **Q^2 :** coefficient de corrélation à validation croisée pour l'ensemble de test ; **RMS:** l'erreur RMS dans les prédictions de l'ensemble de test.

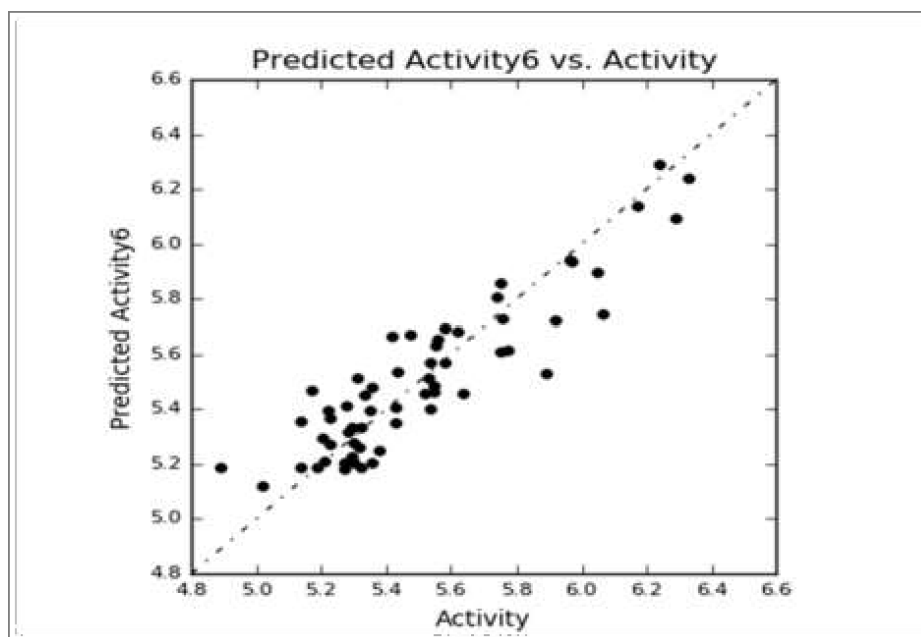


Figure III .2: Graphique de corrélation de pIC50 expérimental et prédit des ensembles d'apprentissage et de test.

Les contributions relatives des champs stériques, électrostatique, hydrophobe, accepteur de liaison d'hydrogène et donneur de liaison d'hydrogène sont de 0,332, 0,182, 0,328, 0,118 et 0,052, respectivement (voir le **tableau III.3** pour le PLS optimal). La validité effective du modèle est indiquée par sa capacité à prédire l'activité biologique de nouvelles molécules. Comme on peut le voir dans le **tableau III .3** les champs stérique et hydrophobe contribuent de manière significative à l'activité par rapport aux champs électrostatique, accepteur de liaison d'hydrogène et donneur de liaison d'hydrogène, respectivement.

Tableau III .3: Détails des calculs du modèle QSAR basé sur le champ.

Facteurs	Stérique gaussien	Electrostatique gaussien	Hydrophobe gaussien	Accepteur H bond	Donneur H bond
1	0.537	0.071	0.249	0.114	0.026
2	0.049	0.084	0.247	0.137	0.039
3	0.416	0.111	0.302	0.106	0.063
4	0.362	0.142	0.335	0.108	0.050
5	0.34	0.173	0.328	0.103	0.053
6	0.332	0.182	0.328	0.118	0.052

Les données d'interaction sont utilisées pour construire un modèle de régression PLS avec un grand nombre de coefficients. Dans le but de faciliter la compréhension de ce modèle, les résultats sont généralement représentés sous forme de zones de contour

indiquant les régions favorables et défavorables aux interactions stériques, électrostatiques, hydrophobes, accepteur de liaison hydrogène et donneur de liaison hydrogène..

Les contours QSAR basés sur le champ pour les propriétés stériques, électrostatiques, hydrophobes, donneurs de liaisons d'hydrogène et accepteurs de liaisons d'hydrogène sont présentés dans les **figures III.3 à III.7** respectivement. Dans les cartes de contours, chaque contour coloré correspond à des propriétés spécifiques. Dans le champ stérique, les contours verts montrent les régions où les groupes volumineux augmentent la fonction biologique, tandis que les contours jaunes montrent les régions où les groupes volumineux diminuent l'activité.

Dans le champ électrostatique, les contours rouges correspondent aux régions favorisées par une électrostatique positive, tandis que les contours bleus indiquent les régions favorisées par une électrostatique négative. Les contours jaunes correspondent aux régions favorisées par l'hydrophobie, tandis que les contours blancs correspondent aux régions défavorisées par l'hydrophobie. Les contours magenta et rouges correspondent à des régions favorables et défavorables pour les accepteurs de liaison d'hydrogène, respectivement, tandis que les contours violets et cyans représentent des régions favorables et défavorables pour les groupes donneurs de liaison d'hydrogène, respectivement.

Les cartes de contours des stérique de QSAR basé sur le champ de la **figure III.3** ne montrent aucune présence de contours jaunes sur le ligand de référence (ligand 16), ce qui révèle l'absence de régions défavorables. La présence de grands contours verts sur les anneaux d'adamantine, de pyrazoline et de benzène indique un stérique important dans ces régions. Par conséquent, des substituants volumineux dans ces régions augmentent l'activité.

Les cartes de contours électrostatiques de QSAR basé sur le champ sont présentées dans la **figure III.4**. Le contour bleu indique la zone où les groupes positifs sont nécessaires pour une activité élevée, tandis que la zone rouge correspond à une région favorable aux groupes négatifs.

Les cartes de contour hydrophobes de QSAR basé sur le champ sont présentées dans la **figure III.5**. Les contours blancs indiquent les régions d'interaction hydrophobe défavorable près des cycles d'adamantine et de pyrazoline. Les contours jaunes sont situés près du cycle benzénique, ce qui indique que tout groupe volumineux à cette position correspond à des régions hydrophobes favorables.

Les cartes de contours des donneurs de liaison hydrogène de QSAR basé sur le champ sont présentées dans la **figure III.6** Les cartes de contour révèlent les parties favorables (violet) et défavorables (cyan) des donneurs de liaison hydrogène. Les contours violets sont visualisés près de l'anneau d'adamantine attaché à l'atome d'azote, ce qui indique que les fonctionnalités de donneur de liaison hydrogène dans cette zone augmentent l'activité. Les cartes de contour accepteur de liaison hydrogène de QSAR basé sur le champ (**figure III.7**) sont indiqués par des contours rouges et magenta, les contours rouges correspondent aux parties où les accepteurs de liaison hydrogène sont favorables, et les contours magenta indiquent les parties où les accepteurs de liaison hydrogène sur les inhibiteurs sont défavorables à l'activité. Dans cette position (rouge), tout substituant contenant un groupe accepteur augmente l'activité.

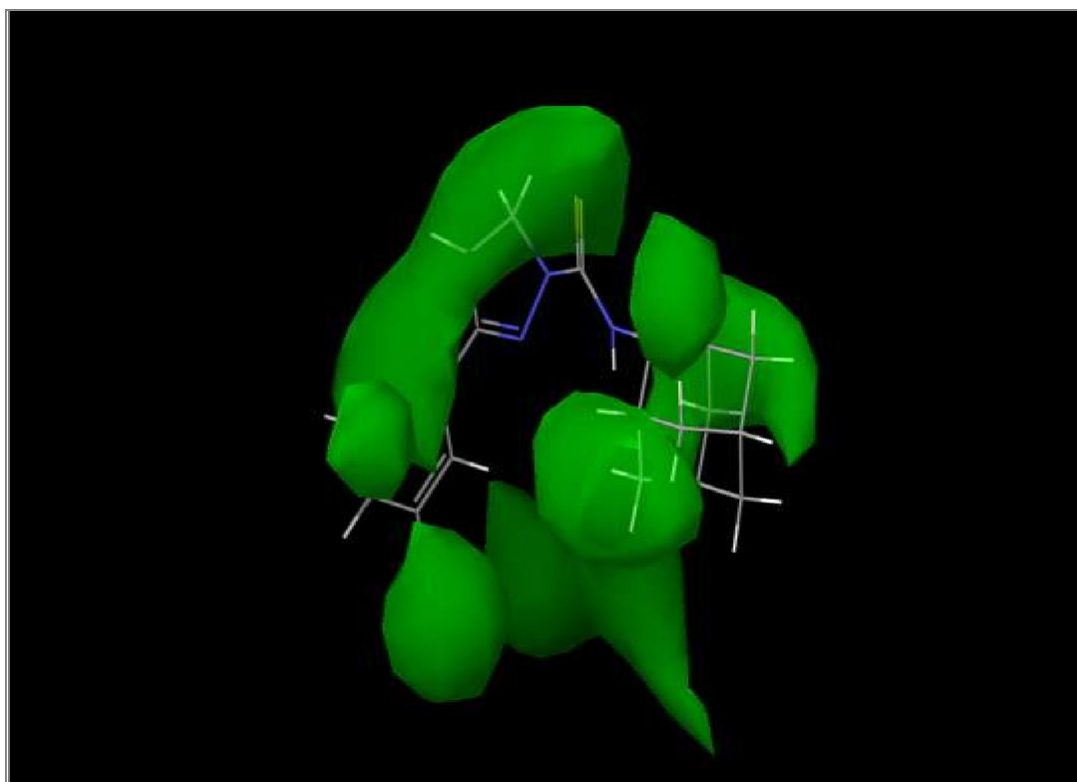


Figure III.3 : Aires du champ gaussien stérique pour le ligand 16 (ligand de référence)

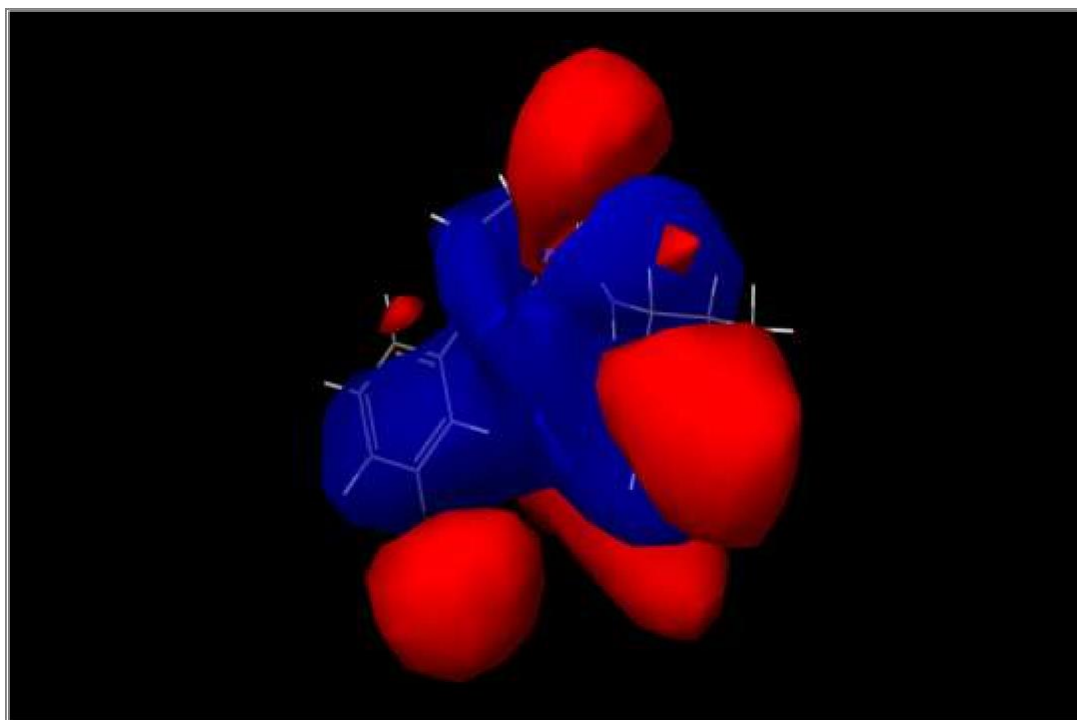


Figure III.4 : Aires du champ gaussien électrostatique pour le ligand 16.

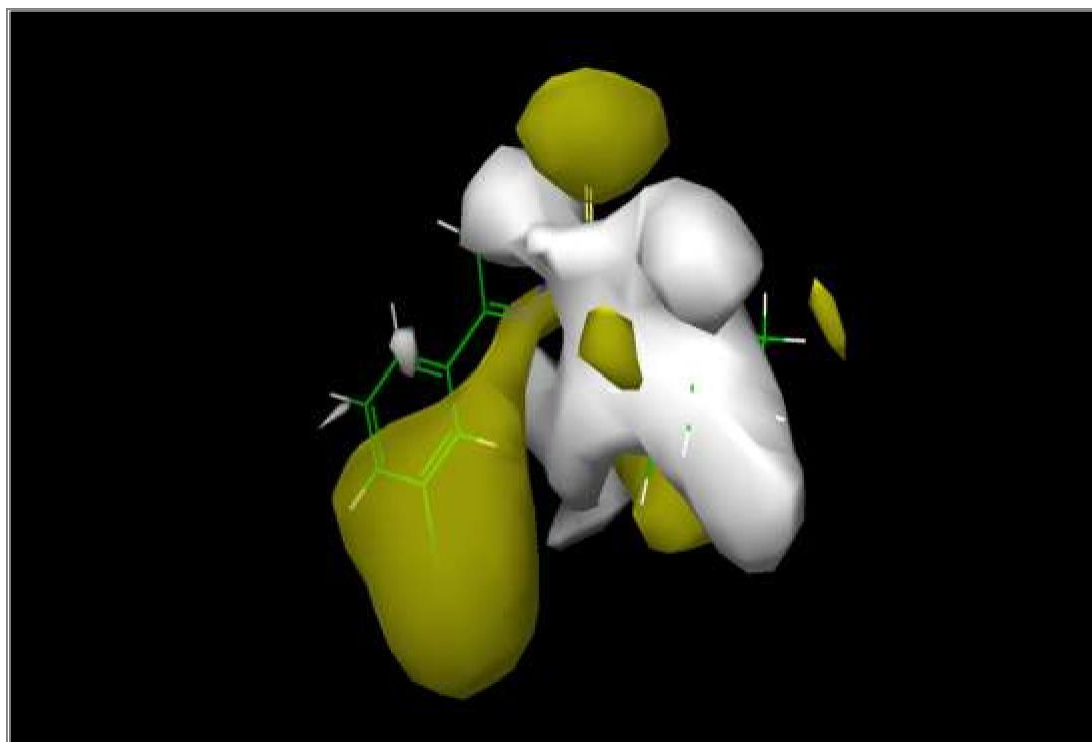


Figure III.5 : Aires du champ gaussien d'hydrophobe pour le ligand 16

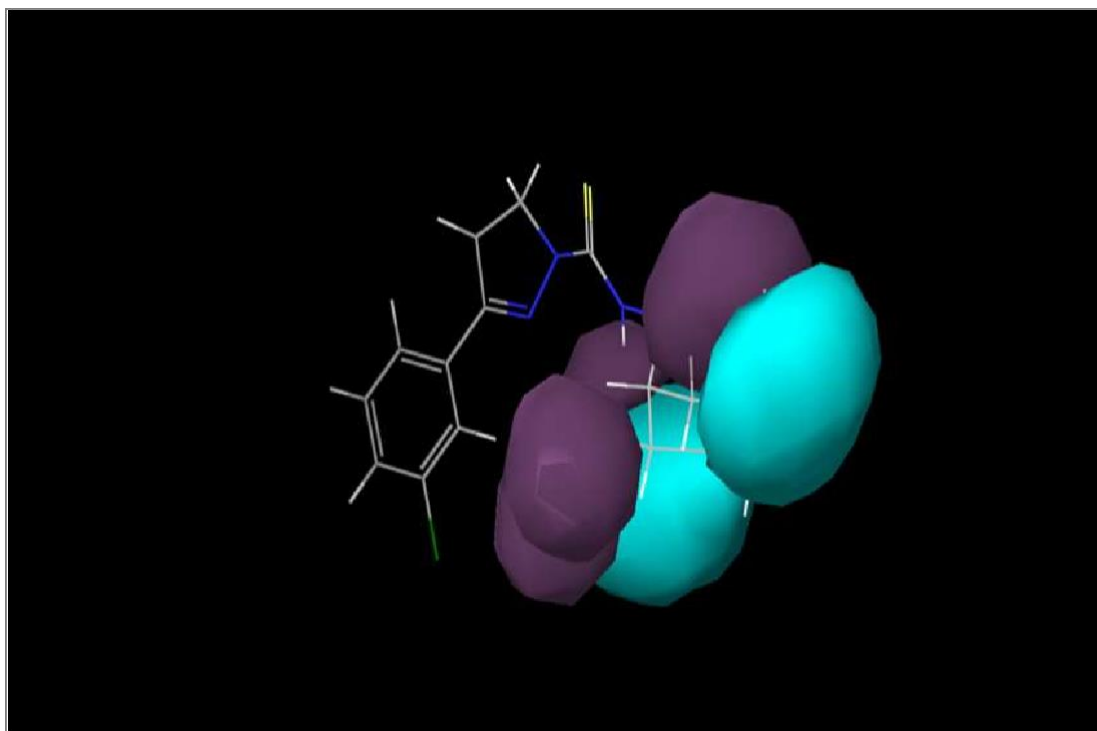


Figure III.6 : Aires du champ gaussien donneur de liaison d'hydrogène pour le ligand 16.

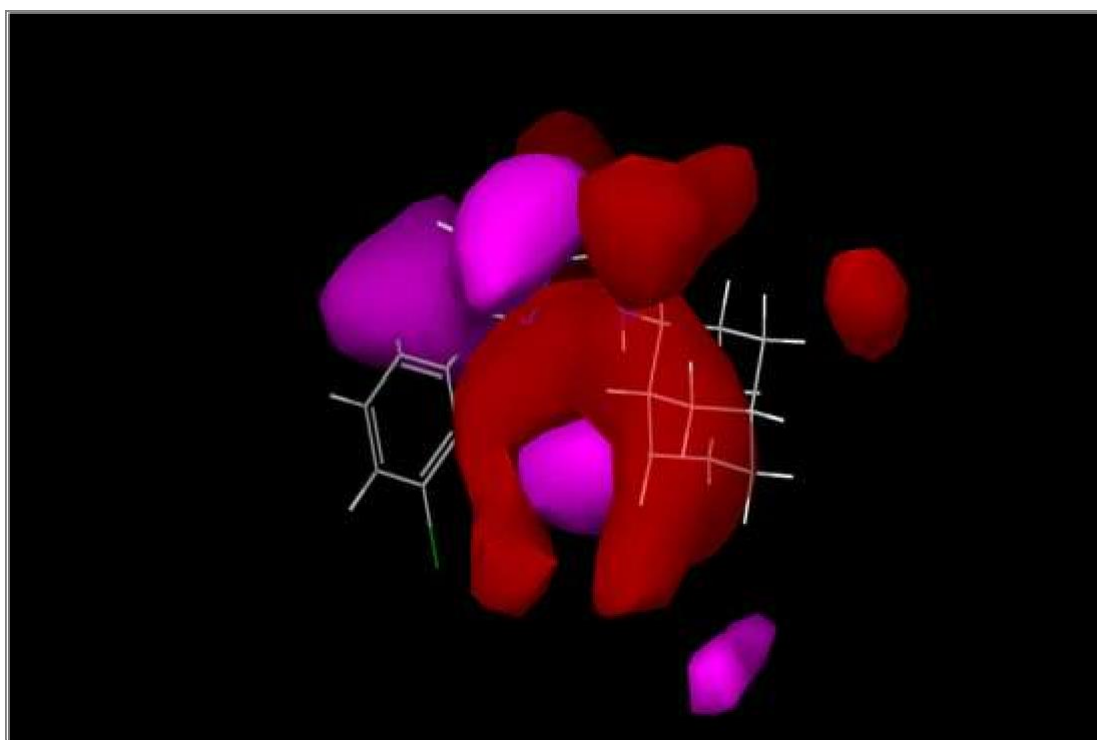


Figure III.7 : Aires du champ gaussien accepteur de liaison d'hydrogène pour le ligand 16

III.3.2 Doking

L'examen des sites de liaison a été effectué à l'aide de l'outil SiteMap du logiciel Schrodinger. SiteMap a trouvé cinq sites à partir du score du site qui comprend la taille, le volume, l'exposition aux acides aminés, la fermeture, le contact, l'hydrophobie, l'hydrophilie et le rapport donneur/accepteur. Les sites ayant un score de 1 et plus peuvent être un site idéal pour la liaison du ligand. Le meilleur niveau de sites potentiels de liaison des récepteurs a été identifié à l'aide de SiteMap. Le meilleur site avait un score de 0,99 pour le site, 1,02 pour le Dscore, 234,3 pour le volume, 3,74 pour le donneur/accepteur de liaison hydrogène, 0,87 pour l'hydrophilie et 0,56 pour l'hydrophobie. Le site actif le plus susceptible d'effectuer le processus d'amarrage se compose des acides aminés suivants : PHE292, LEU291, VAL266, HIE264, LEU263, LYS261, MET260, LYS259, GLY258, LEU90, ASN89, ASN88, VAL87, PHE3, MET1, GLN2, VAL41, et GLN40, respectivement.

Des études de docking ont été réalisées pour connaître l'interaction intermoléculaire du ligand avec l'enzyme ciblée en appliquant le module Glide [22]. La technique de docking a été réalisée pour étudier le mode de liaison des ligands actifs sur le récepteur (5ZEF) et obtenir des informations pour une optimisation ultérieure de la structure. La génération de la grille pour déterminer le site de liaison sur le récepteur a été effectuée via le panneau de génération de la grille du récepteur avec les paramètres par défaut. Glide XP a été utilisé pour le docking. Pour estimer le docking des ligands protonés, le score de docking doit être pris en compte. Ainsi, dans ce travail, un score de docking a été appliqué pour comparer la stabilité des complexes simulés. Le score moyen de docking obtenu pour les inhibiteurs potentiels 13, 16, 17, 19, 20 et 39 était de -4,03, -3,538, -3,535, -5,176, -4,96 et -4,34, respectivement. Ensuite, le complexe inhibiteur 19 / 5ZEF est plus stable que les complexes inhibiteurs 13 / 5ZEF, inhibiteurs 16 / 5ZEF, inhibiteurs 17 / 5ZEF, inhibiteurs 20 / 5ZEF, et inhibiteurs 39 / 5ZEF. Parmi ces inhibiteurs étudiés, l'inhibiteur 35 avait un score de docking plus élevé par rapport à tous les ligands actifs. Les résultats de l'analyse de docking sont décrits dans le **tableau III.4** et les **figures (de III.8 jusqu'à III.13)**.

Etudes de docking des ligands 16 et 17 ont montré que l'atome d'azote (NH) agit comme un donneur de liaison d'hydrogène et établit une liaison d'hydrogène avec le résidu PHE 292 pour les deux structures. Pour les ligands 19, le cycle benzénique (contient deux atomes de fluor) du ligand fait des interactions π - π avec le résidu PHE 3. Pour les ligands

20, le cycle benzénique (contient deux atomes de fluor) du ligand fait des interactions π - π avec le résidu PHE 3, et l'atome d'azote (NH) agit comme un donneur de liaison hydrogène et fait une liaison hydrogène avec le résidu LEU263. Pour les ligands 12, le cycle benzénique (contenant le groupe CH₃) du ligand réalise des interactions π - π avec le résidu PHE 3, et l'atome O du groupe amide réalise une liaison hydrogène accepteur avec le HIE 264. Pour les ligands 39, le cycle benzénique (contenant un atome de chlore) du ligand fait une interaction π - π (π -cation) avec le LYS 261. Ces interactions globales avec le PHE 3 pourraient être la raison du score élevé de docking et donc, il promet d'être puissant et également sélectif pour l'activité anti-amibienne.

Tableau 3.4: Résultats de score de docking des ligands sélectionnés.

N^o Ligands	Docking score	Glide energie
13	4.03	-41.30
16	-3.54	-35.62
17	-3.53	-44.45
19	-5.18	-34.50
20	-4.94	-37.80
39	-4.34	-34.73

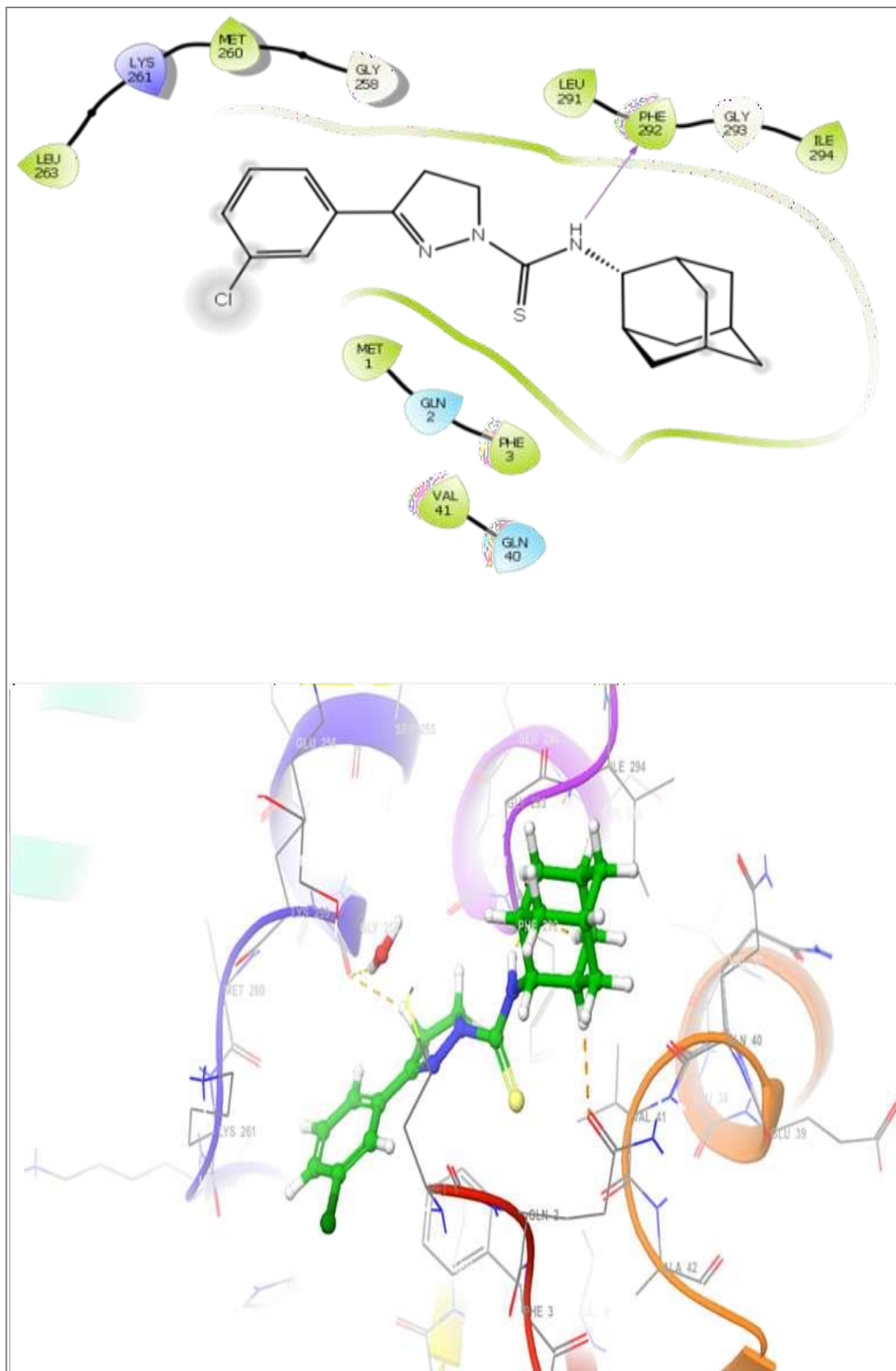


Figure III.8 : Interaction de liaison en 2D/3D de ligand 13 au niveau du site actif de 5ZEF.

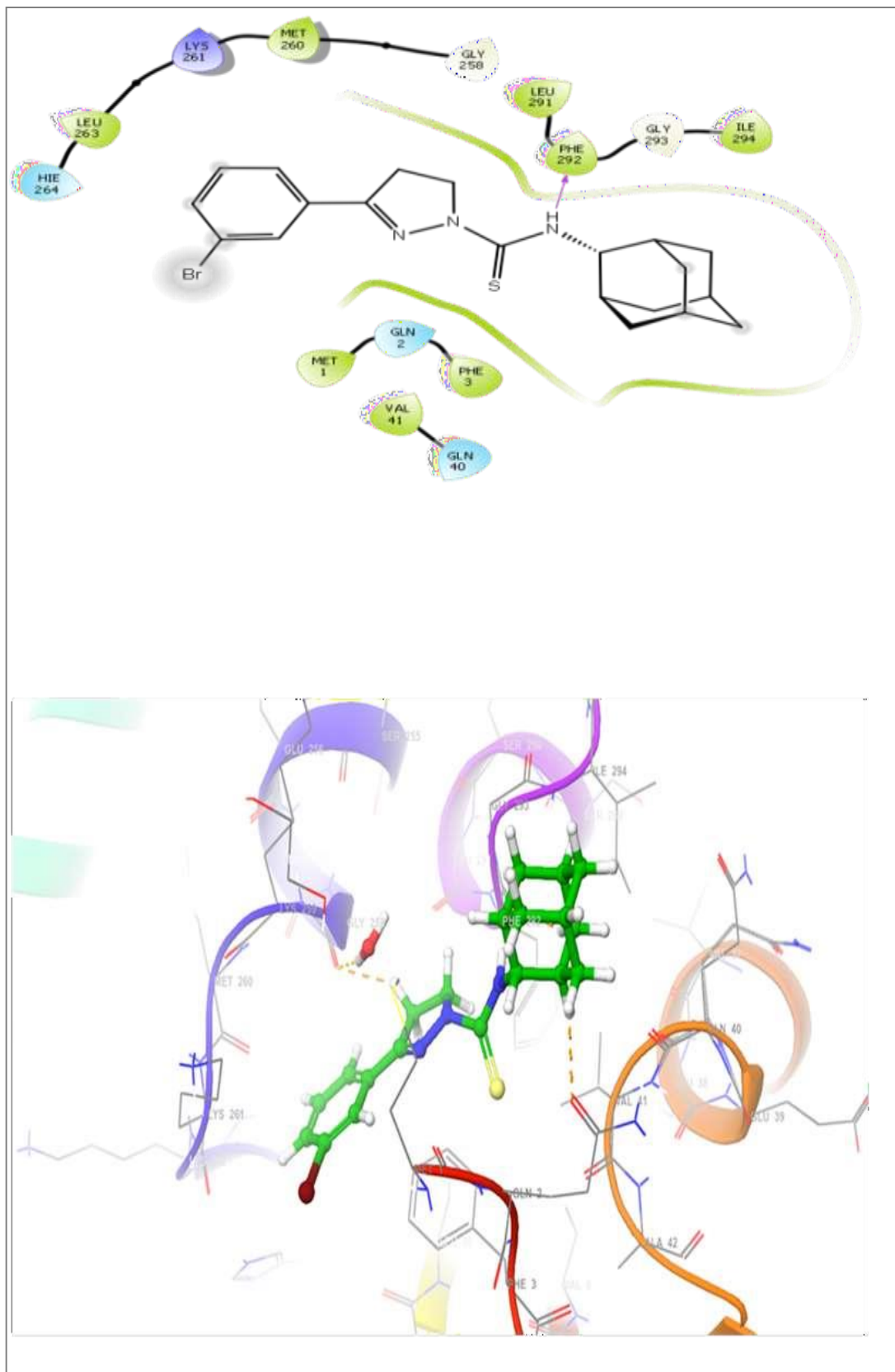


Figure III.9 : Interaction de liaison en 2D/3D de ligand 16 au niveau du site actif de 5ZEF.

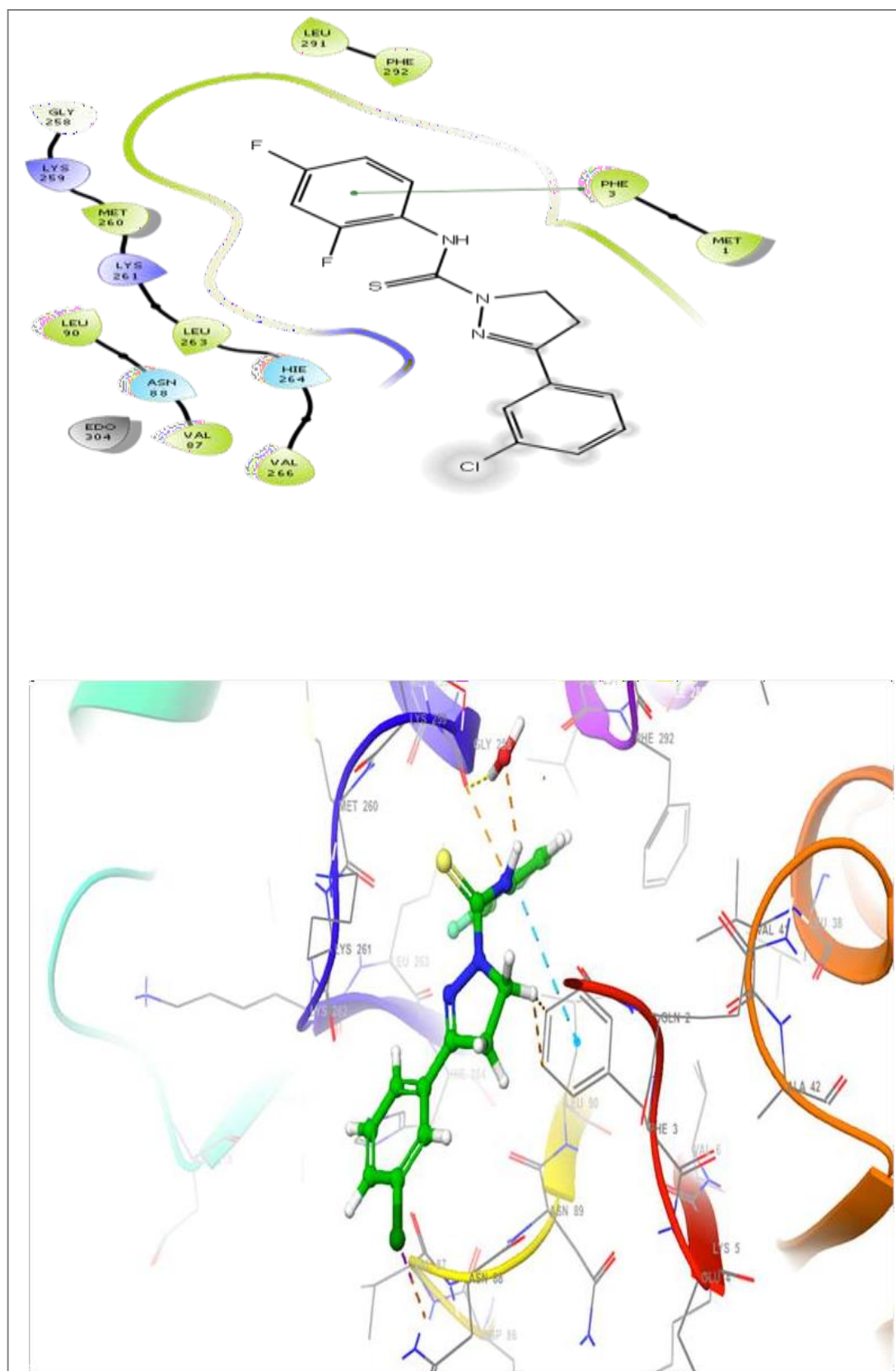


Figure III.10 : Interaction de liaison en 2D/3D de ligand 17 au niveau du site actif de 5ZEF.

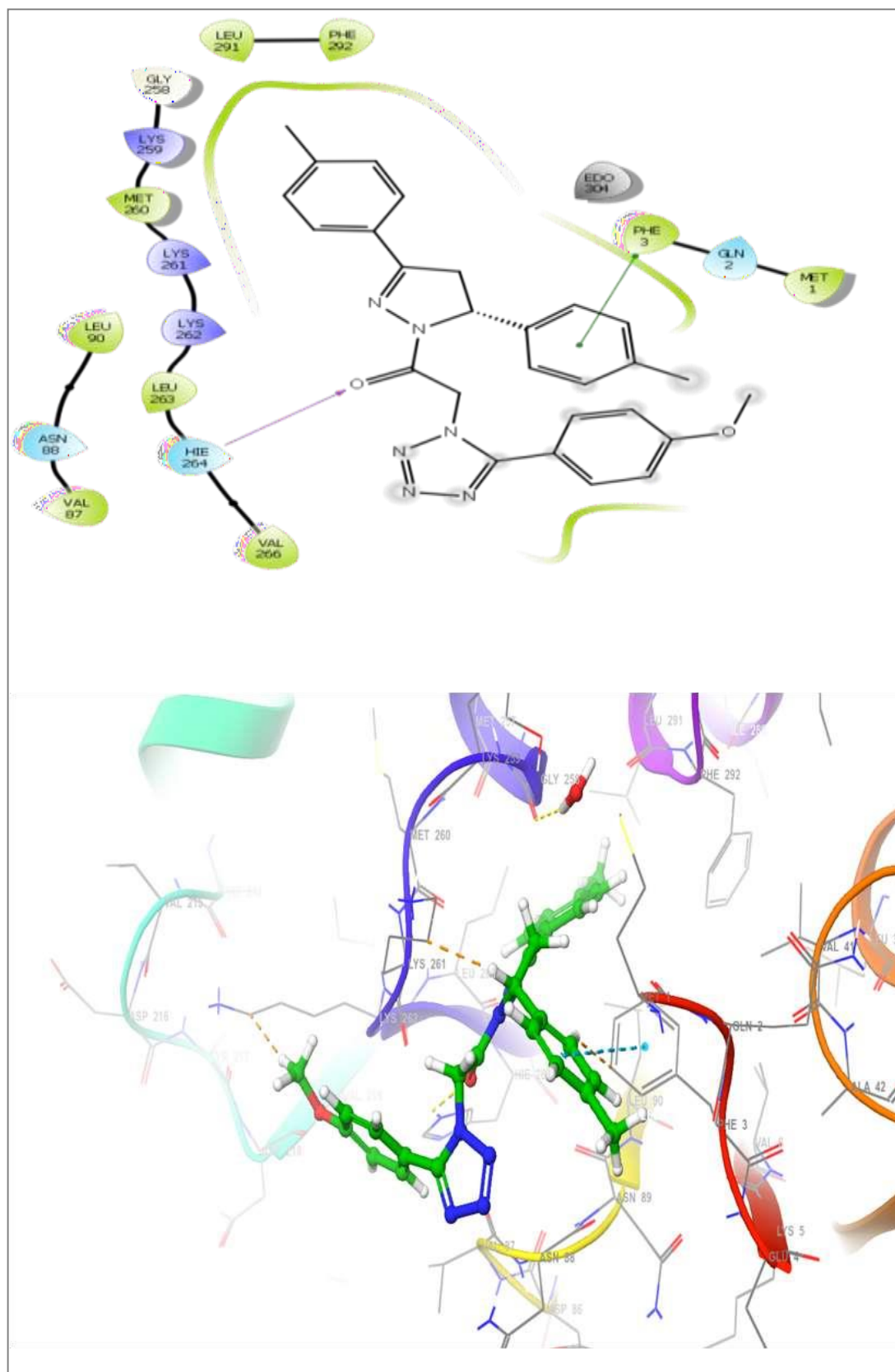


Figure III.12 : Interaction de liaison en 2D/3D de ligand 20 au niveau du site actif de 5ZEF.

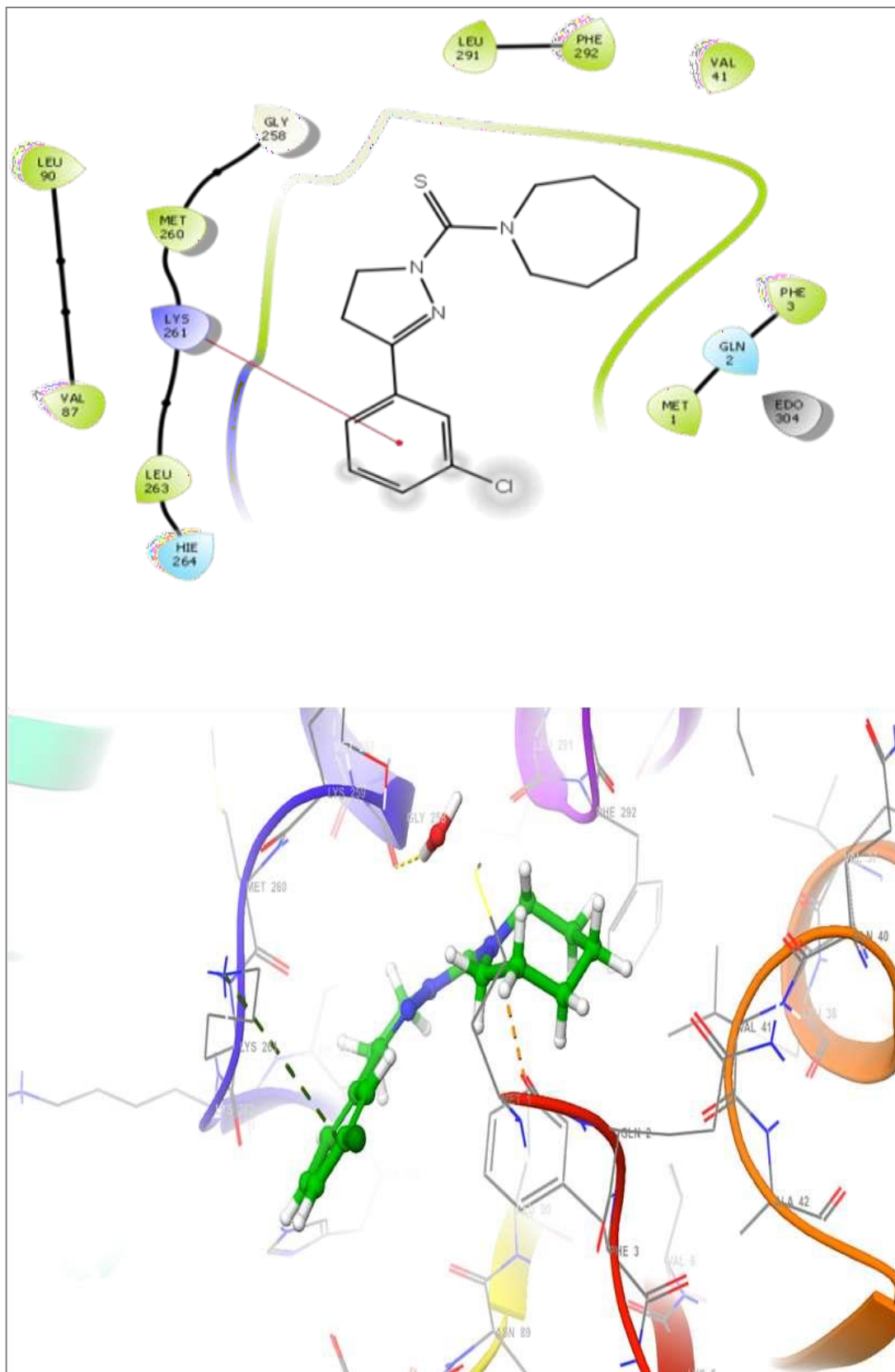


Figure III.13 : Interaction de liaison en 2D/3D de ligand 39 au niveau du site actif de 5ZEF.

❖ **Propriétés ADMET**

Les propriétés analytiques ADMET (absorption, distribution, métabolisme, élimination, toxicité) des composés peuvent être déterminées in-silico à l'aide du module qikprop de la Schrödinger Suite 2018. Ainsi, nous avons évalué les descripteurs physiochimiques et les propriétés pharmaceutiquement pertinentes des ligands actifs pour analyser les propriétés des médicaments (**tableaux III.5.a et III.5.b**)

Le nombre calculé de réactions métaboliques probables (# metab) est compris entre 1 et 6. Tous les ligands actifs ont montré de bonnes valeurs de coefficient de partage (QP log Po/w) (4,7 à 5,77), qui sont critiques pour l'absorption et la distribution des médicaments. Le nombre approximatif de liaisons hydrogène qui seraient données par le soluté aux molécules d'eau dans une solution aqueuse des composés est compris entre 0 et 1. Le nombre estimé de liaisons hydrogène que le soluté accepterait des molécules d'eau dans une solution aqueuse des composés est compris entre 3 et 7.

Tableau III.5: . Criblage ADMET in silico pour les ligands sélectionnés.(a)

Ligand	QPlogBB	QPlogHERG	QPlogKP	QPPcaco	QPPMD CK
13	-0.731	-6.80	-1.81	1051.6	10000
16	0.68	-5.28	-1.14	7402.15	10000
17	-0.70	-5.30	-1.12	7504.1	10000
19	0.86	-6.13	-0.64	7139.7	10000
20	0.73	-5.86	-0.92	5352.8	10000
39	0.71	-4.37	-1.33	6963.7	10000

(b)

Ligand	Donneur HB	Accepteur HB	QPLog PO /W	#metab	QPlogKhsa	Règle de cinq	%Humane Orale Absorption
13	0	7	5.05	6	0.80	1	100
16	1	3	5.68	1	1.06	1	100
17	1	3	5.77	1	1.09	1	100
19	1	3	5.29	1	0.68	1	100
20	1	3	5.23	1	0.70	1	100
39	0	3	4.7	1	0.63	0	100

Le nombre de violations de la règle des cinq de Lipinski est compris entre 0 et 1. Les composés ont 100 % d'absorption orale humaine. Le coefficient de partage estimé cerveau/sang (QPlogBB) est compris entre 0,713 et 0,865. Ainsi, presque toutes les

propriétés des ligands actifs se situent dans les valeurs recommandées. D'après ces résultats, nous pouvons dire que les ligands actifs peuvent être utilisés dans les essais cliniques en raison de leurs bonnes propriétés ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion). Les détails des propriétés ADMET pour les ligands actifs sont présentés dans (**tableaux III.5.a et III.5.b**).

- **Donneur HB** : Nombre estimé de liaisons hydrogène qui seraient données par le soluté aux molécules d'eau dans une solution aqueuse.
- **Accepteur HB** : Nombre estimé de liaisons hydrogène qui seraient acceptées par le soluté à partir de molécules d'eau dans une solution aqueuse.
- **QPlogPo / w** : Coefficient de partage octanol / eau prévu.
- **QPlogHERG** : Valeur IC50 prévue pour le blocage des canaux HERG K⁺.
- **QPPCaco** : Perméabilité apparente prévue des cellules Caco-2 en nm / s. Les cellules Caco-2 sont un modèle pour la barrière intestinale.
- **QPlogBB** : Coefficient de partage cerveau / sang prédit. Remarque
- **QPPMDCK** : Perméabilité apparente prévue des cellules MDCK en nm / s. Les cellules MDCK sont considérées comme une bonne imitation de la barrière hémato-encéphalique.
- **QPlogKp** : Perméabilité cutanée prévue.
- **# Metab** : Nombre de réactions métaboliques probables.
- **QPlogKhsa** : Prédiction de la liaison à l'albumine sérique humaine
- **Pourcentage d'Absorption Humaine Orale** : Absorption orale humaine prédite sur une échelle de 0 à 100% La prédiction est basée sur un modèle de régression linéaire multiple quantitative.
- **Rule Of Five** : Nombre de violations de la règle de Lipinski de cinq.

Références

- [1] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [2] Maestro v11.5, Schrödinger, LLC, New York, USA.
- [3] Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>).

- [4] Schrödinger suite **2018**, LLC, New York, USA.
- [5] Halgren T () New Method for Fast and Accurate Binding-site Identification and Analysis ChemBiol Drug Des **2007**, 69, 146-148.
- [6] GLIDE (v.8.3), Schrodinger, **2018**, LLC, New York, USA.
- [7] Phase (v.5.4), Schrodinger, **2018**, LLC, New York, USA.

Conclusion Générale

Dans cette étude, les analyses de modèles QSAR basées sur le champ ont été appliquées pour évaluer l'activité anti-amibienne d'un ensemble de dérivés de la pyrazoline. Les modèles QSAR ont montré les meilleurs résultats statistiques en termes de valeurs r^2 et q^2 ($r^2=0,837$, $q^2=0,766$). Les effets des champs stériques, électrostatiques, hydrophobes et donneurs/accepteurs de liaisons d'hydrogène sur l'activité biologique ont été expliqués en analysant les cartes de contour QSAR basées sur les champs. Les résultats montrent que les champs stérique et hydrophobe contribuent davantage à la réactivité que les champs électrostatique, accepteur de liaison H et donneur de liaison H, respectivement. Le docking a été utilisé pour étudier le mode de liaison des ligands actifs sur le récepteur 5ZEF afin d'obtenir des informations pour une optimisation ultérieure de la structure. Le ligand 16 présente le meilleur score de docking. Le criblage ADMET insilico de ces ligands actifs a également été réalisé et les valeurs de toutes les propriétés sont dans les limites des valeurs recommandées. Les résultats obtenus dans cette étude présentent une approche pour prédire l'affinité des dérivés de pyrazoline en relation avec l'activité anti-amibienne.