



HAL
open science

**In silico drug design et chimie médicinale :
développement de nouvelles molécules coumariniques,
sélectives de la cyclooxygénase-2**

Anita-Marie Rayar

► **To cite this version:**

Anita-Marie Rayar. In silico drug design et chimie médicinale : développement de nouvelles molécules coumariniques, sélectives de la cyclooxygénase-2. Médecine humaine et pathologie. Conservatoire national des arts et métiers - CNAM, 2017. Français. NNT : 2017CNAM1085 . tel-01661380

HAL Id: tel-01661380

<https://theses.hal.science/tel-01661380>

Submitted on 11 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE présentée par :

Anita-Marie RAYAR

soutenue le : 20 janvier 2017

pour obtenir le grade de : **Docteur du Conservatoire National des Arts et Métiers**

Discipline / Spécialité : Chimie organique, minérale, industrielle / Spécialité :
Bioinformatique

***In silico* drug design et chimie médicinale :
développement de nouvelles molécules
coumariniques, sélectives de la
cyclooxygénase-2**

THÈSE dirigée par :

M. ZAGURY Jean-François

Mme. FERROUD Clotilde

Professeur, Directeur de thèse, Cnam

Professeure, Co-Directrice de thèse, Cnam

RAPPORTEURS :

Mme. DUMAS Françoise

Mme. VIAUD-MASSUARD Marie-Claude

Directrice de recherche, Université Paris-Sud

Professeure, Université de Tours

JURY :

M. DODD. Robert H.

M. LIAGRE Bertrand

Directeur de recherche, ICSN, Gif-sur-Yvette

Professeur, Université de Limoges

EXAMINATEURS :

Mr. MONTES Matthieu.

Mme. SYLLA Maite

Professeur, Encadrant, Cnam

Maître de conférences, Encadrante, Cnam

« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite.

Un plein effort est une pleine victoire »

Mahatma Gandhi

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeure Clotilde Ferroud et le Professeur Jean-François Zagury de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire respectif. La confiance que vous m'avez accordée, vos conseils et vos bonnes humeurs m'ont permis de mener à bien ce projet pendant ces trois années de thèse.

Plus particulièrement, merci Clotilde, pour votre disponibilité, votre humour et la séance mémorable « in english » que l'on a passé ensemble ! Jean-François, merci pour vos séminaires organisés dans des endroits magiques, pour vos discussions et encouragements.

J'adresse tous mes remerciements à mes deux encadrants : le Professeur Matthieu Montes et le Docteur Maité Sylla pour leur encadrement, leurs conseils, leur patience, leur soutien et leur écoute tout au long de ces années de thèse. Maité, merci de m'avoir suivie jusqu'au bout, et pour le temps passé pour la rédaction de ce manuscrit. Parmi tous les souvenirs, je citerai la journée de la fête de la Science que j'ai partagée avec vous : inoubliable ! Un vrai délice de l'avoir préparée et assistée avec vous ! Matthieu, merci pour nos discussions.

Je tiens à remercier le Professeure Marie-Claude Viaud-Massuard et le Docteur Françoise Dumas d'avoir accepté d'être rapporteur de la thèse.

Je tiens également à remercier le Docteur Robert H. Dodd et le Professeur Bertrand Liagre d'avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse.

Au cours de ces trois années, j'ai eu l'occasion de travailler avec deux équipes. Chacune d'entre elles est constituée de personnes toutes aussi loufoques que très intéressantes. Leur personnalité unique ont assuré une ambiance vivante et ont fait de mes journées des moments agréables passés à leurs côtés.

Dans l'équipe de bioinformatique : Nathalie, merci à toi de m'avoir fait découvrir, à ta manière, l'univers du drug design. Merci de m'avoir épaulée et soutenue quand je suis passée de la paillasse à un écran d'ordinateur. Merci pour ta patience, tes explications, et les corrections que tu m'as apportées pour ce manuscrit. Je garde également de très bons souvenirs des blinks tests, du séminaire de Lille où chargées comme pas possible on a passé un excellent moment avec des collègues bordelais et où on a cherché (désespérément) avant que les boutiques ne ferment des chocolats ou gauffres lilloises. Sigrid, j'ai passé énormément de moments avec toi. En partageant le même bureau, j'ai eu l'occasion de découvrir (et apprécier !) ton caractère vraiment unique : ton humour associé à ton franc-parler c'est tout ce que j'adore ! Ecouter de la musique balayant les années 80 à 2000, égayaient mes journées. Et surtout, tu t'es révélée être un véritable soutien pour la dernière ligne droite de ma thèse ; et pour cela je t'en suis extrêmement reconnaissante. Vincent (le biostatisticien

rappeur et footballeur), Damien (et « sa fausse » origine indienne), Taoufik (toujours présent quand il faut), Marc (le mangeur de chocolat...ou de stylos? il y a-t-il vraiment une différence pour toi?!), Josselin (the « english men » de l'équipe, organisateur de « Journals Club »), Daniella (tu me surprendras toujours !), Cédric (et sa passion pour le foot), Charly (euh... 'trankilou'), Christiane (LA secrétaire de l'équipe irremplaçable !) et Juan Jo (le gentil espagnol, fou du volant !)...vous avez été tous géniaux ! Pour les nouveaux de l'équipe, venant des « trois » coins de la France : Florent (Metz), Manon (Poitiers) et Jérémy (Dijon) je vous souhaite de passer de très bons moments dans cette équipe ! Je n'oublie pas l'équipe de Peptinov que j'ai eu l'occasion de rencontrer : Hadley, Lucille, Barbara, Gabriel, et Hervé.

Dans l'équipe de chimie : Zac et Catherine, merci pour vos précieux conseils, et d'avoir partagé avec moi votre expérience personnelle, j'ai apprécié discuter avec vous. Gilbert et Annie merci pour vos disponibilités et votre sagesse. Christophe merci pour ton aide et ton écoute tout au long de cette thèse. Damien, j'ai adoré partagé le labo avec toi ! Que de rires avec la radio allumée à fond, tes qualités de chants et de dance ! Nicolas et Guillaume, deux très belles rencontres : l'un au début de ma thèse et l'autre à mi-parcours. Voisins de paillasse ou pas, j'ai adoré discuter avec vous de sujets divers et variés. Fabienne (et les macrocycles), Marc (et les nanoparticules) merci pour votre présence. Sylvie, Louiza et Manuella, le trio comique inséparable : vous m'avez fait bien rire ! Merci pour votre humour, votre soutien et nos discussions. Pour les nouveaux de l'équipe, venant, cette fois-ci, des « quatre » coins de la planète : Maxi (Chine), Elizabeth (Cuba), Gauthier (Belgique) et Aida (cocoricco !, France), je vous souhaite de découvrir et apprécier l'univers de la chimie organique et thérapeutique.

Je n'oublie pas tous les stagiaires que j'ai rencontré au sein de ces deux équipes : tous aussi sympathiques les uns que les autres.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements aux personnes qui ont été présentes depuis le début de mon parcours jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. Tout d'abord, le Professeure Marie-Claude Viaud Massuard, qui m'a accompagnée lors de mes premiers pas dans un labo de recherche en chimie organique. Marie-Claude, vous m'avez tout appris et vous m'avez transmis non seulement votre passion mais aussi votre bonne humeur quotidienne ! Alors un grand merci ! Cécile, merci d'avoir répondu toujours présente : ta gentillesse et tes conseils sont irremplaçables !

Vient ensuite le Docteur Robert H. Dodd. Une très belle rencontre également. Robert, mon « papa de la chimie », vous avez éveillé en moi la curiosité et la motivation de poursuivre dans cette voie. Vous m'avez poussée et toujours soutenue. Et surtout, vous avez toujours cru en moi. Alors, Robert, un grand merci pour votre accompagnement, vos mots et pour cette formidable rencontre. A toi Kevin, merci pour tout ce que tu as fais pour moi, ta sympathie et tes encouragements.

Au Docteur Pascal Breuilles, « mon ange gardien », celui qui m'a suivi de près ou de loin tout au long de mon cursus. Une rencontre inattendue mais qui perdure !

Aux Docteurs Emmanuelle Schultz et Sophie Bezenine, merci pour votre bonne humeur, vos conseils et de m'avoir fait découvrir (entre autres) l'univers de l'organocatalyse!

Merci à tous mes ami(e)s qui m'ont accompagnée tout au long de cette aventure et en particulier merci à toi Xavier pour tes encouragements et ta présence.

Enfin merci à toute ma famille qui a été une véritable source de soutien quotidien : Maman et Papa qui m'ont appris à me battre jusqu'au bout pour réussir et m'ont poussé sans relâche à poursuivre dans cette voie ; c'est à eux également que je leur dois mon énergie débordante et mon côté un peu « folle ». A mes deux aînés, Céline et Hervé, merci pour leurs conseils (ou nos disputes ?) et enfin Johanna, rencontrée dans le ventre de Maman, (on ne se quitte plus depuis !) tu es tout pour moi, et la seule à vraiment me comprendre. C'est grâce à vous tous que j'en suis arrivée là aujourd'hui et je vous dédie l'intégralité de ce manuscrit.

Résumé

L'inflammation est un phénomène affectant des millions de personnes à travers le monde. Il existe une grande variété de médiateurs inflammatoires impliqués dans différentes fonctions biologiques, dont la cyclooxygénase-2. Bien que de nombreux inhibiteurs sélectifs de COX-2 aient été développés et commercialisés, ceux-ci présentent des effets secondaires dont la gravité a entraîné, dans certains cas, l'arrêt de leur commercialisation.

De nos jours, les méthodes *in silico* sont de plus en plus employées dans les stratégies de découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Au cours de ce projet, nous nous sommes appuyés sur les modèles pharmacophoriques et les méthodes de docking afin de guider et de prioriser la synthèse de molécules de structures diverses et originales, susceptibles de présenter les meilleures affinités pour la cible étudiée. Ainsi, des prédictions réalisées avec le logiciel TOMOCOMD-CARDD combinées à des tests biologiques, ont permis d'identifier le cyclocoumarol comme une molécule potentiellement anti-inflammatoire.

Dans le cadre de ces travaux nous nous sommes intéressés à la synthèse et l'étude d'analogues du cyclocoumarol en tant qu'inhibiteurs sélectifs de COX-2. La pharmacomodulation autour du cyclocoumarol et la mise en place de stratégies de synthèse judicieuses ont permis d'obtenir une série d'analogues. Divers outils bioinformatiques ont été utilisés : le logiciel LigandScout a permis de construire des pharmacophores sélectifs de COX-2 et les études de docking ont permis de comprendre les modes de liaisons des différents composés. Enfin, le logiciel SeeSAR, a permis de prédire l'affinité des molécules les plus susceptibles d'inhiber sélectivement COX-2. Les tests biologiques ont confirmé leur activité inhibitrice envers COX-2 avec une inhibition non significative vis-à-vis de COX-1. Parmi les molécules synthétisées, le 4-OMe cyclocoumarol a démontré une activité et une sélectivité très intéressantes, comparables au NS-398, un inhibiteur sélectif connu de la COX-2.

A partir des résultats biologiques obtenus, un travail de pharmacomodulation autour de ces dérivés du cyclocoumarol a été réalisé en utilisant des outils *in silico* dans le but de prédire l'affinité de nouveaux composés et de découvrir de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la COX-2.

Mots clés : cyclocoumarol, benzalacétones, warfarines, pharmacophores, docking, criblage virtuel, COX-2, repositionnement

Summary

Inflammation is a phenomenon affecting millions of people throughout the world. There is a broad range of inflammatory mediators implied in different biological functions including the cyclooxygenase-2. Although many selective inhibitors selective of COX-2 have been developed and marketed, they have displayed diverse side effects leading, in some cases, to their withdrawal from the market.

Nowadays, *in silico* methods are more and more used in the drug discovery process. In this project, we have used pharmacophoric models and docking methods to guide and prioritize the synthesis of molecules, presenting different and original structures, with enhanced affinity for the biological target. Thus, predictions realized with the TOMOCOMD-CARDD software together with biological tests enable to identify the cyclocoumarol as a potential anti-inflammatory molecule.

As part of these works, the synthesis of and the study of cyclocoumarol analogues as selective inhibitors of COX-2 have been realized. Pharmacomodulation of cyclocoumarol and development of synthesis strategies led to a serie of cyclocoumarol analogues. Several bioinformatics tools have been used: selective COX-2 pharmacophores were elucidated using LigandScout and docking studies (Surflex) were conducted to understand the binding mode of different compounds. Finally, SeeSAR enabled to predict the affinity of the molecules the most susceptible to inhibit selectively COX-2. Biological tests confirmed their inhibitory activity against COX-2 and showed no significant inhibition for COX-1. Among the synthesized molecules, the 4-OMe cyclocoumarol has demonstrated an activity and a selectivity very interesting, similar to NS-398, a known selective COX-2 inhibitor.

Based on the biological results obtained, a pharmacomodulation study of cyclocoumarol derivatives has been realized using *in silico* tools in order to predict the affinity of new compounds and to discover new selective inhibitors of COX-2.

Keywords : cyclocoumarol, benzalacetones, warfarines, pharmacophores, docking, virtual screening, COX-2, repositioning

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	6
Summary	7
Sommaire	8
Liste des tableaux	11
Liste des schémas	13
Liste des figures	16
Liste des équations	21
Liste des abréviations	22
Première partie : Introduction	25
I.1 Cycle de vie d'un médicament	26
I.2 Stratégies de découverte d'un médicament	28
Deuxième Partie : COX-2 et inflammation	33
II.1 Les prostaglandines (PGs) et les thromboxanes (TXs)	34
II.1.1 Présentation des prostaglandines (PGs) et thromboxanes (TXs)	34
II.1.1.1 Découvertes et nomenclature des PGs et TXs	34
II.1.1.2 Biosynthèse des PGs	35
II.1.1.3 Fonctions des PGs	36
II.1.1.4 Acide arachidonique et cyclooxygénase	37
II.1.2 Descriptions des isoformes de COX	42
II.1.2.1 Découvertes de COX-1 et COX-2.....	42
II.1.2.2 Expression des gènes.....	42
II.1.2.3 La structure de COX-1 et COX-2.....	43
II.1.2.4 Peut-on parler de COX-1 inflammatoire et COX-2 constitutive ?.....	48
II.1.3 Sélectivité et évaluation d'inhibiteurs de COX-2	49
II.1.4 Mécanisme d'inhibition des molécules sélectives de COX-2.....	50
II.2 Les inhibiteurs de COX-2-état de l'art	56
Troisième partie : Les méthodes de criblages <i>in silico</i>	115
III.1 Généralités	116
III.2 Les modèles pharmacophoriques	116
III.2.1 Modèles pharmacophoriques « ligand-based »	118
III.2.1.1 Approches pharmacophoriques 2D	118

III.2.1.2	Approches pharmacophoriques 3D	122
III.2.1.3	Applications des méthodes de pharmacophores.....	137
III.2.1.4	Limites des méthodes de pharmacophores.....	140
III.2.1.5	Exemple : LigandScout, un logiciel permettant de générer des modèles pharmacophoriques.	144
III.3	Docking.....	151
III.3.1	Docking ligand rigide.....	152
III.3.2	Docking ligand flexible.....	153
III.3.2.1	Les algorithmes de recherche.....	153
III.3.3	Docking « semi-flexible »	160
III.3.4	Scoring	162
III.3.4.1	Fonctions de score.....	162
III.3.4.2	Autres paramètres importants à prendre en compte pour réaliser un docking	165
Quatrième partie : Développement de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase-2 – Résultats et discussion		
		169
IV.1	Introduction	170
IV.2	Choix du cyclocoumarol	170
IV.2.1	Antécédents de l'étude	170
IV.2.2	Pharmacomodulation du cyclocoumarol.....	175
IV.3	Résultats et discussion.....	177
IV.3.1	Synthèse	177
IV.3.1.1	Synthèse de benzalacétones.....	177
IV.3.1.2	Synthèse de la warfarine et de ses dérivés	194
IV.3.1.3	Synthèse des dérivés du cyclocoumarol.....	206
IV.3.2	Résultats des tests biologiques	222
IV.3.3	Utilisation de la modélisation moléculaire pour guider la recherche d'inhibiteurs sélectifs de COX-2.....	227
IV.3.3.1	Détermination des modes de liaison des inhibiteurs connus de la COX-2	227
IV.3.3.2	Génération des pharmacophores sélectifs de COX-2.....	232
IV.3.3.3	Etudes de docking	244

IV.3.3.4	Prédiction de nouveaux analogues au cyclocoumarol, potentiellement inhibiteurs de COX-2 (SeeSAR)	253
Cinquième partie : Conclusion.....		275
Sixième partie : Partie expérimentale		279
VI.1	Chimie	280
VI.2	Biologie	309
VI.3	Bioinformatique.....	310
VI.3.1	Databases used to obtain COX-2 inhibitors and structures.....	310
VI.3.1.1	PDB	310
VI.3.1.2	ChEMBL	310
VI.3.1.3	DUD_E.....	310
VI.3.1.4	Preparation of the different data sets used for pharmacophore generation	
	311	
VI.3.2	Pharmacophore generation.....	314
VI.3.3	Seesar	316
Bibliographie.....		318
Annexes		335
Liste des publications		396
Liste des communications orales.....		397
Posters		397
Résumé		398
Summary		398

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales fonctions des prostaglandines et thromboxanes (adapté selon [16])..	36
Tableau 2 : Différences dans l'expression et la régulation de COX-1 et COX-2 (adapté selon [45]).....	43
Tableau 3 : Différents programmes de génération de pharmacophores.....	126
Tableau 4 : Différents programmes de génération de pharmacophores.....	127
Tableau 5 : Exemples de logiciels et leurs méthodes permettant de générer des pharmacophores	130
Tableau 6 : Quelques exemples illustrant l'application des pharmacophores en drug discovery ([145]).....	143
Tableau 7 : Définition et représentation des points pharmacophoriques décrits par le logiciel LigandScout	145
Tableau 8 : Quelques exemples de nouveaux inhibiteurs potentiels découverts par l'utilisation de LigandScout [163]	151
Tableau 9 : Résultats de la réaction de Claisen-Schmidt dans la synthèse de benzalacétone fonctionnalisées sous chauffage conventionnel et sous activation micro-ondes [254]..	188
Tableau 10 : Extension de la réaction de Claisen-Schmidt sous micro-ondes à d'autres benzaldéhydes [254].....	188
Tableau 11 : Conditions opératoires utilisées pour la synthèse « one-pot » du cyclocoumarol (17) en présence d'1 équiv. de benzalacétone (19).(- : non observé, Rdt : rendement déterminé par RMN ¹ H, prés = présence)	210
Tableau 12 : Conditions opératoires utilisées pour la synthèse « one-pot » du cyclocoumarol par irradiation sous micro-ondes (7) en présence d'1 équiv. de benzalacétone (19).(- : non observé, Rdt : rendement déterminé par RMN ¹ H, prés = présence)	214
Tableau 13 : Inhibition de la production de PGE ₂ stimulée par le LPS par l'action d'agents pharmacologiques dans les cellules Raw 264.7	223
Tableau 14 : Inhibition de la production de PGE ₂ stimulée par le LPS par l'action d'agents pharmacologiques dans les cellules Raw 264.7 à des doses différentes	226
Tableau 15 : Les 10 modes de liaison des structures de COX-2 décrites dans la PDB. (rose : interactions hydrophobes, bleu : liaisons hydrogène)	232
Tableau 16 : Pharmacophores sélectifs de COX-2 décrits dans la littérature (étude exhaustive en utilisant les mots clés : « selectives pharmacophores COX-2 », recherche Scifinder, 17/09/2016)	235

Tableau 17 : Résultats du screening entre les pharmacophores des inhibiteurs de la COX-2 de la PDB qui partagent un pharmacophore commun avec les molécules sélectives de la DUD_E.....	237
Tableau 18 : Description des pharmacophores générés pour chaque cluster	241
Tableau 19 : Etude des différentes liaisons hydrogène pour l'ensemble des 20 poses dockées de chaque analogue synthétisé (Pymol)	252
Tableau 20 : Etude de l'affinité prédite (SeeSAR) des 20 poses générées par Surflex pour chaque composé synthétisé	255
Tableau 21 : Etude de l'affinité prédite (SeeSAR) de la meilleure pose dockée pour chaque composé synthétisé.....	257
Tableau 22 : Etude de l'affinité prédite des composés synthétisés dessinés sur SeeSAR	260
Tableau 23 : 38 pharmacophores « structure-based » issues des structures de COX-2 disponibles dans la PDB.....	340
Tableau 24 : Représentation des 85 molécules de la DUD_E hautement sélectives (ratio IC ₅₀ > 1000).....	354
Tableau 25 : Molécules partageant le pharmacophore commun avec les dérivés du cyclocoumarol (A = Actives, D = Decoys).....	359
Tableau 26 : Série ligands_a	367
Tableau 27 : Série des ligands b.....	376
Tableau 28 : Série des ligands c	384
Tableau 29 : Série des ligands_d.....	388
Tableau 30 : Série des ligands_f	392
Tableau 31: Série des ligands_4-OMebis.....	394

Liste des schémas

Schéma 1 : Le cycle de vie d'un médicament [1] (S.S : Sécurité Sociale, T2A : Tarification à l'activité, CEPS : Comité Economique des Produits de Santé)	27
Schéma 2 : Les différentes voies de transformations de l'acide arachidonique.....	36
Schéma 3 : Transformations de l'acide arachidonique dans la cyclooxygénase et la peroxydase [34]	37
Schéma 4 : Formation des PGs à partir de l'AA. L' AA est oxydé par la réaction de cyclooxgénation qui se déroule dans la COX, il est ensuite converti en PGG ₂ puis réduit en PGH ₂ . La PGH ₂ est hautement instable et est rapidement transformée par des synthèses spécifiques en PGE ₂ , PGF ₂ , PGD ₂ , PGI ₂ et TXA ₂ [16].....	39
Schéma 5 : Cycles catalytiques de la peroxydase et de la cyclooxygénase. Focus sur le mécanisme d'activation de COX par l'AA [22] (adapté selon Griswold et collaborateurs [19] Simmons et collaborateurs [22] Blobaum et collaborateurs [35] Chandrasekharan et collaborateurs [34])	41
Schéma 6 : Formation de liaison covalente entre l'enzyme et son inhibiteur. (E : enzyme, I : partie inhibitrice de la molécule, X : sous-produit issu de la réaction n'ayant pas la capacité de réagir avec les autres molécules de l'enzyme) [74].....	54
Schéma 7 : Altérations allostériques entre l'enzyme (E) et son inhibiteur (I) [74]	54
Schéma 8 : Algorithme général utilisé pour avec le logiciel TOMOCOMD-CARDD pour dessiner les « training sets » et les « test sets » via l'analyse de clusters (k-MAC) (adapté selon [196])	172
Schéma 9 : Quelques exemples de synthèses de dérivés pyranocoumarins [209, 225]	174
Schéma 10 : Optimisation structurale du cyclocoumarol.....	175
Schéma 11 : Première stratégie de synthèse envisagée.....	176
Schéma 12 : Deuxième stratégie de synthèse envisagée.....	176
Schéma 13 : Synthèse des dérivés du cyclocoumarol	177
Schéma 14 : Réaction de Heck utilisant du palladium supporté sur une glace en verre [242]	179
Schéma 15 : Synthèse de benzalacétones utilisant des zéolites en tant qu'acides de Lewis [243]	180
Schéma 16 : Réaction d'aldolisation utilisant la proline comme organocatalyseur, supportée par de l'oxyde de graphène, 12 h à 40°C [244].....	181
Schéma 17 : Mécanisme de la réaction de Claisen-Schmidt en milieu basique [246]	182

Schéma 18 : Réaction de formation de benzalacétones (44) et de dibenzalacétones (45).....	183
Schéma 19 : Mécanismes de formation des sous-produits 45 et 46	185
Schéma 20 : Synthèses proposées pour préparer la warfarine. Conditions A : Groupes d'Ikawa et de Manolov [235, 260, 261]. Conditions B : Groupe de Barker [262]	195
Schéma 21 : Voies de synthèses pour l'obtention de la warfarine proposées par le groupe de Demir [263].....	196
Schéma 22 : Méthode de synthèse énantiosélective de la warfarine et de ses dérivés selon Dong et collaborateurs [258].....	196
Schéma 23 : Méthode de synthèse de la warfarine utilisant des diamines chirales proposée par Kim et collaborateurs [264].....	197
Schéma 24 : Méthode de synthèse de la warfarine utilisant des imidazolines chirales (57) proposée par Halland et collaborateurs [265]	197
Schéma 25 : Voie de synthèse de la warfarine proposée par Kischel et collaborateurs [266]	198
Schéma 26 : Réaction tandem de Knoevenagel-hétéro-Diels-Alder proposé par Cravotto et collaborateurs [267] pour obtenir la warfarine et ses dérivés	199
Schéma 27 : Synthèses de la warfarine en conditions acides.....	200
Schéma 28 : Synthèses de la warfarine en conditions basiques.....	201
Schéma 29 : Synthèses de la warfarine à partir de 4-énaminecoumarines.....	201
Schéma 30 : Synthèses de la warfarine en conditions neutres	202
Schéma 31 : Tentatives de synthèse de warfarine réalisées sous activation micro-ondes	202
Schéma 32 : Voie de synthèse de la warfarine (8a) dans l'eau à partir de la 4-hydroxycoumarine (9a) et de benzalacétone (19a)	204
Schéma 33: Mécanisme proposé pour l'addition 1,4 de Michael en présence de 5% mole de DIPEA	204
Schéma 34 : Synthèse des dérivés de la warfarine (8b-g) utilisant la 4-hydroxycoumarine (9a) et les benzalacétones correspondantes (19b-g)	205
Schéma 35 : Synthèse « one-pot » permettant d'obtenir le cyclocoumarol en passant par la réaction hétéro-Diels-Alder.....	207
Schéma 36 : Synthèse de pyranocoumarines par chauffage au reflux ou irradiation sous MW	208
Schéma 37 : Les 2 principales voies de synthèses permettant d'accéder au cyclocoumarol .	209
Schéma 38 : Mécanisme de l'addition 1,4 de Michael permettant de former le cyclocoumarol « one-pot ».....	211

<i>Schéma 39 : Mécanisme proposé pour la formation de la 4-OMe coumarine</i>	211
Schéma 40 : Synthèse des dérivés du cyclocoumarol (7 a-g) à partir des warfarines correspondantes (8 a-g , 1 équiv., 100mg)	215
Schéma 41 : Les différentes formes tautomériques de la warfarine (forme ouverte et 2 diastéréoisomères cycliques)	216
Schéma 42 : Spectre RMN ¹ H du diastéréoisomère majoritaire du cyclocoumarol	220
Schéma 43 : Spectre RMN ¹ H du diastéréoisomère minoritaire du cyclocoumarol	221
Schéma 44 : Les différentes étapes réalisées lors des études de modélisation moléculaire... ..	227
Schéma 45 : Résumé des résultats obtenus par la méthode « structure-based »	237
Schéma 46 : Résumé des résultats obtenus par la méthode « ligand-based »	244
Schéma 47 : Résumé de la démarche permettant de sélectionner la structure de COX-2 qui sera utilisée pour réaliser les études de docking	247
Schéma 48 : Résumé de l'évaluation de SeeSAR à prédire les résultats obtenus biologiquement (deux approches : poses dockées ou redessiner manuellement)	261
Schéma 49 : Résumé de la prédiction des 303 molécules proposées	273

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes méthodes de repositionnement d'un médicament [8]	30
Figure 2 : Structure chimique de l'acide arachidonique et de $\text{PGF}_{2\alpha}$ [23]	34
Figure 3 : Structures chimiques des PGs : PGE_2 , PGD_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ et TXA_2 [16]	35
Figure 4 : Acide arachidonique lié au site actif de oCOX-1 (ovine COX-1). Le carboxylate réalise des interactions ioniques avec l'Arg 120 et des liaisons hydrogène avec la Tyr 355. Il adopte une forme en L dans le tunnel hydrophobique. L'hème est désigné en rouge. Les résidus en contact avec l'acide arachidonique sont représentés en jaune [35]39	
Figure 5 : a) Représentation de COX-1 avec le flurbiprofène (jaune), précisant les positions des sites POX , contenant l'hème (rouge), et COX et le domaine catalytique (bleu), le MBD (orange) et le domaine EGF-like (vert) [52]	44
Figure 6 : Les résidus essentiels constituant les sites actifs de COX-1 et COX-2. Les substitutions Arg 513, Val 523, Leu 503 et Val 434 (non représentée) dans COX-2 permettent un gain de 25% du volume dans le site actif de COX-2 [53].....	45
Figure 7 : Differences des sites de liaisons des COX : Val434, Arg513, et Val523 forment la poche supplémentaire de COX-2 qui est absent dans COX-1. A : Un inhibiteur non sélectif accède au site actif des deux isoformes. B : Seuls les inhibiteurs sélectifs réussissent à pénétrer dans le site actif de COX-2, dans COX-1, les résidus volumineux (Ile434, His513 et Ile 532) empêchent l'accès au site actif [55].....	47
Figure 8 : Structures chimiques de l'acétaminophène, de l'acide méfénamique et du BW755C	51
Figure 9 : Structures chimiques de l'ibuprofène, du piroxicam et de l'acide méfénamique....	51
Figure 10 : Structures chimiques de l'indométhacine et du flurbiprofène.....	52
Figure 11: Structures chimiques du célécoxib et du rofécoxib	52
Figure 12 : Un exemple de pharmacophore généré avec le logiciel LigandScout 4.0, représentant le ligand S58 (1CX2), un inhibiteur sélectif de COX-2 (flèches rouges : groupements accepteurs de liaisons hydrogène, sphères jaunes : groupements hydrophobes).....	117
Figure 13 : Exemple illustrant les descripteurs CATS 2D [88]	118
Figure 14 : Représentation de « Similog keys » : le tert-butyle considéré comme encombrant est codé 0010, l'hydroxyle de l'alcool pouvant être un accepteur de liaisons hydrogène (0100) et/ou donneur de liaisons hydrogène (1000), est codé 1100 et l'aldéhyde étant un accepteur de liaisons d'hydrogène est codé 0100 [92].....	119

Figure 15 : Exemple de quelques MACCS keys utilisés pour décrire l’empreinte partielle du diazepam : le numéro 19 indique un cycle à 7 chaînons (seven-member ring), 78 précise le groupe C=N, 92 décrit le groupe OC(N)C et 163 représente un cycle à 6 chaînons (six-member ring) [94]	120
Figure 16 : Exemple de graphes réduits, adapté selon [89, 95, 96]	120
Figure 17 : Exemple d’une structure convertie selon la méthode ErG. (D : donneur de liaison hydrogène, Ac : accepteur de liaison hydrogène, Hf : groupement hydrophobe situé à l’extrémité de la structure, Ar : cycle aromatique, +: charge positive). Adapté selon [97]	121
Figure 18 : Exemple d’un « feature tree ». Les nœuds, de couleurs différentes, représentent les groupes chimiques capables d’établir des interactions. (vert : hydrophobes, rouge : accepteurs de liaisons hydrogène, bleu : donneurs de liaisons hydrogène, jaune : pas d’interaction directe) [99].....	122
Figure 19 : Les principaux points pharmacophoriques et leurs définitions.(selon [121]).....	125
Figure 20 : Protocole de FLAP : (a) MIF calculés par GRID. (b) Génération de points pharmacophoriques par FLAP. (c) Recherche de toutes les combinaisons possibles de 4 points pharmacophoriques. (d) Recherche des ligands répondant aux modèles pharmacophoriques et évaluation de leur similarité. (e) Prise en compte de la forme du ligand et de la forme récepteur dans la sélection du modèle pharmacophorique (jaune) et élimination de ceux qui entraînent des clashes stériques entre le ligand et le site actif (modèle pharmacophorique rose) (Adapté selon [132, 133])	133
Figure 21 : Optimisation d’un pharmacophore par l’ajout de restriction de forme (en gris) et de volume d’exclusion (sphère grises quadrillées) pour identifier des inhibiteurs de l’ACE (angiotensin conversion enzyme). ZBG : zing binding group, HBA : hydrogen bond receptor, H : hydrophobes. Logiciel Catalyst 4.9 [136]	134
Figure 22 : Exemple d’une empreinte générée par SIFT (premier cadre: ligand de référence (en vert) avec sa protéine co-cristallisée et interagissant avec un résidu particulier (orange), les deux autres cadres : ligand candidat (bleu) avec deux conformations différentes : l’une match avec la référence et l’autre non grâce à la comparaison avec leurs empreintes respectifs.(selon[138])	135
Figure 23 : Principe du « parallel screening » : pour plusieurs protéines cibles, les modèles pharmacophoriques sont établis et les composés concernés sont screenés. Si le composé	

match avec un des modèles pharmacophoriques il est prédit comme étant actif avec la ou les protéines en question, sinon il est considéré comme inactif [120]	139
Figure 24 : (a) Nombre de publications concernant les pharmacophores (source PubMed (juin 2016) en écrivant comme mot clé « pharmacophores »). (b) Nombre de publications concernant les pharmacophores et leur application en drug discovery (source PubMed (juin 2016) en écrivant comme mots clés « pharmacophores and drug discovery ») ..	142
Figure 25 : Modèles pharmacophoriques (A) Structure- et (B) ligand-based générés par LigandScout [162].....	144
Figure 26 : (a) Surface accessible du ligand (b) Surface colorée : HBD (vert), HBA (rouge) (c) Surface colorée : PI (bleue), NI (rouge) (d) Modèle pharmacophorique [163].	147
Figure 27 : Schéma illustrant le principe de « lock and key » d'Emile Fisher (adapté selon [120]).	152
Figure 28 : Principe du docking rigide illustré par le logiciel DOCK: Le site de liaison de la protéine est distingué par l'utilisation des sphères de tailles différentes. Les correspondances entre les atomes du ligand et ces sphères sont recherchées et permettent de révéler une ou des orientations du ligand dans le site actif [172, 175].	153
Figure 29 : Illustration de la méthode de recherche exhaustive employée par EUDOC [173]	154
Figure 30 : Protomol généré par Surfex pour la cyclooxygénase 2 (1cx2).....	155
Figure 31 : Schéma illustrant la méthode de reconstruction incrémentale [173].....	156
Figure 32 : Schéma illustrant la méthode de Monte-Carlo (adapté selon [173]).....	157
Figure 33 : Schéma illustrant la méthode utilisant les algorithmes génétiques [173].....	158
Figure 34 : Schéma illustrant la méthode de recherche tabou. [173].....	159
Figure 35 : Processus de correspondance entre les atomes et la densité électronique pour produire un modèle cristallographique. [192]	166
Figure 36 : Structure chimique et numérotation IUPAC de la coumarine (α -benzopyrone) et les quatre sous-familles de la coumarine [219].....	173
Figure 37 : Structure de la warfarine (8a) et de l'acénocoumarol (24).....	178
Figure 38 : Structure rayons X du diastéréoisomère minoritaire ($H_{14\acute{e}q}$) du cyclocoumarol..	217
Figure 39 : Influence des oxygènes de la fonction acétal sur l'arrangement spatial du dia 2 (adapté selon Clayden et collaborateurs [275]).....	217
Figure 40 : Structure de rayons X du diastéréoisomère majoritaire (H_{14ax}) du cyclocoumarol	218

Figure 41 : Résultats obtenus lors de l'évaluation de l'inhibition sur COX-2 des analogues du cyclocoumarol synthétisés.....	224
Figure 42 : Résultats obtenus lors de l'évaluation de la sélectivité de COX-2 vis-à-vis de COX-1	225
Figure 43 : Résultats obtenus pendant l'étude dose-effet.....	226
Figure 44 : Pharmacophore sélectif de COX-2 généré par Catalyst : en bleu, les groupements hydrophobes (H), en vert, les HBA (A) et en rouge le cycle aromatique (R) [277]	233
Figure 45 : Pharmacophore des dérivés du cyclocoumarol.....	243
Figure 46 : Structure chimique des ligands D72 (3NTG), 416 (3MQE), 52B (3LN0), NPX (3Q7D), NPS (3NT1) portant deux cycles à 6 chaînons fusionnés, S58 (1CX2), décrits dans la PDB et le cyclocoumarol	245
Figure 47 : (a) : Site actif de la structure 1CX2 avec son ligand S58 (vert), (b) site actif de la structure 3ln0 avec son ligand 52B (vert)	246
Figure 48 : Représentation des interactions les plus importantes de la première des 20 poses du cyclocoumarol (A) et du 4-OMe cyclocoumarol (B) dans le site actif de COX-2 (structure 3LN0).....	248
Figure 49 : Représentation des interactions les plus importantes de la première des 20 poses du 4-CF ₃ cyclocoumarol (C) et du 4-NO ₂ cyclocoumarol (D) dans le site actif de COX-2 (structure 3LN0).....	249
Figure 50 : Représentation des interactions les plus importantes de la première des 20 poses du 4-Me cyclocoumarol (E) et du 4-tBu cyclocoumarol (F) dans le site actif de COX-2 (structure 3LN0).....	250
Figure 51 : Représentation des interactions les plus importantes de la première des 20 poses du 4-F cyclocoumarol (G) dans le site actif de COX-2 (structure 3LN0).....	251
Figure 52 : (a) Représentation de la poche sélective adapté selon [53] (b) occupation partielle du ligand 53a, pose 6 (bleu) et en violet 3 acides aminés majeurs (Arg 513, Val 523 et Tyr 355) situés dans la poche spécifique de COX-2.....	262
Figure 53 : Structures chimiques des 18 ligands dont les poses dockées présentent une superposition correcte avec la pose redessinée	263
Figure 54 : Rappel des molécules obtenues selon la pharmacomodulation 1 (série a).....	264
Figure 55 : Structure chimique des molécules de la série a présentant une affinité prédite de l'ordre du nM- μ M. (Tableau 26 annexes ligands_a).....	265

Figure 56 : Structure chimique des molécules de la série d présentant une affinité prédite de l'ordre du nM- μ M. (Tableau 29 annexes ligands_d)	265
Figure 57 : Rappel des molécules envisagées de la pharmacomodulation 2 (série b et c).....	266
Figure 58 : Structure chimique des molécules de la série b et c présentant une affinité prédite de l'ordre du nM- μ M. (Tableaux 27 et 28 annexes ligands_b et ligands_c)	268
Figure 59 : Pharmacomodulation du cyclocoumarol au niveau de l'acétal et de part et d'autre des 2 phényles (série f).....	269
Figure 60 : Molécules de la série f présentant des affinités de nM- μ M (et pM pour le ligand 12f). (Tableau 30 annexes ligands_f).....	270
Figure 61 : Molécules de la série ligands_4-OMebis présentant des affinités de nM- μ M (Tableau 31 annexe de la série ligands_4-OMebis)	272
Figure 62 : Quelques exemples de molécules intéressantes pouvant être synthétisées.....	273

Liste des équations

Equation 1 : Probabilité P d'acceptation d'une nouvelle conformation (avec E_{new} : énergie de la nouvelle conformation, E_{old} : énergie de l'ancienne conformation, k : constante de Boltzmann, T : température de simulation) [170]	157
Equation 2 : Equation du mouvement de Newton pour un système atomique (F : force, m : masse, a : accélération).....	159
Equation 3 : Calcul de la force (F) de chaque atome (E : énergie potentiel, r : distance entre les deux positions).....	159
Equation 4 : Calcul des positions atomiques à chaque intervalle de temps (d^2r_i/dt^2), avec F : force et m : masse atomique).....	160
Equation 5 : Calcul de l'énergie potentielle d'un système (E_{MM}) par les champs de force de mécanique moléculaire. Avec K_r , K_θ et K_ϕ : facteurs de pénalité pour les liaisons, les angles et les angles dièdres ; r et r_{ref} : longueurs des liaisons mesurées et de référence ϑ et ϑ_{ref} : valeurs des angles mesurées et de référence ; ϕ et ϕ_{ref} : valeurs des angles dièdres mesurées et de référence ; A_{ij} et B_{ij} : constantes attractives et répulsives mesurées expérimentalement ; R_{ij} : distance entre les atomes i et j ; q_i et q_j : charges des atomes i et j ; ϵ :constante diélectrique [176].....	163
Equation 6 : Calcul de l'énergie libre de liaison (ΔG_{bind}) prenant en compte uniquement la contribution enthalpique évaluée par les potentiels de Lennard-Jones et de Coulomb..	163
Equation 7 : Forme simplifiée d'une fonction de score empirique. (Avec $\Delta G_{\text{binding}}$: l'affinité de liaison, f_i correspond à un terme d'une interaction i entre le ligand et la protéine et ΔG_i le coefficient associé) [170].....	164

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

AD : Maladie d'Alzheimer

ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination ,Toxicité

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMBER : Assisted model building with energy refinement.

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

APHS : sulfure de 2- (acétoxyphényl) hept-2-ynyl

APTS : acide *para* toluènesulfonique

AR : cycle aromatique

Arg : Arginine

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique Messenger

ASMR : Amélioration du Service Médical Rendu

CATS 2D : Chemically Advanced Template Search

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CINODS : Inhibiteurs de Cyclooxygénase Donneurs de monoxyde d'azote

CMGPE : Chimie Moléculaire, Génie des Procédés chimiques et Energétiques

CNAM : Conservatoire National des Arts et Métiers

COX-1 : Cyclooxygénase-1

COX-2 : Cyclooxygénase-2

CV : Cardiovasculaire

DIPEA : diisopropyléthylamine

DISCO : DIStance COmparison

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

EGF : Facteur de croissance épidermique

ErG : Extended Reduced Graphs

FLAP : Fingerprints for Ligands and Proteins

GASP : Genetic Algorithm Superposition Program

GBA : Génomique, Bioinformatique et Applications

GC : Chromatographie gazeuse
GI : Gastrointestinal
Glu : acide Glutamique
HBA : Accepteur de liaison hydrogène
HBD : Donneur de liaison hydrogène
His : Histidine
HETE : acide hydroxyeicosatétraenoïque
HPETE : acide hydroxyperoxyeicosatétraenoïque
HypoGen : Hypothesis Generator
ICM : Internal Coordinate Mechanic
IL-1 : Interleukine 1
IL-6 : Interleukine 6
Ile : Isoleucine
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
kb : kilobase
LDA : diisopropyléthylamine de lithium
LPS : lipopolysaccharide
LH : Hormone lutéinisante
LT : Leucotriène
logP : coefficient de partition eau / octanol
LOX : Lipooxygénase
MACCS : Molecular Access System
MCS : Sous-structure commune maximale
MP : Maladie de Parkinson
MBD : Domaine de Liaison à la Membrane
MPHIL : Mapping Pharmacophore In Ligands
MW : micro-ondes
NI : zone d'ionization négative
PDB : Protein Data Bank
PI : zone ionizable positive
PLIF : Protein-Ligand Interactions Fingerprint
PGHS : Prostaglandine G/H Synthase
PGs : Prostaglandines

PHASE : PHarmacophore Alignment and Scoring Engine
Phe : Phenylalanine
PLA2 : Phospholipase A2
PLC : Phospholipase C
PLD : Phospholipase D
POX : Peroxydase
RAPID : RAndomized Pharmacophore Identification for Drug design
RG : Reduced Graphs
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD : Root Mean Square Deviation: Ecart quadratique moyen
RSA : Relations Structure-Activité
SCAMPI : Statistical Classification of Activities of Molecules for Pharmacophore Identification
Ser : Sérine
SI : Selectivity Index
SMILES : Simplified Molecular-Input Line-Entry System
TOMOCOMD-CARDD : TOpological MOlecular COMputational Design Computer-Aided-Rational-Drug Design
Tc : coefficient de Tanimoto
THF : tétrahydrofurane
TNF- α : Facteur α de nécrose tumorale
Tyr : Tyrosine
TXs : Thromboxanes
Val : Valine
VS : Criblage virtuel
6-MNA : Acide 6-méthoxy-2-naphthylacétique
3D-QSAR : Relation quantitative structure - activité

Première partie : Introduction

I.1 Cycle de vie d'un médicament

De sa mise au point en recherche jusqu'à sa commercialisation, le cycle de vie d'un médicament est encadré par de nombreuses réglementations marquant ainsi les différentes étapes portant du développement de la molécule active jusqu'à la distribution du médicament sur le marché. Sur 10 000 molécules testées, une seule sera commercialisée [1]. C'est donc un processus extrêmement long et coûteux : il faut compter minimum 15 ans de recherche pour un coût total avoisinant le milliard d'euros [2].

L'étape de recherche et développement du médicament s'étend sur une durée de 8 à 10 ans [3]. Cette phase est caractérisée par trois étapes : la première concerne la recherche de molécules potentiellement candidat-médicaments pour une maladie donnée. Ces molécules sont le résultat des avancées de la recherche fondamentale (ex : nouvelles cibles, molécules analogues, techniques de criblage et d'optimisation). Ainsi sur 10000 molécules testées, 100 candidats médicaments sont sélectionnés [3]. La deuxième phase concerne les tests précliniques. Les molécules sélectionnées sont testées *in vitro* et sur des modèles animaux afin d'évaluer leurs activités biologiques, leurs toxicologies et leurs pharmacocinétiques. La faisabilité technique du médicament est aussi évaluée, c'est-à-dire les différentes méthodes nécessaires pour tester ces molécules sont déterminées et les moyens financiers à mettre en œuvre sont définis. [1, 3]. A la fin de cette étape, seules 10 molécules candidates sont retenues. Enfin, ces molécules rentrent en phase de développement clinique.

Ces essais cliniques, divisés en trois phases, sont strictement encadrés par la loi. La phase I concerne l'évaluation de la tolérance au médicament sur un nombre limité de volontaires sains. La phase II porte sur l'évaluation de l'efficacité du médicament sur les patients et la phase III concerne l'évaluation du rapport efficacité/tolérance sur une population plus large [3]. En général, une seule molécule est retenue à la fin de ce long parcours. En parallèle, la mise au point du procédé de fabrication du médicament est réalisée. L'objectif est de réussir à produire la molécule en grande quantité [4].

Une fois que le médicament a été développé, l'étape de l'autorisation de la mise sur le marché (AMM) du médicament est indispensable. Cette étape dure de 1 à 3 ans. Il est question d'évaluer le dossier d'AMM : la décision est rendue par la Commission de la Transparence et l'autorisation de la mise sur le marché est délivrée par l'Agence Nationale de Sécurité du

Médicament (ANSM). Enfin, le prix du médicament et son taux de remboursement sont fixés par différents organismes [3].

Le médicament commercialisé est surveillé pendant toute sa vie. Ceci concerne la phase de pharmacovigilance (phase IV). Cette phase prend en compte des effets sur les malades et les études post-AMM qui rassurent la population quant à l'utilisation d'un nouveau médicament mis à leur disposition [3].

Aujourd'hui, l'enjeu consiste à amortir les dépenses de recherche de plus en plus importantes sur des médicaments de plus en plus ciblés avec des périodes de protection brevetaires de plus en plus courtes (Schéma 1) [5].

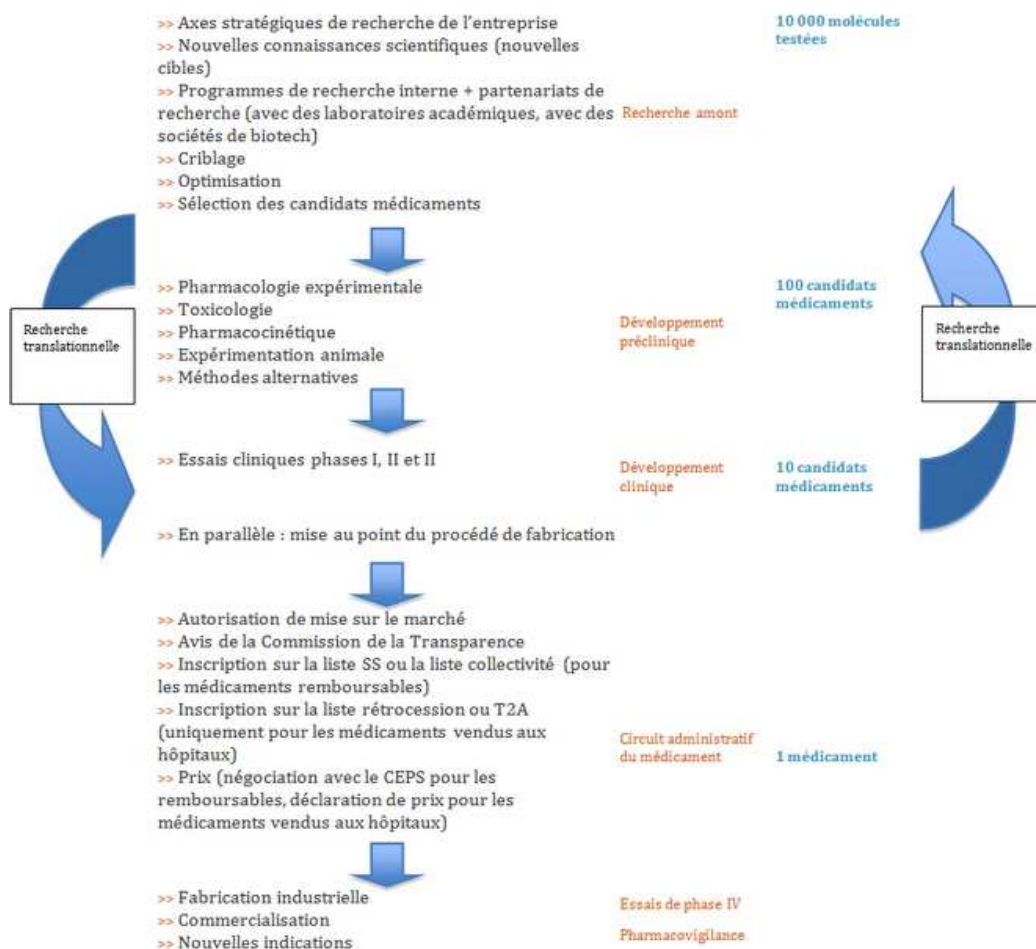


Schéma 1 : Le cycle de vie d'un médicament [1] (S.S : Sécurité Sociale, T2A : Tarification à l'activité, CEPS : Comité Economique des Produits de Santé)

I.2 Stratégies de découverte d'un médicament

Pour trouver une molécule capable d'interagir avec la maladie étudiée, il est nécessaire dans un premier temps, d'identifier une « tête de série » c'est-à-dire un composé possédant l'activité pharmacologique désirée. Une nouvelle « tête de série » peut être découverte par sérendipité, à partir des ressources naturelles, en utilisant les méthodes de criblage *in silico*, ou en s'inspirant de médicaments déjà existants [6].

De nombreuses molécules ont été découvertes par hasard par simple observation, comme c'est le cas du gaz moutarde utilisé pendant la Seconde Guerre Mondiale. Il s'est révélé que son inhalation entraînait une destruction de globules blancs. A partir de cette observation, des molécules analogues au gaz moutarde ont été synthétisées pour cibler la leucémie, un cancer qui se manifeste par une production excessive de globules blancs dans le sang [6]. Hormis la sérendipité, la nature constitue la plus grande source de composés offrant un large spectre d'activités biologiques intéressantes. Les plantes, les micro-organismes, les organismes marins, les animaux (peau, venins) regorgent de molécules aux structures riches et variées, qui n'ont pas encore été suffisamment exploitées, et dont les activités biologiques sont encore à élucider [6]. En 2011, les molécules issues de produits naturels sont impliquées dans le traitement de 87% de maladies touchant l'homme et sont le point de départ de la découverte de nombreux médicaments [7].

Pour aider à concevoir de nouveaux composés à visée thérapeutique plusieurs méthodes *in silico* peuvent être employées. Lorsque la structure d'une protéine est déterminée et un site de liaison identifié, il est intéressant d'étudier les différents types d'interactions pouvant s'établir et ainsi orienter la conception de diverses molécules capables de s'insérer dans le site de liaison [6]. Si à l'inverse, la structure de la protéine n'est pas encore élucidée, il est possible par exemple de créer des modèles pharmacophoriques en superposant les structures des molécules qui sont connues pour se lier à la protéine. Ces modèles peuvent servir de guide dans le développement de nouveaux composés capables de s'insérer dans le site actif de la protéine et d'y modifier son activité biologique.

Une autre stratégie utilise des médicaments déjà connus en thérapeutique afin d'orienter leur usage vers de nouvelles applications. Trois approches illustrent cette stratégie : le repositionnement de médicaments, la synthèse d'analogues et l'optimisation sélective des activités secondaires (SOSA).

Le repositionnement des médicaments est l'une des approches les plus utilisées. En effet, il s'agit d'associer aux médicaments déjà existants, de nouvelles applications thérapeutiques. L'efficacité de cette méthode s'évalue en cinq points majeurs : 1) les formulations et les méthodes de fabrications sont déjà établies, 2) les données du profil ADMET (absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité) du médicament parent sont connues, 3) les essais cliniques ont peu de probabilité d'échouer, et 4) les données de pharmacovigilance du médicament sont connues. [8]. 5) Par cette méthode, le processus de mise au point d'un nouveau médicament est réduit de 12 à 3 ans [8] reflétant ainsi l'efficacité de cette approche. Le repositionnement est ouvert à un large spectre de médicaments : ceux qui ont été retirés du marché, ceux qui ont échoué pendant les essais cliniques et ceux qui sont commercialisés [8].

Les différentes méthodes permettant de repositionner un médicament sont illustrées dans la Figure 1. L'observation fortuite (voie 1), les médicaments existants qui montrent avoir une nouvelle activité biologique (voie 2), ou la découverte d'une nouvelle cible thérapeutique (voie 3) peuvent être le point de départ d'un repositionnement. Si un nouveau rôle pour une cible déjà existante a été établi (voie 4), ou si le médicament peut-être impliqué dans de nouvelles voies de la maladie (voie 5), la méthode de repositionnement peut également être réalisée. Enfin, la présence d'effets secondaires inattendus constitue aussi une occasion de développer de nouveaux médicaments par du repositionnement (voie 6) [8].

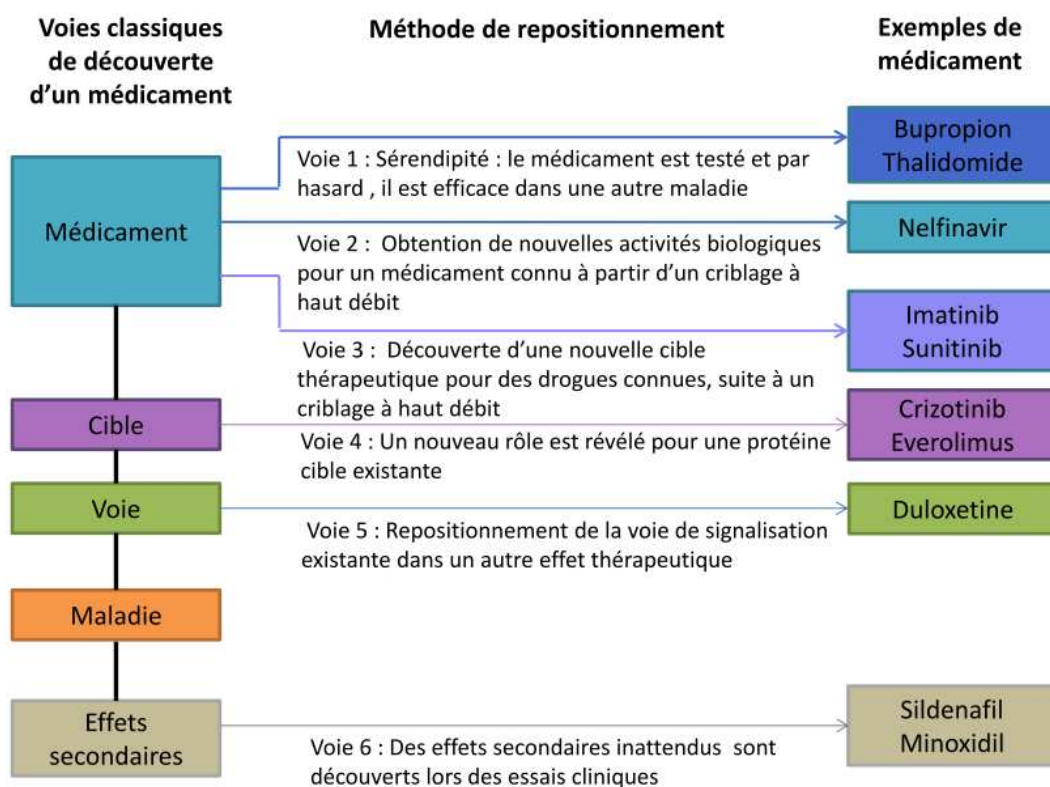


Figure 1 : Les différentes méthodes de repositionnement d'un médicament [8]

La synthèse d'analogues est la deuxième approche décrite pour développer de nouveaux agents thérapeutiques à partir de médicaments connus [9]. Il existe trois méthodes pour le design d'analogues. La première consiste à élaborer des dérivés qui conservent les similarités chimiques et pharmacologiques de la molécule parent. Ces composés sont qualifiés « d'analogues directs ». En général, de simples modifications sont apportées à la structure telle que la substitution d'un groupement bioisostère. Ces « analogues directs » améliorent l'activité thérapeutique du médicament. La deuxième méthode conserve uniquement les similarités chimiques. Ces analogues « structuraux » possèdent une structure chimique comparable à la molécule parent mais peuvent révéler des propriétés pharmacologiques inattendues. La dernière méthode est la plus originale. Elle consiste à élaborer des analogues en modifiant la structure chimique tout en préservant le profil pharmacologique de la molécule parent. Ces analogues « fonctionnels » décrivent alors une affinité similaire à celle du médicament pour une cible donnée tout en offrant des composés avec une grande diversité structurale. En général, cette méthode fait référence au principe du « scaffold hopping » où

l'idée est de découvrir de nouvelles molécules en changeant significativement la structure principale du médicament mais en conservant des activités biologiques similaires. Ce principe repose sur l'hypothèse que des molécules structurellement et chimiquement différentes peuvent interagir avec le même récepteur et donner des activités biologiques comparables [9].

La troisième approche concerne l'optimisation sélective des activités secondaires connue sous le nom de SOSA (Selective Optimization of Side Activities) [10, 11]. L'approche SOSA comprend deux étapes : la première étape consiste à réaliser un screening en utilisant une petite bibliothèque de médicaments (environ 1000) aux structures diverses judicieusement choisies et dont la biodisponibilité, la toxicité et l'efficacité ont été démontrées chez les humains. La deuxième étape est l'optimisation des hits issus du screening, afin d'augmenter l'affinité pour une nouvelle cible et de réduire l'affinité pour la cible originale. Le concept SOSA a donc pour objectif de préparer des analogues de ces hits pour transformer l'activité secondaire observée en effet principal et de réduire significativement voire d'annihiler l'activité pharmacologique initiale. Un des avantages majeurs de cette méthode réside dans le fait que les molécules issues de cette approche possèdent de bons profils ADMET et présentent moins de problèmes de toxicité par rapport aux molécules préparées par d'autres approches [10, 11].

Le but de ces travaux de thèse est de développer de nouvelles molécules à partir de médicaments connus. Nous nous sommes particulièrement intéressés au cyclocoumarol, drogue utilisée en thérapeutique en tant qu'anti-coagulant. Nous avons étudié l'activité anti-inflammatoire de ce composé et nous avons orienté notre recherche vers la préparation d'inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase-2 (COX-2).

Pour mener à bien ce projet, nous nous sommes appuyés sur les outils de la bioinformatique et de la chimie médicinale. En partant de résultats antérieurs au laboratoire de chimie médicinale [12], démontrant l'activité anti-inflammatoire du cyclocoumarol (criblage *in silico* et évaluations biologiques), nous nous sommes intéressés à développer une nouvelle série de dérivés du cyclocoumarol, inhibant sélectivement la COX-2. La pharmacomodulation réalisée autour de ce composé suit une approche de chimie thérapeutique relativement classique permettant par la suite de réaliser la synthèse des nouveaux analogues du cyclocoumarol. Les outils de bioinformatique nous ont guidé dans l'élaboration de nouvelles structures inhibitrices et sélectives de la COX-2, en conservant le squelette du cyclocoumarol, grâce à l'étude du mode de liaison des molécules dans le site actif de la COX-2 et à des logiciels

permettant soit de générer des modèles pharmacophoriques (LigandScout) soit d'estimer l'affinité par une visualisation directe de la structure (SeeSar) afin de prédire les molécules les plus susceptibles d'inhiber sélectivement la COX-2.

Ce manuscrit est décomposé en 4 grands chapitres

Le premier chapitre sera consacré à la présentation de la cible COX-2. Il s'agit de comprendre l'intérêt de cette enzyme en tant que cible thérapeutique, d'étudier la structure de son site actif (forme, taille...etc) afin de pouvoir cibler les différents types de molécules capables de s'y insérer afin d'en modifier son activité. Une présentation des inhibiteurs sélectifs mis sur le marché et de leurs effets secondaires sera faite.

Le deuxième chapitre concernera les méthodes *in silico*. Les modèles pharmacophoriques et les études de docking seront particulièrement détaillés. Nous décrirons comment ces deux approches peuvent guider l'élaboration de molécules susceptibles de présenter de meilleures affinités pour une cible donnée.

Dans la troisième partie de ce manuscrit, nous nous attarderons à discuter du choix du cyclocoumarol, en tant que tête de série, issu d'un screening *in silico* en utilisant le logiciel TOMOCOMD-CARDD (TOPological MOlecular COMputational Design Computer-Aided-Rational-Drug Design). Les stratégies de pharmacomodulation envisagées seront présentées.

Enfin, le dernier chapitre sera consacré à l'analyse et à l'interprétation des résultats expérimentaux obtenus aux cours des travaux de synthèse des molécules, des études de modélisation moléculaire et des études biologiques. L'analyse de ces résultats nous permettra de proposer de futures structures intéressantes à développer en tant qu'inhibiteurs sélectifs de la COX-2.

Deuxième Partie : COX-2 et inflammation

II.1 Les prostaglandines (PGs) et les thromboxanes (TXs)

L'inflammation est un processus complexe qui intervient dans la défense de l'organisme face à tout élément étranger agressant le corps humain. Ce phénomène est notamment impliqué dans le développement de nombreuses maladies affectant l'homme. Il est caractérisé par quatre principaux symptômes : la rougeur, la chaleur, la douleur et le gonflement. La réponse inflammatoire est contrôlée par une grande diversité de médiateurs, parmi lesquels les prostaglandines (PGs) qui jouent un rôle majeur dans la réponse inflammatoire médiée par les cyclooxygénases [13-15].

II.1.1 Présentation des prostaglandines (PGs) et thromboxanes (TXs)

II.1.1.1 Découvertes et nomenclature des PGs et TXs

Les PGs ont été découvertes pour la première fois dans les années 1930 par Goldblatt puis Von Euler [16] qui ont détecté la présence d'un acide gras dans le liquide séminal humain. Von Euler lui attribue le nom de *prostaglandine* pensant que cet acide gras provenait de la glande de la prostate. Trente ans plus tard, Bergstrom et Samuelsson [16, 17] établissent pour la première fois la structure de deux PGs : PGE et PGF. Les PGs et les thromboxanes (TXs) font partie d'une famille de lipophiles comprenant 20 atomes de carbone et une fonction acide carboxylique. Ils dérivent principalement trois substrats : l'acide eicosatriénoïque, l'acide arachidonique (AA), et l'acide eicosapentaénoïque. Parmi les PGs et les TXs les plus connues, formées à partir de l'AA, il y a : PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF_{2α} et TXA₂. Pour la PGF, α et β indiquent la configuration spatiale du groupement hydroxyle situé en position 9 (Figure 2 et Figure 3) [16, 18-22].

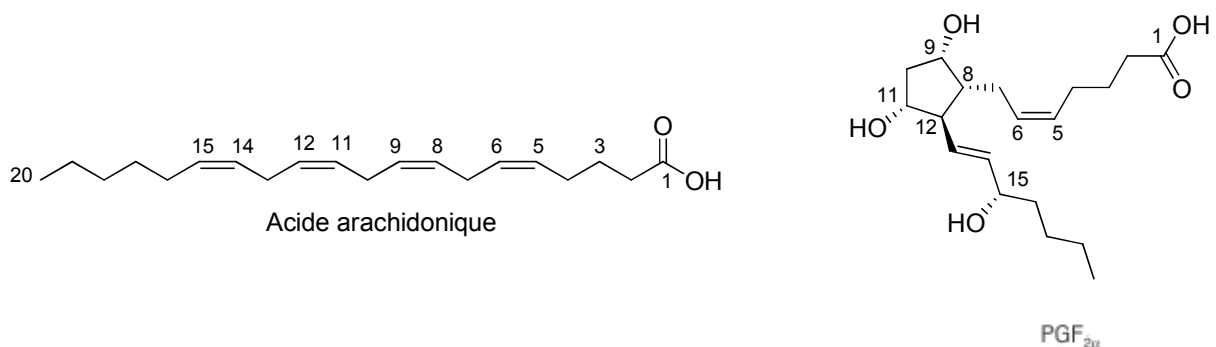


Figure 2 : Structure chimique de l'acide arachidonique et de PGF_{2α} [23]

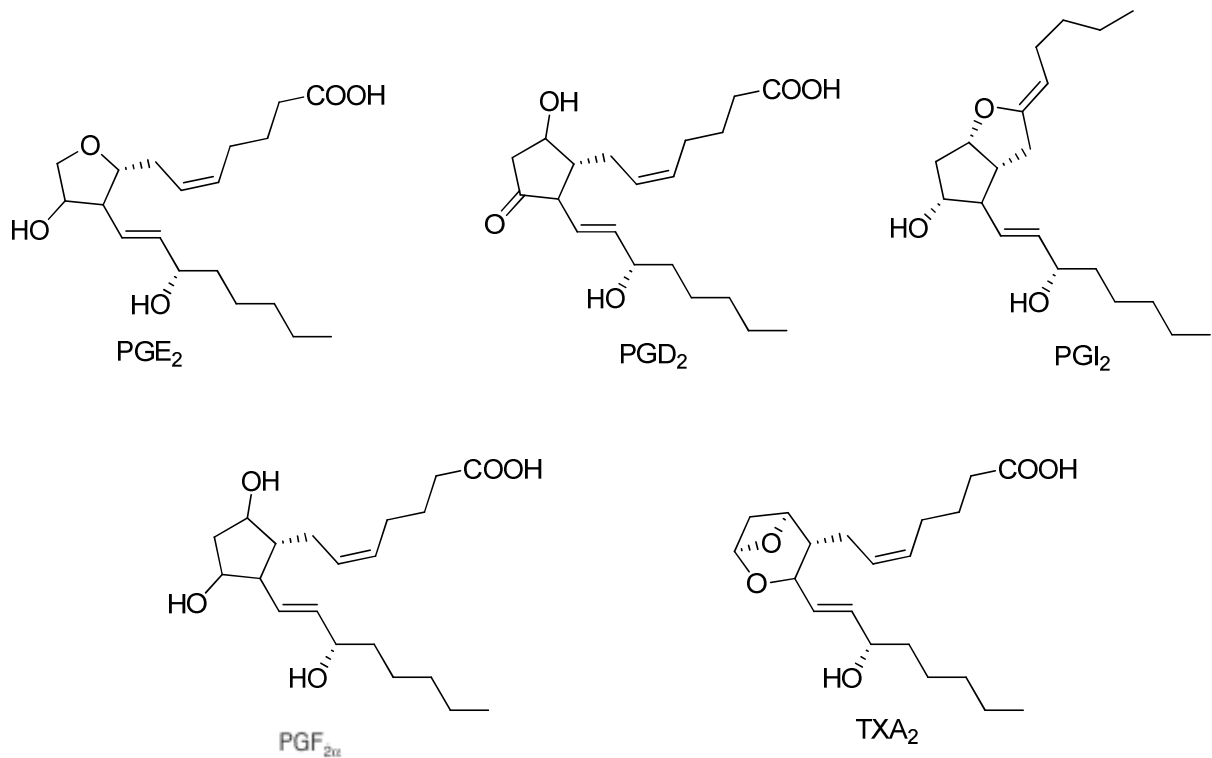


Figure 3 : Structures chimiques des PGs : PGE_2 , PGD_2 , PGI_2 , $PGF_{2\alpha}$ et TXA_2 [16]

II.1.1.2 Biosynthèse des PGs

L'AA est libéré à partir de membranes lipidiques, par action de phospholipases telles que la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase C (PLC) ou la phospholipase D (PLD) [23]. Une fois libéré, l'AA peut être transformé en différents produits selon deux voies biochimiques principales (Schéma 2). La première est celle où l'AA se lie avec la 5-lipooxygénase, une enzyme générant les HPETE (acides hydroxypéroxyeicosatétraénoïques). Ces derniers se transforment rapidement en leucotriènes (LT), lipoxines et HETE (acide hydroxyeicosatétraénoïque). La seconde voie concerne les transformations de l'AA par la cyclooxygénase (COX) menant à la formation des PGs et des TXs [24-28].

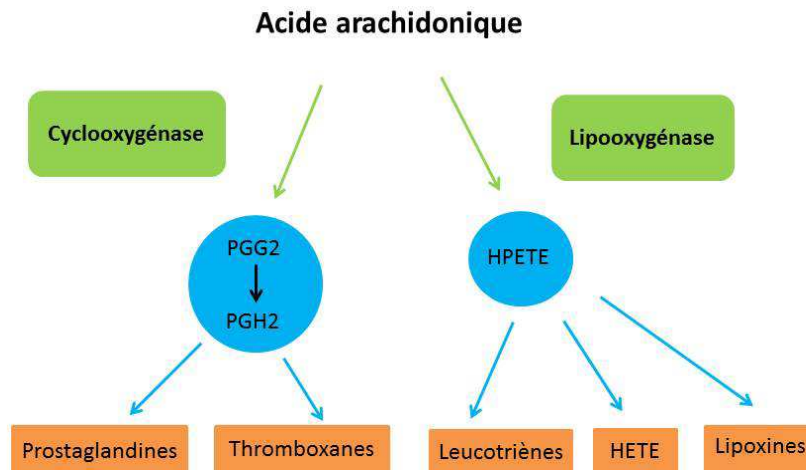


Schéma 2 : Les différentes voies de transformations de l'acide arachidonique

II.1.1.3 Fonctions des PGs

Les PGs sont présentes dans la plupart des cellules et tissus ce qui leur confère une grande variété de propriétés biologiques, spécifiques du tissu (ou cellule) à partir duquel elles sont produites. Les PGs et les TXs sont connus pour intervenir dans la réponse inflammatoire par induction de signaux de la douleur, de la fièvre, la stimulation de l'aggrégation des plaquettes...[16, 29-32]. Ainsi chaque PG et TX possèdent des fonctions particulières, et agissent sur différents tissus et organes (Tableau 1).

Tissus/Organes	Médiateurs	Effets
Organes reproductifs féminins	PGE ₂ , PGF _{2α}	Contraction de l'utérus, ovulation, grossesse
Organes reproductifs masculins	PGE ₂ , PGF _{2α}	Fertilité
Système cardiovasculaire	TXA ₂ PGE ₂ , PGI ₂ PGF _{2α} , TXA ₂	Agrégation plaquettaire Vasodilatation artérielle Vasoconstriction veineuse
Système respiratoire	PGE ₂ PGF _{2α} , TXA ₂ ,	Brochondilatation Brochonconstriction
Système rénal	PGE ₂ , PGI ₂	Régulation du débit sanguin dans le rein
Système gastrointestinal	PGE ₂ , PGI ₂	Protection de la muqueuse gastrique
Système immunitaire	PGE ₂ , PGI ₂	Inhibition des lymphocytes T et activation et prolifération des lymphocytes B
Système nerveux central	PGE ₂ PGD ₂ PGI ₂ , PGE ₂	Fièvre Sommeil Douleur

Tableau 1 : Principales fonctions des prostaglandines et thromboxanes (adapté selon [16])

II.1.1.4 Acide arachidonique et cyclooxygénase

L'enzyme cyclooxygénase possède deux sites actifs : un site COX permettant de catalyser une réaction de cyclo-oxygénation et un site POX (peroxydase) permettant de catalyser une réaction de réduction. La principale activité de COX est de cycliser l'AA pour former la PGG₂, alors que POX réduit la PGG₂ en PGH₂ (Schéma 3) [18, 24, 33]. C'est d'ailleurs pour cette raison que cette enzyme est également appelée prostaglandine G/H synthase (PGHS).

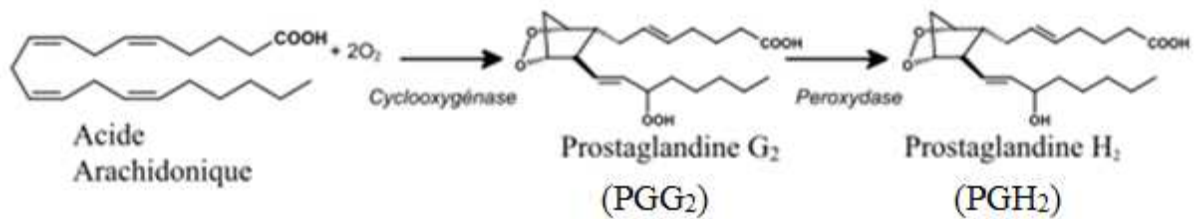


Schéma 3 : Transformations de l'acide arachidonique dans la cyclooxygénase et la peroxydase [34]

Trois grandes étapes décrivent la conversion de l'AA en PGs dans l'enzyme : la libération de l'AA par la phospholipase A2, la formation de PGG₂ dans COX et celle de PGH₂ dans POX, et la formation des PGs (Schéma 4).

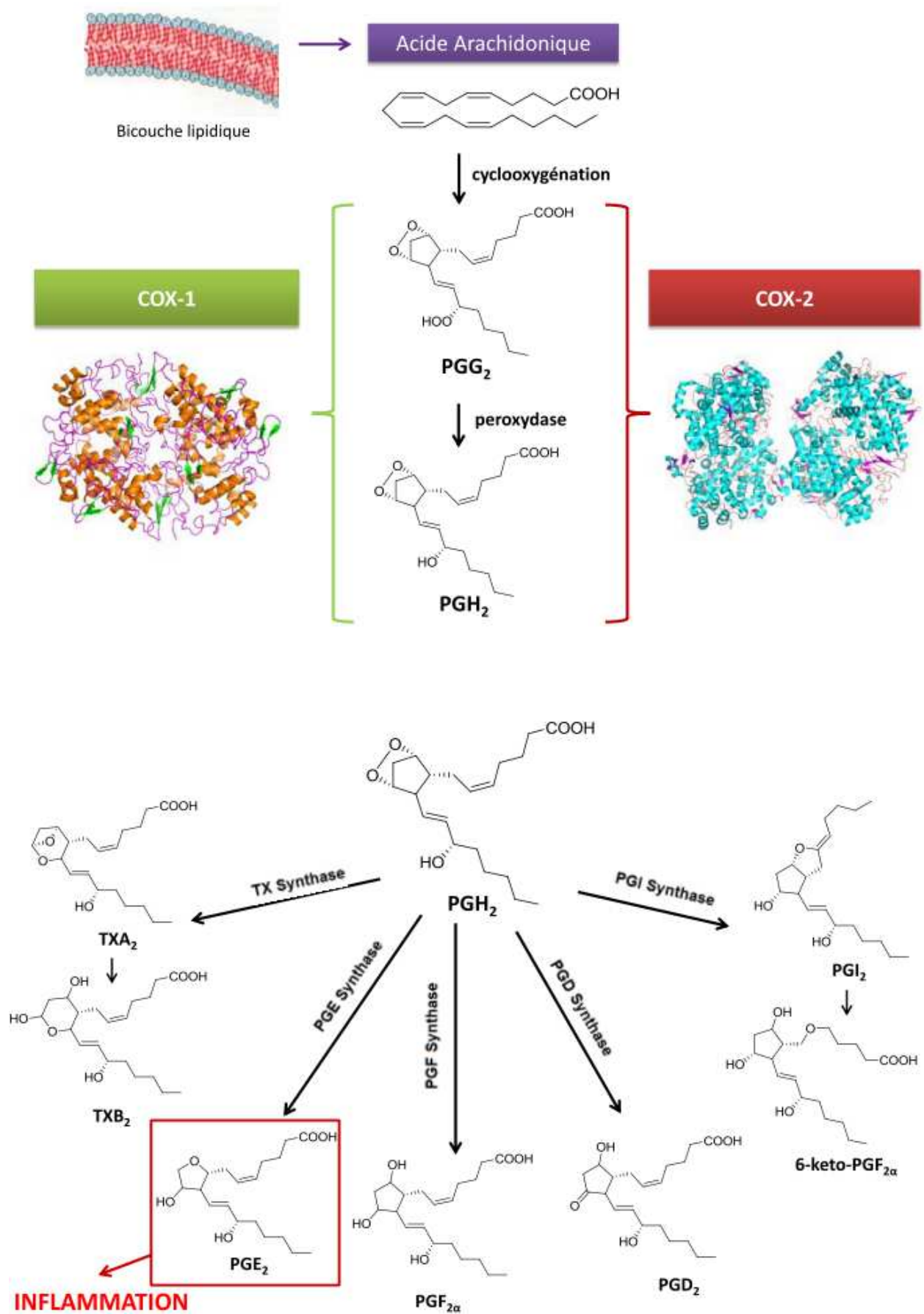


Schéma 4 : Formation des PGs à partir de l'AA. L' AA est oxydé par la réaction de cyclooxygénation qui se déroule dans la COX, il est ensuite converti en PGG₂ puis réduit en PGH₂. La PGH₂ est hautement instable et est rapidement transformée par des synthases spécifiques en PGE₂, PGF₂, PGD₂, PGI₂ et TXA₂ [16]

Etape 1. Libération de l'AA par la phospholipase A2 (PLA2)

En réponse à une grande variété de stimuli, particulièrement des membranes endommagées, la PLA2 est activée et libère l'AA. Cet acide gras atteint ensuite le site actif de COX en passant par un long tunnel hydrophobe et s'y fixe en réalisant des liaisons hydrogène entre les résidus Arg 120 et Tyr 355 et sa fonction COO⁻ (Figure 4).

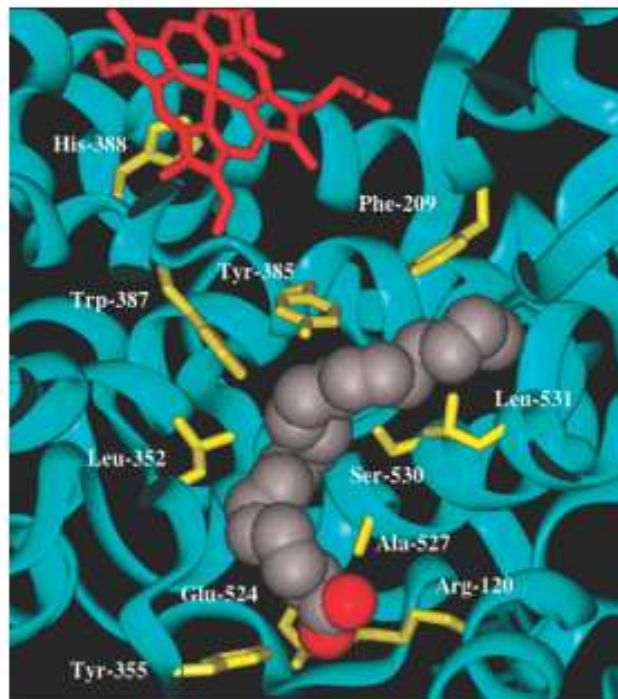


Figure 4 : Acide arachidonique lié au site actif de oCOX-1 (ovine COX-1). Le carboxylate réalise des interactions ioniques avec l'Arg 120 et des liaisons hydrogène avec la Tyr 355. Il adopte une forme en L dans le tunnel hydrophobe. L'hème est désigné en rouge. Les résidus en contact avec l'acide arachidonique sont représentés en jaune [35]

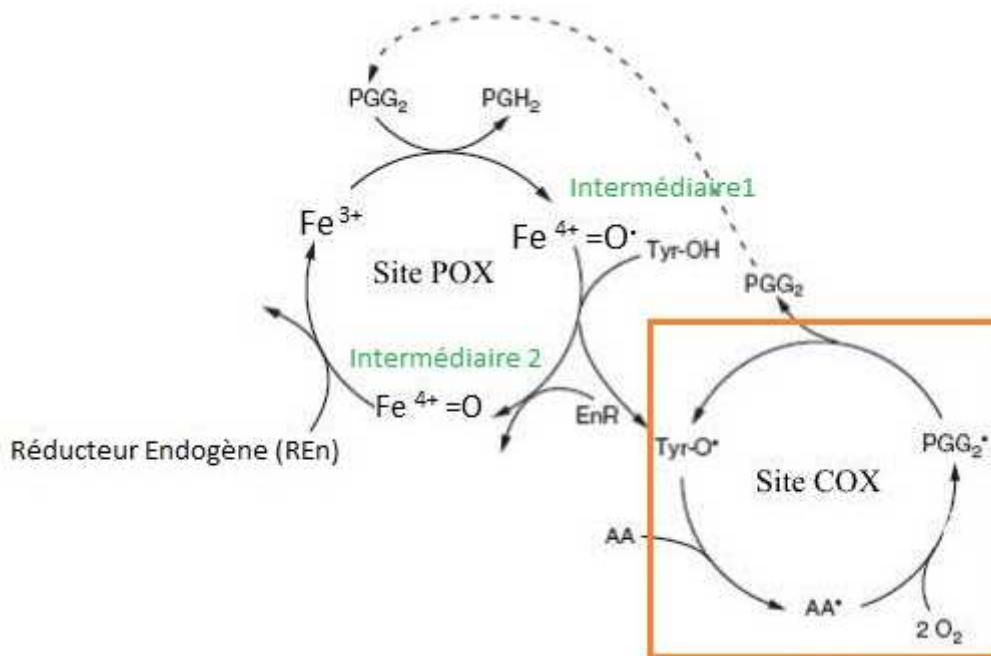
Etape 2. Formation de PGG₂ dans COX et celle de PGH₂ dans POX

L'activation du site actif de COX est complètement dépendante des réactions se déroulant au sein de POX. Le site actif de la peroxydase comprend un hème [36]. L'oxydation du fer initie la boucle catalytique. Un hydroperoxyde réagit avec le fer pour former l'intermédiaire I [Fe⁴⁺=O[•]] (un radical cationique d'oxyde de fer) [36]. Ensuite une réaction intramoléculaire de

transfert d'électron entre la Tyr 385 et l'intermédiaire I génère le radical Tyr O[•] correspondant. Si le site actif de la COX contient l'AA, le radical de la Tyr 385 active la COX en capturant, par transfert d'électron, l'atome d'hydrogène situé en position 13-pro(S) de l'AA, formant ainsi le radical arachidonate (AA[•]). La cascade de l'AA est alors déclenchée. l'AA[•] capture une molécule d'oxygène qui vient se fixer en C-11. Une cyclisation avec le C-9 permet de former le peroxyde et un radical pentadiénylique. Puis, successivement des réactions de transferts d'électrons ont lieu en C-12 et en C-15. C'est dans cette dernière position qu'une seconde molécule d'oxygène vient s'insérer pour former le radical C-15-(S)-hydroperoxyde de la PGG₂ (PGG₂[•]). Enfin, ce dernier radical formé capture l'hydrogène de la Tyr 385 formant la PGG₂ et régénérant le radical de la Tyr 385 complétant ainsi le cycle catalytique de la COX.

La PGG₂ libérée atteint la POX où elle subit une réaction de réduction pour être transformée en alcool correspondant (PGH₂) [19, 22, 35].

Pour le cycle catalytique de l'hème, l'intermédiaire I peut capturer l'hydrogène de la Tyr 385 pour former l'intermédiaire II, ou peut être réduit en Fe³⁺, son état initial (Schéma 5).



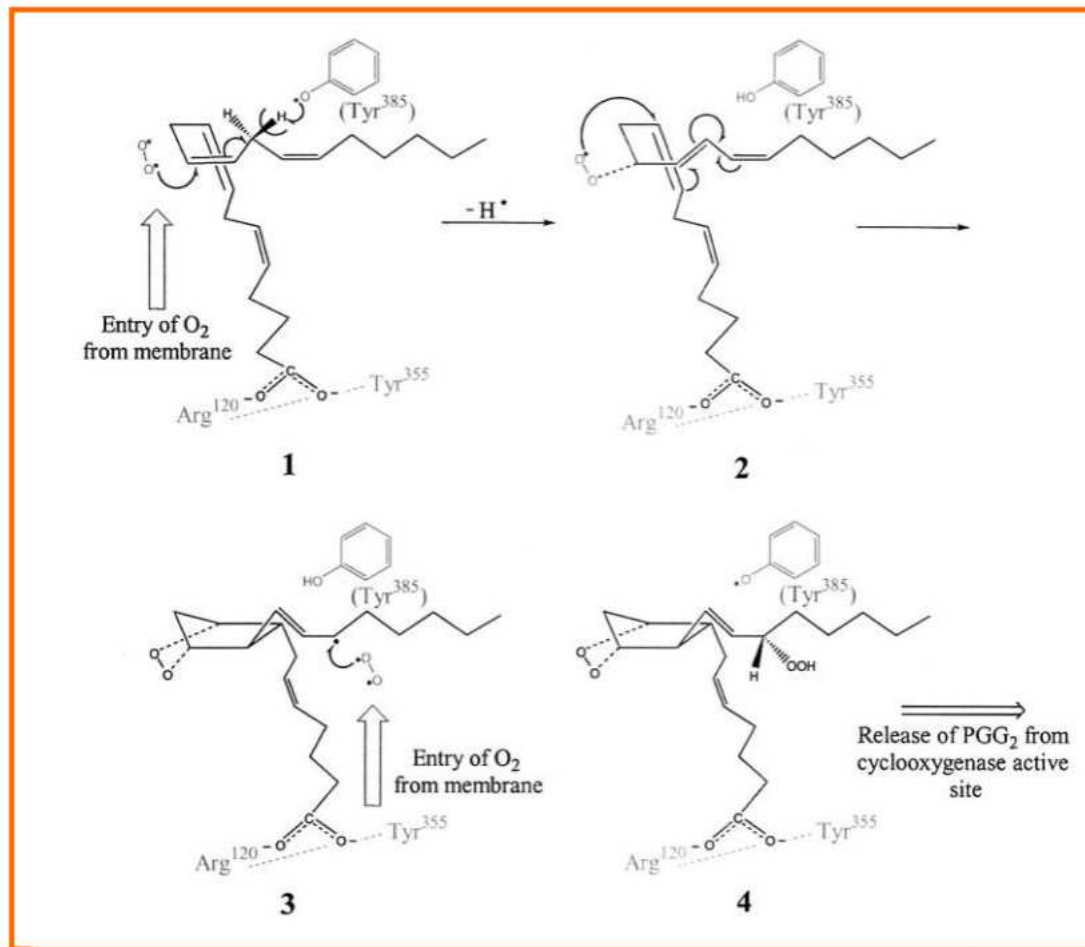


Schéma 5 : Cycles catalytiques de la peroxydase et de la cyclooxygénase. Focus sur le mécanisme d'activation de COX par l'AA [22] (adapté selon Griswold et collaborateurs [19] Simmons et collaborateurs [22] Blobaum et collaborateurs [35] Chandrasekharan et collaborateurs [34])

Etape 3. Formation des PGs

La PGH₂ comporte un endoperoxyde instable, rapidement réarrangé par une variété d'enzymes spécifiques, les synthases, et selon les tissus, pour former les cinq PGs et le TX actifs : PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF_{2α}, TXA₂, comme illustré Schéma 4.

Certaines de ces PGs et TXs possèdent des temps de demi-vie très courts (de 30s à 30 min) conduisant à la formation rapide de PGs ou TXs plus stables (TXB₂ et 6-céto-PGF_{1α})... [16, 18, 22].

II.1.2 Descriptions des isoformes de COX

II.1.2.1 Découvertes de COX-1 et COX-2

En 1971, Vane démontre pour la première fois que l'aspirine empêche la synthèse des PGs et postule que cette inhibition est due à l'inhibition d'une protéine, la prostaglandine G/H synthase, qu'il nommera plus tard la cyclooxygénase (COX) [33]. En 1976, Hemler et collaborateurs isolent la COX-1 [33]. Cependant, dans les années 1990, Needleman suspecte pour la première fois l'existence d'une forme inductible de la COX. Un an plus tard, la seconde isoforme inductible est identifiée, codée par un gène différent de la première isoforme et en 1988, plusieurs équipes (Herschman, Simmons, Dewitt, Smith) réussissent à cloner ce gène [33]. Plus tard, le nom de COX-1 et COX-2 leur sera attribué selon leur découverte chronologique : COX-1 pour l'isoforme découverte en 1976 et COX-2 pour celle découverte en 1991. De nombreux travaux entre 1990 et 1993 s'intéressent à la COX-2, démontrant notamment que la quantité de COX-2 dans les tissus inflammés est significativement plus élevée que dans les tissus sains [37, 38]. Les deux isoformes interviennent donc dans des processus biologiques distincts. La forme constitutive COX-1 est généralement qualifiée de « house-keeping » puisqu'elle participe au maintien d'un taux normal de PGs dans les tissus sains et la deuxième isoforme est qualifiée « d'inductible » car elle est activée par différents stimuli impliqués dans la réponse inflammatoire [18, 33, 39-44].

II.1.2.2 Expression des gènes

L'expression de COX-2 est activée par une grande variété de médiateurs intra- et extracellulaires impliqués dans le processus de l'inflammation : les lipopolysaccharides (ex : l'endotoxine), les cytokines pro-inflammatoires (interleukin-1 β , tumor necrosis factor (TNF- α), epidermal growth factor (EGF), etc. Cependant elle est inhibée par des cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-13 et IL-10 [45, 46].

Dans le cas de COX-1, cet isoforme est décrit comme un gène stable assurant un taux constant de production de son enzyme et des PGs responsables de l'homéostasie. Le gène de COX-2 est souvent décrit comme un « immediate-early gene » c'est-à-dire qu'il n'est pas toujours exprimé mais il est rapidement surexprimé pendant l'inflammation [24, 45] (Tableau 2).

Informations structurelles	Isoformes de COX	
	COX-1	COX-2
Localisation des chromosomes	9q32-q33.3	1q25
Homologie des acides aminés	60% d'identité	
Localisation de l'enzyme	Réticulum endoplasmique	Enveloppe nucléaire
Taille du gène	22 kb, 11 exons	9.4 kb, 10 exons
Taille de l'ARNm	2,8 kb	4,5 kb
Taille du polypeptide	70 kDa, 602 acides aminés	70 kDa, 604 acides aminés
Régulation	Constitutive	Inductible
Echelle de l'expression du gène induit	2-4 fois	10-80 fois
Durée de l'activation du gène	24 h	0,5 h

Tableau 2 : Différences dans l'expression et la régulation de COX-1 et COX-2 (adapté selon [45])

II.1.2.3 La structure de COX-1 et COX-2

Les enzymes COX-1 et COX-2 sont des protéines homodimériques. Chaque monomère mesure 70 kDa et contient les deux sites actifs COX et POX. COX-1 et COX-2 partagent 60% d'identité de séquence et comportent 602 et 604 acides aminés respectivement. Une différence singulière est à noter : 17 acides aminés de l'extrémité *N*-terminale de COX-1 sont absents chez la COX-2 et la COX-2 présente 18 acides aminés sur l'extrémité *C*-terminale qui ne se retrouvent pas dans la COX-1 [16, 42].

L'élucidation de leur structure tridimensionnelle (en 1994 pour COX-1 [47] et en 1996 pour COX-2 [20]) a permis de révéler trois unités indépendantes mais identiques chez les deux protéines: un domaine EGF-like *N*-terminal, un domaine hélicoïdal de liaison à la membrane (MBD) composé de 4 hélices α (A-D) situé près des couches lipidiques, et un très grand domaine globulaire à l'extrémité *C*-terminale (Figure 5). Ce dernier domaine est le plus important puisqu'il contient les sites actifs COX et POX. Ces deux sites sont localisés sur des côtés opposés du domaine catalytique [35, 41-43, 48-51]. Les substrats et les inhibiteurs accèdent au site actif COX en passant d'abord à la base du MBD [20], puis traversent un long

tunnel hydrophobique (25 Å de longueur, et 8 Å de largeur) pour atteindre l'intérieur du domaine catalytique [20, 22, 35] où est localisé le site actif COX [52].

Ce long tunnel hydrophobique présente une zone de compression à l'interface entre le MBD et le site actif COX. Cette zone est constituée de trois acides aminés, Arg 120, Glu 524 et Tyr 355 qui établissent un véritable réseau de liaisons hydrogène. L'alternance entre le maintien et la rupture de ce réseau de liaisons hydrogène joue le rôle d'ouverture et de fermeture au site actif. Cette zone participe également à l'inhibition dite « time-dependent » de tous les inhibiteurs.

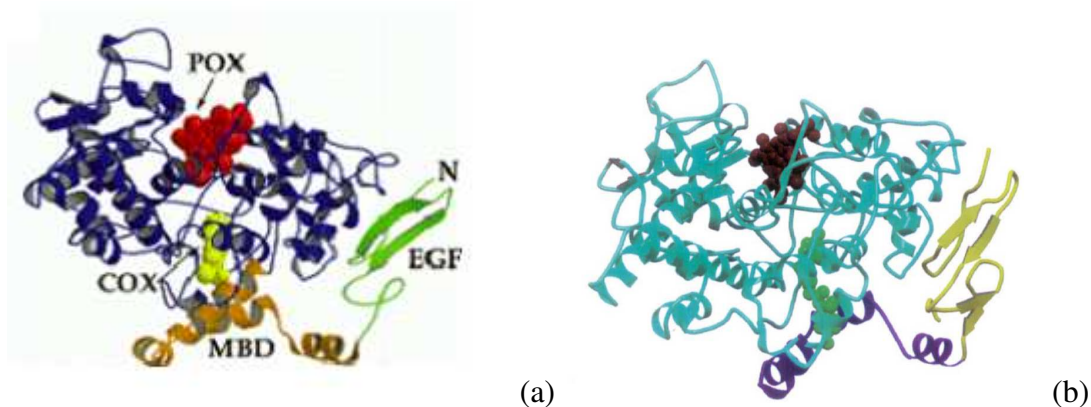


Figure 5 : a) Représentation de COX-1 avec le flurbiprofène (jaune), précisant les positions des sites POX , contenant l'hème (rouge), et COX et le domaine catalytique (bleu), le MBD (orange) et le domaine EGF-like (vert) [52]

b) Représentation de COX-2 avec l'inhibiteur RS 104897 (vert), l'hème (marron), le domaine catalytique (bleu), le MBD (violet) et le domaine EGF-like (jaune) [20]

Les sites actifs de la COX-1 et de la COX-2 présentent des structures tridimensionnelles très similaires et parmi les acides aminés conservés entre les 2 isoformes, certains se révèlent être essentiels : l'Arg 120 (située à l'entrée du site et intervenant dans la liaison des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et de l'AA), la Tyr 385 (qui intervient dans la réaction de cyclooxygénation) et la Ser 530 (qui établit une liaison covalente notamment avec l'aspirine lors de la réaction d'acétylation).

Quelques différences majeures entre les sites actifs de la COX-1 et de la COX-2 sont cependant à noter expliquant la spécificité de certains inhibiteurs pour chacune de ces deux protéines.

Premièrement, les sites actifs de COX-1 et COX-2 ont des formes et tailles différentes. Le site actif de COX-2 est plus large de plus de 17% que COX-1, permettant l'introduction de

diverses molécules plus volumineuses qui ne pourront pas s'insérer dans le site actif de COX-1. De plus, la COX-2 possède une seconde poche interne augmentant de 25% le volume de son site actif (Figure 6).

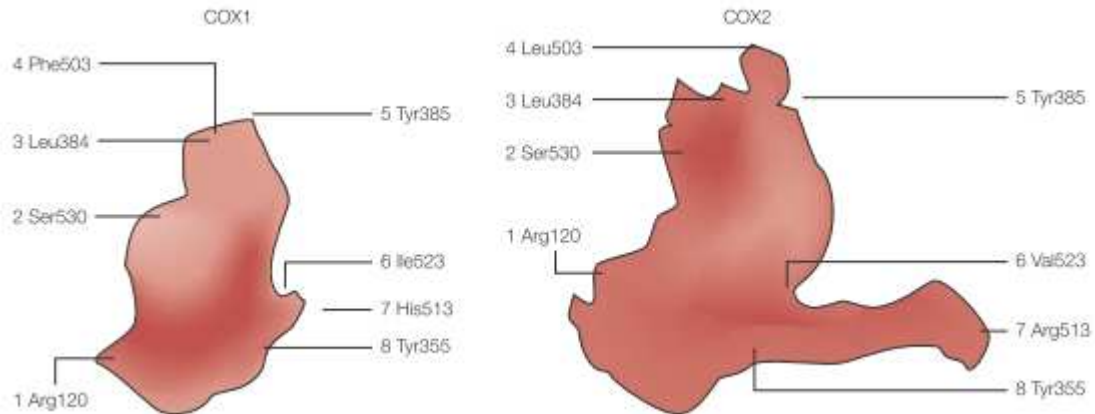


Figure 6 : Les résidus essentiels constituant les sites actifs de COX-1 et COX-2. Les substitutions Arg 513, Val 523, Leu 503 et Val 434 (non représentée) dans COX-2 permettent un gain de 25% du volume dans le site actif de COX-2 [53]

Les principaux acides aminés expliquant la taille et l'environnement chimique différents dans le site de liaison se trouvent :

-en position 523, une isoleucine dans COX-1, est remplacée par une valine dans COX-2 (Figure 6 et Figure 7). Ce résidu plus petit libère de la place dans le tunnel hydrophobe et facilite l'accès à la seconde poche supplémentaire. Cette poche est particulièrement connue pour être le site de liaison des inhibiteurs sélectifs de COX-2. Quant à l'isoleucine dans COX-1, son groupe éthyle encombre le passage de molécules plus volumineuses [21, 35, 54].

-en position 434, une autre isoleucine est remplacée par une valine dans COX-2 (Figure 7). Cette fois-ci, cette substitution offre une meilleure mobilité des chaînes latérales des résidus, c'est le cas notamment de Phe 518 qui en pivotant réduit les effets stériques et améliore l'accès à la seconde poche [39].

-en position 513 ; une histidine est remplacée par une arginine dans COX-2 (Figure 6 et Figure 7). Ce résidu a montré de meilleures affinités avec les groupements sulfonamides des inhibiteurs sélectifs de COX-2 favorisant non seulement la formation de liaisons hydrogène mais aussi l'introduction de ces molécules dans le second site de liaison. L'Arg 513 joue

également un rôle important dans les inhibitions dites « time-dependent », pour les inhibiteurs sélectifs de COX-2 [21, 35, 54].

-en position 503, une phénylalanine est substituée par une leucine dans COX-2 (Figure 6). Ce résidue pivote sa chaîne latérale de façon à augmenter l'espace à l'intérieur du site actif pour permettre un accès facile aux molécules sélectives et volumineuses dans la poche supplémentaire [21, 35, 54].

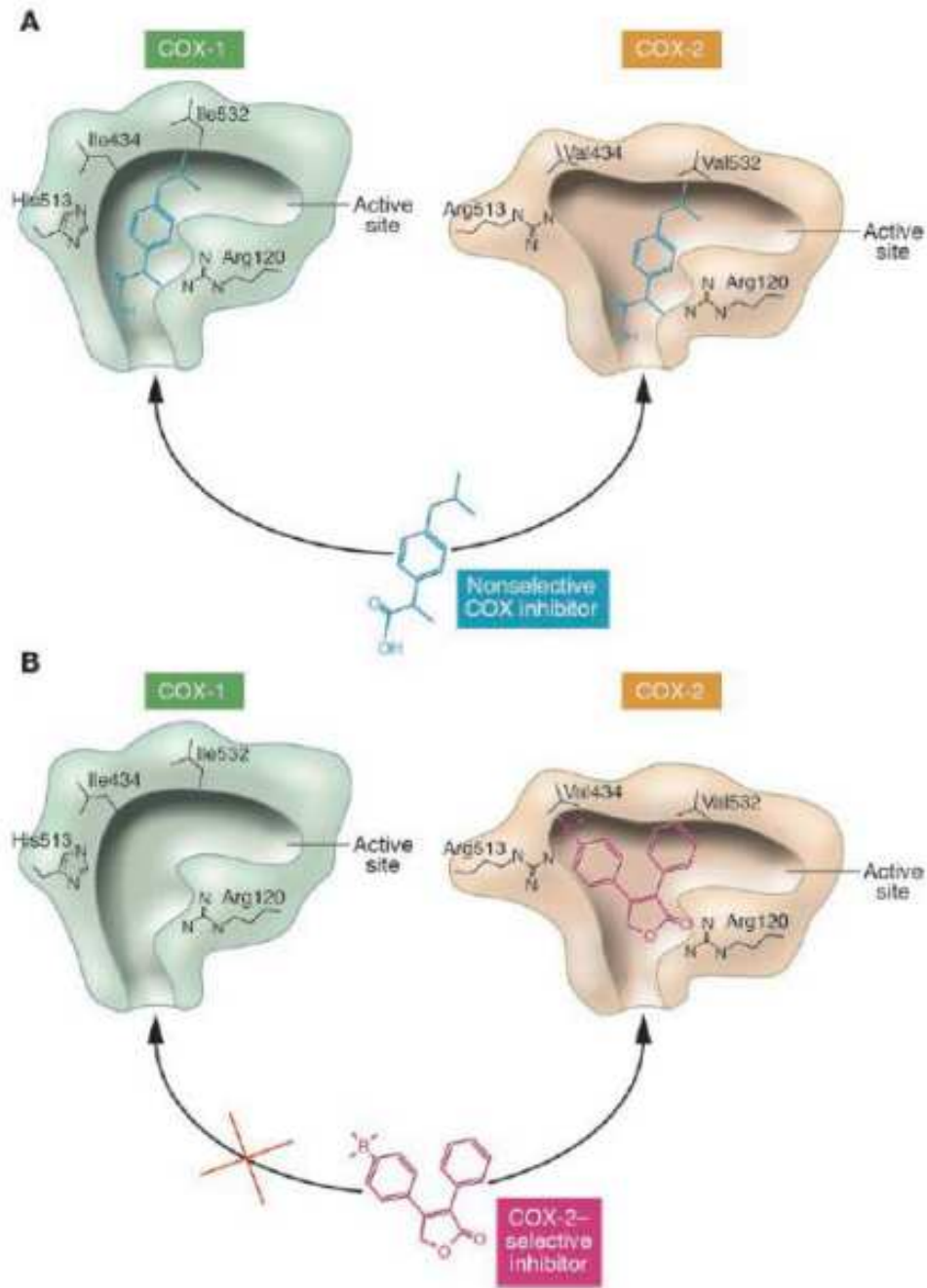


Figure 7 : Differences des sites de liaisons des COX : Val434, Arg513, et Val523 forment la poche supplémentaire de COX-2 qui est absent dans COX-1. **A** : Un inhibiteur non sélectif accède au site actif des deux isoformes. **B** : Seuls les inhibiteurs sélectifs réussissent à pénétrer dans le site actif de COX-2, dans COX-1, les résidus volumineux (Ile434, His513 et Ile 532) empêchent l'accès au site actif [55]

De plus, l'hélice D contenue dans le domaine MBD adopte une position différente dans COX-2 permettant à l'Arg 120 de pivoter. Ce mouvement participe également à un gain d'espace au sein du site actif [35].

La COX-2 présente aussi un deuxième réseau de liaisons hydrogène, formé au dessus de la zone appelée « lobby » [35], cette fois entre l'Arg 513, le Glu 524, et la Tyr 355 [35], et démontrant une nouvelle fois, la flexibilité de la protéine. En effet l'établissement de ce deuxième réseau de liaisons hydrogène dans COX-2 implique un changement de conformation de la protéine expliquant ainsi sa flexibilité conformationnelle [20, 21, 33, 35, 39, 48, 56-58]. Le lobby est une zone située au dessous de la MBD, et est constituée de résidus tels que Pro 86, Ile 89, Leu 93 et Val 116. Certains inhibiteurs sont capables de se lier dans cette zone [35].

Tous ces changements rendent le site actif de COX-2 plus grand et beaucoup plus flexible que celui de COX-1, flexibilité qui est surtout perçue au niveau de sa voûte apicale expliquant ainsi les nombreuses conformations adoptées par COX-2. La surface accessible aux molécules d'eau est aussi plus importante, permettant des interactions essentielles ligand-protéine [39].

II.1.2.4 Peut-on parler de COX-1 inflammatoire et COX-2 constitutive ?

La COX-1 et la COX-2 sont des protéines membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique. La COX-2 est également présente dans l'enveloppe nucléaire COX-2 [42, 59].

La COX-1 est exprimée constitutivement dans la plupart des cellules et tissus incluant le colon, le genou, le rein, l'estomac, le foie, le poumon, le cœur et le cerveau [42, 59]. Son rôle d'« housekeeping » assure un taux constant de PGs protecteurs et régule l'homéostasie vasculaire et les systèmes rénaux et gastriques. Elle synthétise majoritairement les PGs qui assurent la défense du système gastrointestinal.

La COX-2, dans les conditions basales, est quasi-indétectable. L'expression de la COX-2 est induite par différents stimuli participant au processus inflammatoire (les synoviocytes, les macrophages, les monocytes, les cellules endothéliales) [40]. Ainsi en cas d'inflammation, l'expression de la COX-2 peut s'élever jusqu'à 20 à 80 fois comparée à l'état normal où elle est imperceptible, tandis que l'expression de COX-1 augmente de 2 à 3 fois comparée aux conditions basales [25, 38, 48, 60]. La COX-2 produit des PGs impliquées dans la réponse inflammatoire [39, 61, 62]. La particularité de COX-2 est que son induction implique la

production d'une grande quantité de PGs pour une courte période. En effet, en cas d'inflammation, la protéine est surexprimée au bout d'une heure, atteint son maximum en 3h et son expression diminue au bout de 6 h [25, 38, 48, 60].

Le paradigme décrivant COX-1 comme « housekeeping » et COX-2 comme l'enzyme inductible a tendance à évoluer [37, 63]. En effet, COX-2 a été détectée constitutivement à de très faibles doses dans divers organes tels que le cerveau, le pancréas, le rein et le poumon et a démontré un rôle protecteur dans l'homéostasie rénale, vasculaire et gastrique [16, 19, 25, 45, 51]. De plus, plusieurs études ont révélé le rôle anti-inflammatoire de COX-2 dans le processus de cicatrisation au niveau du système gastrointestinal [37, 48]. A l'inverse, la COX-1 peut être induite sous certaines conditions et participer à l'inflammation et au développement de certaines maladies tels que l'arthrite ou l'athérosclérose [16, 19, 25, 37, 45, 51, 63-66]. Ainsi ces données révèlent une relation complexe entre COX-1 et COX-2.

II.1.3 Sélectivité et évaluation d'inhibiteurs de COX-2

Les premiers médicaments inhibiteurs de COX étaient non sélectifs, inhibant l'activité des deux isoformes sans avoir une affinité préférentielle significative pour l'une des deux protéines. Ces inhibiteurs non sélectifs présentent divers effets indésirables, en particulier affectant le système gastrointestinal (GI), de simple maux de ventre jusqu'au développement de sévères ulcères pouvant entraîner la mort. De nombreux travaux ont soutenu l'idée que ces effets secondaires non souhaités avaient pour principale cause l'inhibition de l'enzyme « housekeeping » COX-1 [16, 19, 25, 45, 65]. Ainsi, le développement de molécules originales, sélectives vis-à-vis de l'isoforme inductible, a été le point de départ de la conception de nombreux médicaments anti-inflammatoires sélectifs de COX-2.

La sélectivité d'une molécule envers COX-2 est définie par le calcul du ratio de son IC_{50} sur COX-1 et de son IC_{50} sur COX-2, l' IC_{50} évaluant la concentration de la molécule nécessaire pour réduire de 50% la production de PGs [29, 46].

$$IC_{50}(\text{COX-1}) / IC_{50}(\text{COX-2}) > 1 \Rightarrow \text{inhibition préférentielle de COX-2}$$

$$IC_{50}(\text{COX-1}) / IC_{50}(\text{COX-2}) < 1 \Rightarrow \text{inhibition préférentielle de COX-1}$$

$$IC_{50}(\text{COX-2}) / IC_{50}(\text{COX-1}) = 1 \Rightarrow \text{inhibition non sélective}$$

Ainsi la puissance d'un inhibiteur de COX-2 se caractérise par un fort ratio d' IC_{50} (COX-1) / IC_{50} (COX-2), une activité anti-inflammatoire conséquente, très peu d'effets indésirables, et donc une meilleure tolérance. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré une relation entre le ratio d' IC_{50} (COX-1/COX-2) et les effets secondaires du système GI : plus le ratio est grand, moindre sont les effets secondaires [33, 67].

Par ailleurs, des molécules hautement sélectives (sélectivité >1000 pour COX-2) ont été élaborées par des industries pharmaceutiques ; il n'y a donc pas de valeur optimale réellement définie concernant la sélectivité de COX-2 [46].

II.1.4 Mécanisme d'inhibition des molécules sélectives de COX-2

Pour mettre au point des molécules efficaces, il est important de i) comprendre le mécanisme grâce auquel les composés vont inhiber la COX-2 et plus particulièrement dans quelle partie de la protéine ils vont se fixer et ii) déterminer leurs modes de liaisons. Dans le cas de la COX-2, il est aussi important d'élucider les mécanismes guidant la sélectivité de certains composés pour la COX-2.

Les premières approches pour tenter d'inhiber l'activité de COX proposaient d'inhiber la réaction de cyclooxygénation de l'AA par 3 différents procédés [19, 68] : 1) Limiter la concentration du substrat. La concentration de l'acide arachidonique peut être contrôlée en bloquant sa libération par les PLA2. Pour cela, la synthèse de nouveaux médiateurs lipidiques régulant l'activité des PLA2 a été proposée, 2) Réduire la concentration des hydroperoxydes. L'activité de COX est complètement dépendante des hydroperoxydes. En réduisant leur concentration en dessous de 10 nM il a été démontré que l'activité de COX diminue, 3) Utiliser des réducteurs agissant sur les substrats présents dans la POX afin d'empêcher l'oxydation de l'atome de fer hémique qui est nécessaire à l'initiation de la réaction de cyclooxygénation. De nombreux composés contenant un groupe phénol ont été cités comme ayant potentiellement ce rôle de réducteur dans la POX. C'est le cas de l'acétaminophène, de l'acide méfenamique, et du BW755C (Figure 8). Il a été particulièrement prouvé que de tels substrats phénoliques pouvaient avoir une double fonction : activer la COX quand ils sont utilisés à faibles concentrations (0, 1-1 mM) et inhiber la COX à plus forte concentration (> 1mM) [69]. De plus, la COX peut être inhibée en piégeant le radical Tyr 385 ou en empêchant sa formation. En effet ce radical intervient tout au long du cycle catalytique de la COX : il est généré au début du cycle catalytique dans l'hème, ensuite il active l'AA, et enfin il libère la

PGG₂ en fin de cycle. Si un substrat vient piéger ce radical en début de cycle, l'hème ne serait plus sous sa forme radicalaire cationique et la COX ne serait pas activée. Le réducteur peut également empêcher l'activation de l'AA en piégeant le radical Tyr 385 avant qu'il ne réagisse avec l'AA ou en piégeant le radical PGG₂ afin d'éviter la formation des futurs PGs et donc empêcher l'activation de la COX [69, 70].

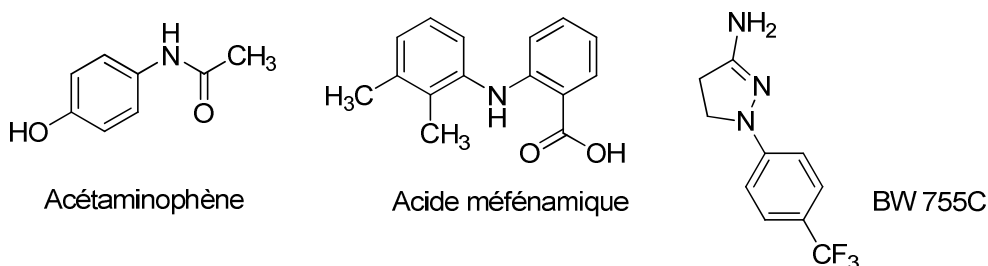


Figure 8 : Structures chimiques de l'acétaminophène, de l'acide méfénamique et du BW755C

Une classification a été établie en 1996, par Kurumbail et collaborateurs [53, 71]. C'est la classification la plus connue et la plus utilisée encore de nos jours : elle distingue les inhibiteurs selon leurs mécanismes d'inhibition et leur sélectivité vis-à-vis de l'enzyme. Selon cette classification, les inhibiteurs de COX peuvent être classés en 4 groupes :

1. Les inhibiteurs irréversibles de COX-1 (aspirine) ou COX-2 (APHS : sulfure de 2-acétoxyphénylhept-2-ynyl). Ces inhibiteurs inactivent la COX de manière irréversible par la formation d'une liaison covalente entre leur fonction COOH et la sérine 530, par une réaction d'acétylation.

2. Les inhibiteurs COX-1 et COX-2 réversibles : ces molécules entrent en compétition avec l'AA pour se lier au site actif de la COX. Ex : ibuprofène, piroxicam et acide méfénamique (Figure 9).

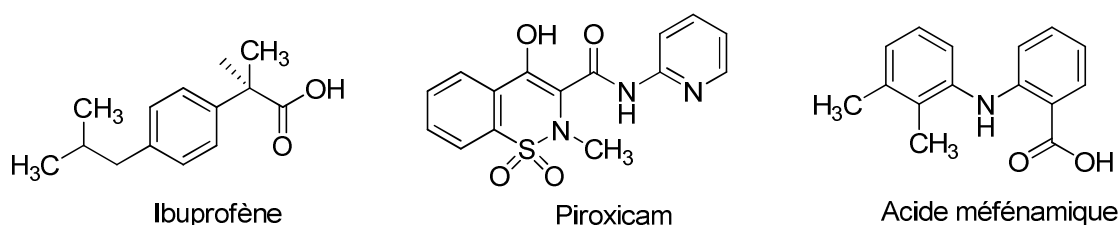


Figure 9 : Structures chimiques de l'ibuprofène, du piroxicam et de l'acide méfénamique

3. Les inhibiteurs COX-1 et COX-2 réversibles, d'interaction lente et « temps-dépendant » : cette catégorie comprend l'indométhacine et le flurbiprofène (Figure 10). L'interaction lente s'explique principalement par la formation d'interactions ioniques entre l'Arg 120 et la fonction carboxylate des inhibiteurs. Ces interactions lentes réduisant la flexibilité de l'enzyme, entraînent l'inhibition de la protéine.

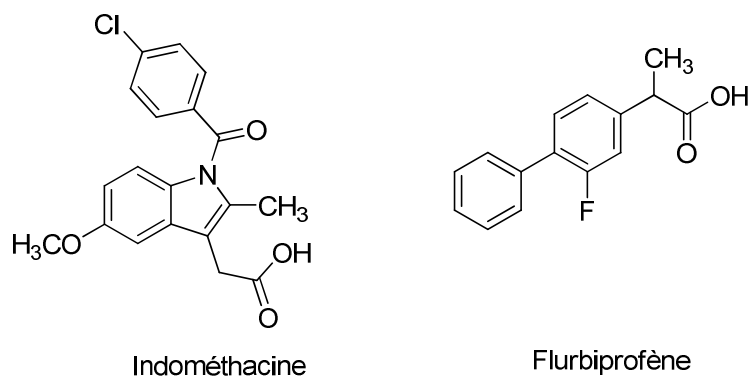


Figure 10 : Structures chimiques de l'indométhacine et du flurbiprofène

4. Les inhibiteurs de COX-2 irréversibles, dits d'interaction lente et « temps-dépendant » : les Coxibs, tels que le célécoxib ou le rofécoxib appartiennent à ce groupe (Figure 11). Ils sont qualifiés d'inhibiteurs sélectifs de COX-2. Leur caractère lent et temps-dépendant s'explique par le fait qu'une partie de leur structure s'intègre dans la poche latérale spécifique de COX-2. De plus, la mise en place d'interactions fortes au sein de cette poche justifie le terme « temps-dépendant ». Ces molécules sont de faibles inhibiteurs compétitifs de COX-1 [39, 72].

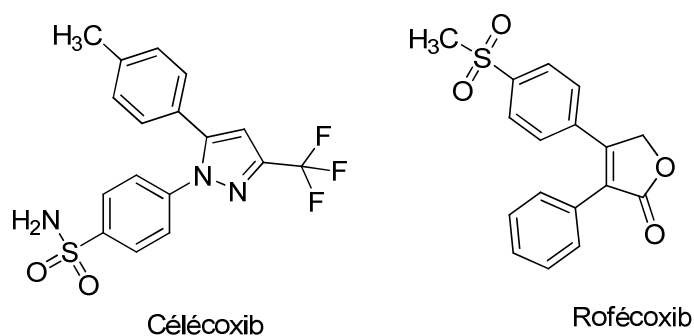
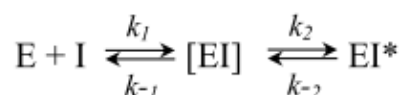


Figure 11: Structures chimiques du célécoxib et du rofécoxib

Il est important de différencier les inhibiteurs « temps-dépendant » réversibles et irréversibles : dans le premier cas, une augmentation de la concentration d'AA permet de déplacer l'inhibiteur du site actif. En effet pour un même type d'interaction régnant entre les inhibiteurs réversibles et l'AA, le temps dépendant s'explique par la compétition entre ces

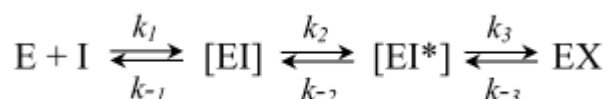
inhibiteurs et l'AA, puis la mise en place d'interactions nécessaires à l'inhibition de l'enzyme. Alors que pour le second cas, le temps dépendant irréversible est dû en grande partie à des interactions fortes s'établissant dans la seconde poche (interactions n'existant pas dans le cas des inhibiteurs temps dépendant réversibles) qui se forment entre l'enzyme et l'inhibiteur et entraînent la perte définitive d'activité et ce indépendamment de la concentration de l'AA.

La notion de « temps-dépendant » est un concept important qui précise la cinétique de liaison et d'inhibition des inhibiteurs de COX-2. En 1975, Rome et Lands [73] introduisent un modèle cinétique expliquant le mode d'inhibition. Tout d'abord, l'enzyme et l'inhibiteur interagissent rapidement par des liaisons faibles et réversibles ([EI]), cette première étape est caractérisée par une constante de dissociation K_1 . Ensuite, une liaison « pseudo-irréversible » se met en place entre le ligand et l'enzyme (EI^*) ; c'est le temps de mise en place de cette liaison qui définit le caractère « temps-dépendant ». Cette seconde étape mène à l'inactivation de l'enzyme [35, 73].



Mécanisme d'inhibition à 2 étapes (diclofénac, indométhacine)

Cette inhibition « temps-dépendante » peut présenter deux ou trois étapes, la première étape étant toujours une étape rapide et les suivantes des étapes lentes [35].



Mécanisme d'inhibition à 3 étapes (célécoxib)

Les étapes lentes qui mènent à la formation d'une liaison forte reliant l'enzyme et son inhibiteur aboutissent à la conversion du complexe [EI] en d'autres complexes ([EI*] ou EX) et durent quelques secondes voire quelques minutes. Ces dernières étapes sont essentielles puisqu'elles caractérisent la puissance et la sélectivité des molécules inhibitrices de COX-2 [21].

L'inhibition par « temps-dépendant » se réalise principalement de deux manières [73] : soit par une modification chimique au sein du site actif, soit par une altération allostérique de la structure protéique.

1) Par modification chimique

Certaines molécules inhibent la protéine *via* la formation d'une liaison covalente avec un résidu du site actif de l'enzyme. C'est le cas de la réaction d'acétylation entre l'aspirine et la Ser 530 (Schéma 6) [74].



Schéma 6 : Formation de liaison covalente entre l'enzyme et son inhibiteur. (E : enzyme, I : partie inhibitrice de la molécule, X : sous-produit issu de la réaction n'ayant pas la capacité de réagir avec les autres molécules de l'enzyme) [74]

2) Altérations allostériques

L'inhibiteur peut provoquer de subtils changements conformationnels dans la structure de l'enzyme aboutissant à la formation d'une liaison forte de nature non covalente entre l'enzyme et son inhibiteur dans le site actif (Schéma 7) [73, 75].



Schéma 7 : Altérations allostériques entre l'enzyme (E) et son inhibiteur (I) [74]

Ces changements sont notamment dus au réseau de liaisons hydrogène entre Arg 120, Glu 524 et Tyr 355. Ce dernier résidu a d'ailleurs été supposé comme pouvant participer à l'activation allostérique [75]. Dans cette zone, la molécule doit être capable d'établir des interactions ioniques et des liaisons hydrogène qui mènent à sa stabilisation. Selon la classe d'inhibiteur, l'établissement de ces liaisons peut prendre du temps. Par exemple, pour le cas des inhibiteurs COX-1 et COX-2 réversibles, la constante d'association inhibiteur-enzyme (k) a été évaluée à $0,034 \text{ s}^{-1}$ pour l'indométhacine et à $0,105 \text{ s}^{-1}$ pour le flurbiprofène. Cette zone est donc le premier obstacle que doit passer la molécule avant d'entrer dans le tunnel de COX.

Certains AINS ont des difficultés à traverser cette zone du fait de la liaison entre Arg 120 et Glu 524 [22]. Il faut qu'ils réussissent à casser cette liaison pour que leur carboxylate puisse se lier avec Arg 120, avant d'entrer plus profondément dans le site actif de COX. Tandis que pour les inhibiteurs sélectifs de COX-2, comme le Célécoxib, ils ne connaissent pas cette difficulté puisqu'ils sont dépourvus de fonction COOH dans leur structure chimique, leur insertion dans le site actif est donc plus aisée.

De plus, du fait que COX-2 présente deux possibilités de réaliser le réseau de liaisons hydrogène dans la zone de compression (l'un avec Arg 120 et l'autre avec Arg 513), il a été proposé l'existence d'un équilibre entre ces réseaux. Ce système d'équilibre provoque différentes conformations de COX-2, et est à l'origine de l'activation allostérique favorisant ainsi la progression d'une molécule située dans cette zone vers le site actif [75]. Le réseau avec Arg 513 offre une zone dite plus « relaxée » facilitant l'accès au site actif et participant fortement à l'activation allostérique alors que le réseau formé avec Arg 120 est dit plus « compact », obligeant l'inhibiteur à adopter une conformation plus appropriée pour réussir à passer cette zone.

Ainsi, les changements conformationnels subtils entraînant l'ouverture / fermeture du tunnel de la COX correspondent donc à la rupture / formation des réseaux de liaisons hydrogène dans la zone de compression [21, 71] et le tunnel a la capacité de suivre ces mouvements pour faciliter le passage de la molécule dans son couloir hydrophobe [75].

En résumé, pour COX-2, trois explications majeures justifient une inhibition dite de « temps-dépendant » :

- 1) les réseaux de liaisons hydrogène et leurs interactions avec la molécule sélective
- 2) l'introduction et l'occupation d'une partie de la molécule dans la poche additionnelle de COX-2
- 3) la liaison forte formée dans le complexe ligand-enzyme engendrant une dissociation très lente permettant de maintenir l'inactivation de l'enzyme pendant un long moment ($K_{\text{inact-célecoxib}} = 0.03-0.5 \text{ s}^{-1}$) [76]

Par la suite, un état de l'art des différents composés inhibitant sélectivement COX-2 est présenté.

II.2 Les inhibiteurs de COX-2-état de l'art

Revue à soumettre à l'issue spéciale "Experimental and Computational methods for Drug Discovery" du journal Current topics in Medicinal Chemistry.

Les tables citées dans la revue sont indiquées en Annexe de ce manuscrit, section « Tables_COX-2 ».

COX-2 selective inhibitors: chemical classification, side effects and their use in cancers and neuronal diseases

Anita-Marie Rayar^{1,2}, Nathalie Lagarde¹, Clotilde Ferroud², Jean-François Zagury¹, Matthieu Montes¹, Maité Sylla-Iyarreta Veitía^{2*}

¹Laboratoire Génomique Bioinformatique et Applications, EA 4627, Conservatoire national des arts et métiers, 292 rue Saint Martin, 75003 Paris, France

²Equipe de chimie moléculaire, Laboratoire de Chimie moléculaire, génie des procédés chimiques et énergétiques, EA7341, Conservatoire national des arts et métiers, 2 rue Conté, 75003 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed: Maité Sylla-Iyarreta Veitía, PhD, e-mail: maite.sylla@lecnam.net

Abstract

Inflammation is a complex phenomenon necessary in human defense mechanisms but also involved in the development of some human diseases. The discovery of cyclooxygenase-2 (COX-2) improved the pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) giving a clear mechanism for prostaglandin regulation *in vivo* and providing a new target for the development of COX-2-selective drugs without gastrointestinal side-effects. Keeping in view the importance of this pharmacological class, several literature reports have underlined the impact of these anti-inflammatory compounds in therapeutics. The present review considers the most recently published literature concerning COX-2 inhibitors until 2016. Through a wide chemical classification, the last developments concerning this therapeutic family by highlighting structure-activity relationships insights and mechanisms are presented. A summary of the principal adverse effects observed and an overview of the new potential therapeutic indications for COX-2 inhibitors are also reported.

Keywords

COX-2 inhibitors, inflammation, non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase, COX-1/COX-2 inhibition, structure–activity relationship

Introduction

Inflammation is a complex phenomenon essential in human defense mechanisms but is also involved in the development of some human diseases. The inflammation process is characterized by four cardinal signs: redness, heat, pain and swelling. Among all the mediators participating in the inflammation process, the prostaglandins (PG) remain the major target of anti-inflammatory therapy since non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) mechanism of action lies in the inhibition of PG biosynthesis. The story started in 1971 when Vane [1, 2] demonstrated that the blockade of prostaglandin synthesis by aspirin was due to the inhibition of a prostaglandin G/H synthase (PGHS) enzyme that he proposed to name cyclooxygenase (COX). Twenty years later, a second COX isoform was discovered [3, 4]. The first COX isoform, identified by Vane and isolated in 1976 by Hemler [2, 5], was renamed COX-1 whereas the second one unknown until 1991 was named COX-2. These two isoforms catalyse the same biotransformation of arachidonic acid but present some differences, notably in terms of expression, function and structure ((Figure 1, Table A). [6, 7]COX-1 is constitutively expressed in most tissues and exerts housekeeping functions such as maintaining the homeostasis or gastric cytoprotection [8]. On the opposite, COX-2 is inducible, usually undetectable under physiological conditions in most tissues except prostate, kidney, brain and smooth muscle [8]. The COX-2 isoform is notably activated by pro-inflammatory stimuli and present mainly a pro-inflammatory function. However, evidences for COX-2 involvement in gastric mucosal defense, renal homeostasis and vascular systems have been made [9-15]. COX-1 and COX-2 share a sequence identity of 60%, present closely similar three-dimensional structure [16] but their active sites are not identical (Figure 2). Indeed, some mutations in the active site between COX-1 and COX-2 have been observed: I434V, F503L, H513R and I523V [16-18] and result in a COX-2 binding site more flexible and 25% larger than COX-1 binding site, with the emergence of a side pocket not available in

the COX-1 binding site. These differences in binding site size and amino acids composition enable to develop ligands selective for COX-2. Indeed, COX-1 inhibition was thought to be blamed for the adverse effects (gastric damage, blood thinning and renal dysfunction) associated with classical and non selective NSAIDS such as aspirin, diclofenac or ibuprofen whereas COX-2 inhibition was associated with anti-inflammatory effects [19, 20]. Even if this dogma is tending to change, it fully explains the discovery story of the anti-inflammatory drugs targeting COX pathways and notably the intensive efforts made upon producing selective, and therefore safer, COX-2 inhibitors. A large number of compounds, belonging to several chemical families have been proposed, and sometimes marketed. These inhibitors present different mechanisms and kinetics of inhibition (irreversible or reversible, competitive, slow time-dependent, selective or non-selective COX-2 inhibitors) [16]. However, a common classification of NSAIDS uses their selectivity to separate the inhibitors in 4 groups ([18, 20]). The first group is formed by non-selective NSAIDS, among which aspirin (**1**), ibuprofen (**16**) or piroxicam (**30**) that can completely inhibit both COX-1 and COX-2. The second class includes NSAIDS with moderate COX-2 selectivity (with an IC_{50} COX-1 / IC_{50} COX-2 ratio ranging from 5 to 50) like celecoxib (**172**), etodolac (**150**) or meloxicam (**32**). The third category gathers NSAIDS presenting a high selectivity for COX-2, with a COX-2 inhibition potency over 50 fold superior to the COX-1 potency. Finally, NSAIDS that are only weak inhibitors of both COX-1 and COX-2 isoforms formed the last group of this classification.

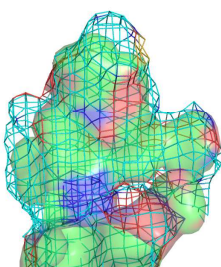


Figure 1: Representation of COX

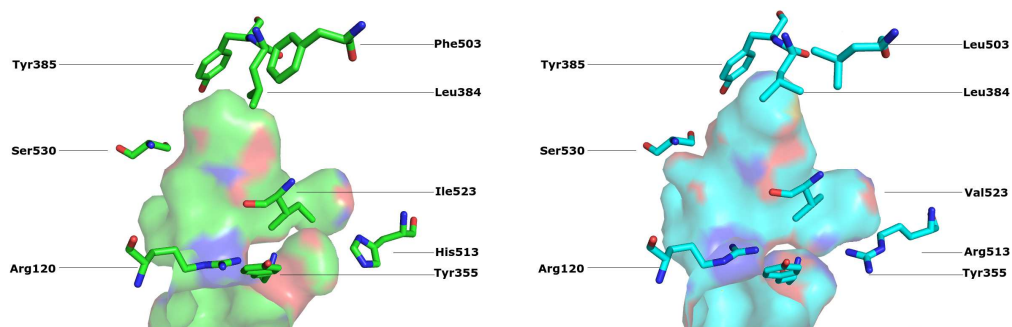


Figure 2 : Active sites of COX-1 (left) and COX-2 (right)/ picture from Pymol

This review will retrace as extensively as possible the state of the art of these compounds, with a focus on the last developments of this therapeutic family of compounds since 2010 referenced as “recent compounds”. The description of the major compounds, some insights about structure-activity relationships and about mechanism of COX inhibition are provided for each chemical class of COX-2 inhibitors. Finally, a summary of the different types of adverse effects observed together and a brief overview of potential new therapeutic indications for COX-2 inhibitors conclude this review.

I Evaluation methods of COX-2 Inhibitors

Various methods have been developed to evaluate drugs inhibitory activity against COX-1 and COX-2. *In vitro* assays used both enzymes and cells. The most frequently used enzymatic methods are based on purified or recombinant enzymes [21, 22], or microsomal preparation of cell line U937 [23]. Cellular methods include human whole blood [2],[24], insect cells [21, 25], various mammalian cells [21, 22, 26] and platelets [27]. However, the use of different and non-standardized methods for the evaluation of COX-1 and COX-2 IC₅₀ jeopardizes the comparison of these data between studies [2, 28-31]. To ensure a solid evaluation of COX-2 potency, at least one enzymatic and one cellular experiment using as reference known COX-2 inhibitors should be combined [32]. Four main *in vivo* assays are used: carrageenan-induced paw oedema assay([33-36], carrageenan-induced analgesia models in rats [26, 36, 37], adjuvant-induced arthritis model ([36, 38-40] and endotoxin –induced pyretic response in rats [30, 41]. These assays enable to quantify respectively the anti-inflammatory, the analgesic, the chronic anti-inflammatory and the antipyretic properties of compounds.

II COX-2 inhibitors: from 1900 to 2016

1. Classical NSAIDS agents (1900-1970)

Classical NSAIDs (Tables 1-8) were the first drugs marketed to reduce inflammation. They represent a structural heterogeneous class of compounds and can be classified into 7 groups [42]: (1) salicylates, (2) anthranilates (3) pyrazolinone derivatives, (4) arylacetic acids, (5) arylpropionic acids, (6) *para*-aminophenol derivatives, (7) acidic phenolic compounds (pyrazolidine-3, 5-diones, oxicams). These drugs bear a carboxylic acid function as common structural characteristic. They are non-selective drugs and share a common binding mode: the carboxylate moiety is involved in hydrogen bonds and/or ionic interactions with Arg 120 and Tyr 355.

Salicylates (Table 1): The major compound of salicylates group is acetylsalicylic acid (**1**), also known as aspirin, the first marketed drug to relieve pain and inflammation. This drug inactivates COX-1 and COX-2 by acetylation of the COX residue Ser 530. This covalent modification is more important (10-100 times) in COX-1 than in COX-2 [43]. Other members of the salicylates group are also marketed, such as ethenzamide (**2**), salicylamide (**3**) or diflunisal (**4**).

Anthranilates and pyrazolinone derivatives (Tables 2, 3): Two anthranilate compounds (niflumic (**5a**) and mefenamic (**6b**) acids) and one pyrazolinone compound (metamizol, **7**) are marketed drugs. However, the therapeutic use of anthranilates and pyrazolinone compounds has been largely reduced due to poor risk-benefit ratio ([20, 44]

Arylacetic acids (Tables 4, 5): These compounds are time- and concentration-dependent inhibitors of PGs synthesis [43]. Indomethacin (**11b**), its prodrug acemetacin (**11a**) [45] and diclofenac (**9b**) are marketed and widely used in anti-inflammation therapy. Indomethacin presents a time-dependent inhibition linked to its 2'-methyl group which binds into a small hydrophobic area formed by Val 349, Ala 527, Ser 530 and Leu 531. The 2'-des-methyl indomethacin analogue is a poor inhibitor of COX-2 [43]). Conversely, diclofenac adopts an inverted binding mode compared to other classical NSAIDs, in which the carboxylate part is involved in hydrogen bonds with Ser 530 and Tyr 385 of the COX-2 active site. Diclofenac also displays a better COX-2 selectivity than the other classical NSAIDs. [46]

Arylpropionic acids (Table 6): This group of compounds includes the commercial drugs (*S*)-ibuprofen (**16**), (*S*)-flurbiprofen (**15**) and (*S*)-naproxen (**18**). Despite their structural similarity, these compounds present different mechanisms of inhibition: single-step competitive, rapid and reversible inhibition; two-steps irreversible inhibition and slow, reversible; and weak inhibition respectively. [43]. (*R*)-stereoisomers are inactive since their 2'-methyl functions clashes with the Tyr 355 of the COX-2 active site [47].

Para-aminophenol derivatives (Table 7): Acetaminophen, also known as paracetamol (**21**), and its prodrug proparacetamol (**23**), are two main representatives of this group. Currently, the COX-2 binding potency remains unclear and controversial [48-51]. Paracetamol presents a very weak anti-inflammatory activity, and is rather used as an analgesic and antipyretic drug ([52]. However, its analogues are able to inhibit COX like phenidone, a preferential COX-1 inhibitor [53].

Acidic enolic compounds (pyrazolidine-3, 5-diones, oxicams) (Table 8): These compounds, including the commercially available and widely used piroxicam (**30**) and meloxicam (**32**), combine a thiazine ring and a carboxamide moiety and have several tautomers. Their binding mode, never seen with other NSAIDs, is characterized by hydrogen bonds between hydroxyl group of thiazine and carboxamide group and Ser 530 and Tyr 385 from one part and between nitrogen atom of the thiazine and carboxamide group and Arg-120 and Tyr-355 on the other part, both through two highly coordinated water molecules. The binding of oxicams induces changes in the protein conformation rarely observed in the NSAIDS class, with a rotation of the side chain of Leu 531 and opening of a new pocket [54]. The anti-inflammatory mechanism of action of piroxicam is still controversial [55], but meloxicam is proved to be a modest selective COX-2 inhibitor since its 4'-methyl group clash with the COX-1 Phe-518 due to I434V mutation [54].

The currently marketed classical NSAIDS are both COX-1 and COX-2 inhibitors, resulting in undesirable side effects, such as gastrointestinal disorder or bleeding. The research for new NSAIDS is currently focused on selective COX-2 inhibitors, supposed to display an improved tolerance profile.

2. COX-2 selective agents (1970-2016)

Analogues of classical NSAIDs: Numerous analogues of classical NSAIDs were synthesized with the aim to preserve or enhance their potency and to improve their selectivity. (Tables 9-19)

Salicylates Derivatives (Table 9): Numerous analogues of aspirin were developed; among them the substitution of the acetate group by a sulfonamide moiety increased the COX-2 selectivity by 1000- to 10000-fold (**33**).

Anthranilates and pyrazolinone derivatives (Table 10): The replacement of meclofenamic acid carboxylate group with amides enabled to increase the COX-2 selectivity by 900 to 1400-fold (**34**) [56]. Other compounds were complexed with metals and demonstrated potent and selective COX-2 inhibition [57]. Arylacetic acids (Tables 11, 12): Several analogues of indomethacin (**35**, **36**, **37**) displayed great potency and selectivity against COX-2. The indomethacin structure modifications included the synthesis of *ortho*-carbaborane derivatives (SI>152381, **37d**), replacing the Me (R₁) of the parent drug with a CF₃ group (SI > 375, **37a**) or the acid carboxylic moiety by large and complex substituents (SI up to 333000 and IC₅₀ = 0.3 nM for compounds **36r** and **36s**). SAR studies on the diclofenac scaffold (Tables 13, 14) indicate that the introduction of halogen atoms (Cl or F) enhance the selectivity. The same effect was observed with an alkyl group in *meta*-position on the phenyl bearing the COOH moiety [43] (**38**, **39**). Particularly, lumiracoxib (**38c**) exhibited a high COX-2 potency (IC₅₀ = 7 nM) and selectivity (SI> 1428) explained by its methyl group that enabled a better insertion in the COX-2 active site [43]. However, lumiracoxib was withdrawn from the market in several countries, according to severe liver side effects. Concerning etodolac derived compounds (Table 15), they have shown poor COX-2 selectivity (**40b**, SI>45) compared to his molecule parent (**40a**, SI = 142). Indeed, replacing the oxygene atom of etodolac by a methyl moiety drives to a decrease of COX-2 selectivity[42, 58]. Arylpropionic acids (Tables

16, 17): Flurbiprofen derivatives modified on the phenyl ring attached to the arylpropionic acid (**41**) presented enhanced COX-2 selectivity and inhibition potency. Some ketoprofen analogues (**42b-c**) displayed a strong enhancement of selectivity (COX-2 SI >1100) [59] by replacing the R₃ substituent (N₃ >> SO₂Me > NHCOMe). This can be explained by the insertion and stabilization of this 4-N₃Ph group into the COX-2 side pocket. Oxicams modified analogues (Table 18): (**44**) enhance COX-2 selectivity by >200-fold with IC₅₀ = 0.06 μM.

COX-2 selective agents with original structures

The chemical structures of this group of COX-2 inhibitors are significantly different to those of the classical NSAIDs, mainly due to the absence of the typical carboxylic group. Consequently, these new structures present binding mode in the COX-2 active site distinct to those observed with classical NSAIDs, mainly because of the absence of salt bridge between the carboxylic group and Arg 120 and Tyr 355 [42]. Therefore, the selectivity and the affinity of these new compounds for COX-2 are enhanced: these augmentations were mainly explained by their ability to reach the COX-2 additional pocket and establish interactions with its specific residues. [42, 60]

Methanesulfonanilide inhibitors (Sulides class, Table 20): This class of COX-2 inhibitors was developed from two potent and selective compounds: nimesulide (**46**) and NS-398 (**47**) (COX-2 SI of 25.64 and 164.3 respectively), designed by an isosteric replacement of the carboxylic acid group of NSAIDs by a sulfonamide group. The sulides inhibitors present three main features [32]: a substituent (R = methyl, trifluoromethyl...) on the sulfonyl group; an aryl, a cycloalkyl or even a heterocyclic ether or thioether on position 2; and an electron withdrawing group (EWG) (carboxy, nitro, trifluoromethyl groups...) on position 4. Improvement of the selectivity against COX-2 was obtained with flusulide (**51**) (SI = 263.15) and its thioether analogue **L-745,337** (**52**) [61, 62] leading to the synthesis of other

analogues such as ethylthiazolyl (**53**) or lactone (**54**) analogues (COX-2 SI >1000-2000). The EWG in position 4, particularly a cyano or an acetyl group [63], the acidic hydrogen of the sulfonamide and the carbonyl group of the indanone [61, 62] are essential for COX-2 activity. The acidic character of sulfonamides controls the COX-2 inhibition mechanism: sulfonamides having a pKa between 3 and 5 acted as competitive inhibitors while those having a pKa > 7 acted as reducing drugs enabling conversion of PGG₂ into PGH₂. Compounds with intermediates pKa (6.5-7) are mixed inhibitors [12, 64]. Sulides compounds present a time-dependent inhibition [65-67] and the binding in the COX-2 active site, with the methyl sulfonamide group stabilized in the COX-2 side pocket [43, 68], induced subtle conformational changes of the enzyme conformation, causing its inactivation [24, 69].

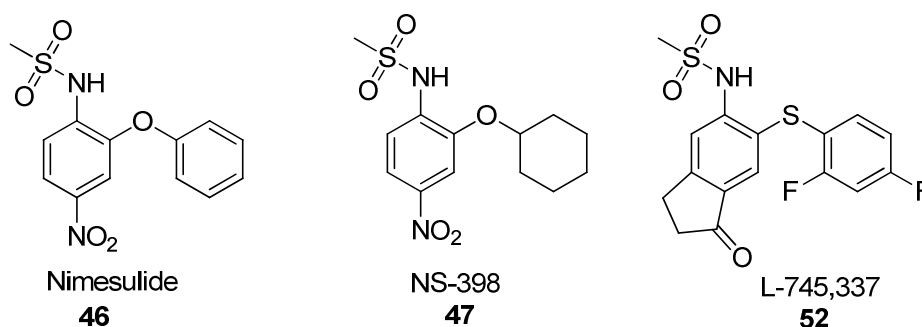


Figure 3: Some examples of methanesulfonanilide compounds.

Diaryl hetero/carbo-cyclic compounds: The first compounds of this diaryl-substituted heterocycles class, synthesized in the 1960's, were indoxole and oxaprozin. Extensive SAR studies [43] identified the main features responsible of COX-2 selective inhibition: a central ring surrounded by two phenyl groups that must be adjacent in the central scaffold and one of the phenyl rings bearing a 4-sulfonamido or a 4-methylsulfonyl group. The importance of this *para*-substitution is explained by the binding mode of these compounds in which the sulfonamido or 4-methylsulfonyl group is fitted into the COX-2 specific side pocket and stabilized by a hydrogen bonds network [43]. Between 1970 and 1980, a large number of

structures have been developed, differing in size and nature of the central ring [32] and most of these inhibitors display time-dependent inhibition.

Diaryl-substituted cycles with a central 4-membered ring

These COX-2 inhibitors present a cyclobutene (Table 21) as central ring with a phenyl or a 4-substituted phenyl (on one side, and a methylsulfonylphenyl on the other side). For the phenyl 4-substitution, alkyls, halogens, ketones, and ethene (**60**) or NOH (**62**) groups provide highly selective and potent COX-2 inhibitors (SI = 450 and 557.4 respectively, IC₅₀ COX-2=0.0012 and 0.061 respectively [70]). More recently, the azetidin (Table 22), a four-membered scaffold containing a nitrogen atom and a ketone moiety has been derivated with different groups displaying relatively good selectivity against COX-2 (**65**). SAR studies [71] indicate that large and lipophilic substituents on the nitrogen atom and *para*-substitution are favorable to the activity.

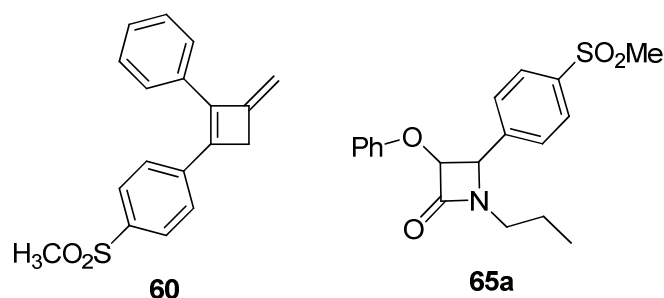


Figure 4: Some examples of cyclobutene (**60**) and azetidin (**65a**) derivatives compounds.

Diaryl-substituted cycles with a central 5-membered ring

Cyclopentenones (Tables 23-26) are characterized by a cyclopentene central ring, surrounded by a mono or di-substituted phenyl on one side and a methylsulfonylphenyl or a phenyl sulfonamide on the other side. This class of compounds includes several highly selective and potent COX-2 inhibitors such as **SC-57,566** (**66**) and its chloro analogue (**67**) (SI of 38461 and 33333 and IC₅₀ (COX-2) = 26 nM and 3 nM respectively). Spirocyclic compounds derivated on cyclopentene ring (Table 24, **70-73**), cyclopentenone (Table 25, **74**, **75**) and benzene fused on cyclopentene ring substituted by a methylsulphonylphenyl (Table 26, **76**)

display great inhibitory potency and selectivity against COX-2 (SI >600 to 25000 and IC₅₀ = 4-62 nM). Cyclopentene spirocyclic compounds with n superior to 2 are associated with a decreased selectivity and potency [32, 72-74]. (see Table 24).

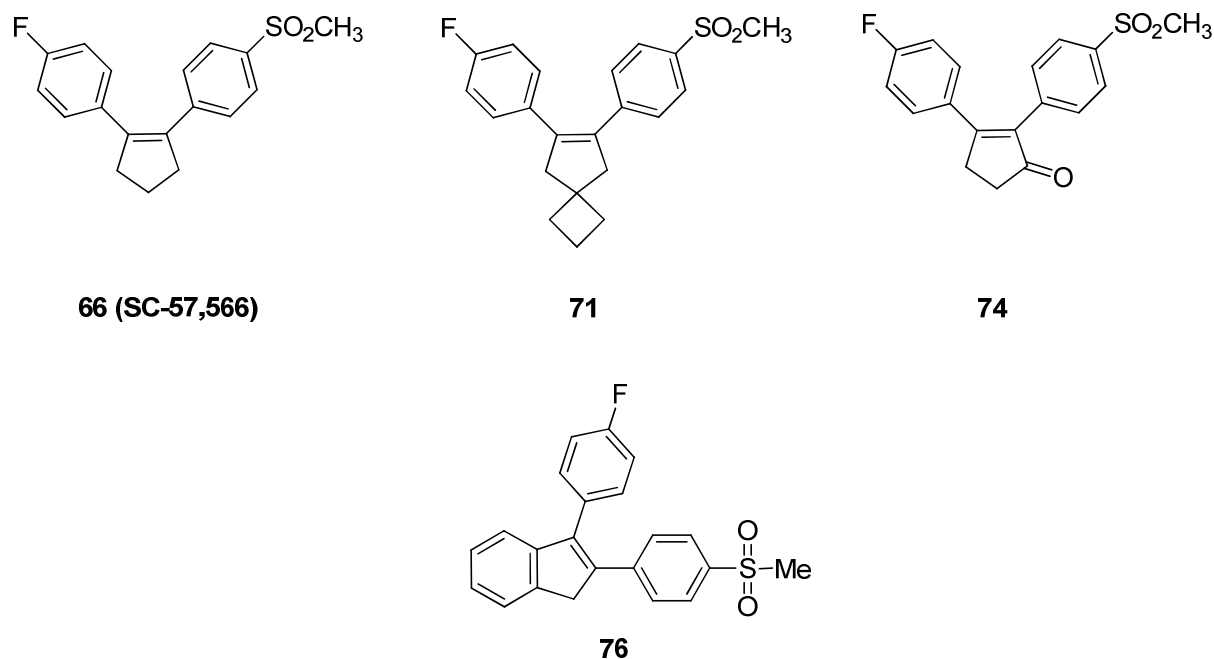


Figure 5: Some examples of cyclobutene (**66**, **71**, **76**) and cyclopentenone (**74**) derivatives compounds

Thiophenes (Tables 27, 28) are mainly substituted in position 4 and 5 of the central ring but others substitutions have also been studied (3,4; 2,4; 2,5; 2,4,5) [32] [75-77]. This group is led by DuP 697 (**78**) (SI = 120, IC₅₀ = 5 nM) bearing a 4-SO₂MePh (R₄), a 4-FPh (R₅) and a bromine (R₂). Increased selectivity could be obtained by replacing the bromine by an hydrogen (SI >400, IC₅₀ = 0.25 μM, **79**) or by fusing the thiophene with cycle ring display (SI = 627, IC₅₀ (COX-2) = 30 nM, **88**). 2,4- and 2,5- disubstituted compounds are less potent than 2,3 and 3,4- disubstituted products [58]. For 3, 4-diarylthiophene derivatives, 4-amino or 4-methyl sulphonyl group is required for selectivity and replacement of 4-fluoro group by 4-OMe or 4-SMe group reverses the selectivity in favor of COX-1 [78]. Recently, benzothiophenes substituted by combination of bromine and benzoyl groups (**91**) and

dithiolethiones (Table 29) substituted by alkyl groups (**92**) were synthesized and displayed a micromolar activity on COX-2 and a very poor COX-1 inhibition potency [79].

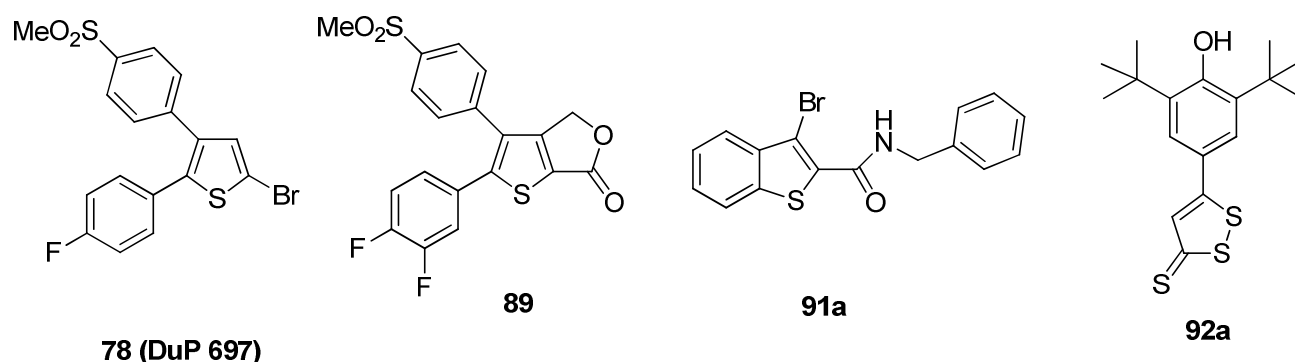


Figure 6: Some examples of thiophene (**78**, **88**, **91a**, **92a**) derivatives compounds

Furans and furanones (Tables 30, 31-33): The 3, 4-diaryl-substituted furans derivatives are less active than their thiophene analogues. However, some furanones present an interesting potency on COX-2, such as the rofecoxib (**96**), a member of the coxibs family and time dependent irreversible COX-2 selective inhibitor (**96**, SI >750). Rofecoxib is substituted by a Ph (R_3) and a 4-SO₂MePh (R_5) and was marketed during 5 years before being withdrawn for cardiovascular safety concerns. SAR studies demonstrated that di-substitution of rofecoxib at position 5 with alkyl, alkoxy or cycloalkoxy groups lead to compounds more stable after metabolizations with metabolites preserving the potency and selectivity against COX-2 [58]. **DFU (98)** and **UR-8962 (105)** are highly selective and potent compounds (SI >1000 and 4546, IC₅₀ (COX-2) = 41 μM and 22 nM respectively) and were used together with rofecoxib to synthesize new analogues (**122**, **368**, **369**). The most potent and selective compound was obtained by introducing a 4-OAc moiety to the phenyl adjacent to the 4-SO₂MePh in the rofecoxib scaffold (**368f**, IC₅₀ = 1.26 nM, SI = 79865). According to the nature of R_2 and R_3 groups, furanones and benzofuranones compounds display poor to strong COX-2 inhibition (0-25% at 10 μM). Some furanones and benzofuranones derived by alkenes give very poor

COX-2 inhibitory (SI = 20, **116-121** and **123a**) whereas benzofuranones containing pyrazole scaffold possess a 100 fold COX-2 selectivity (**123b-c**).

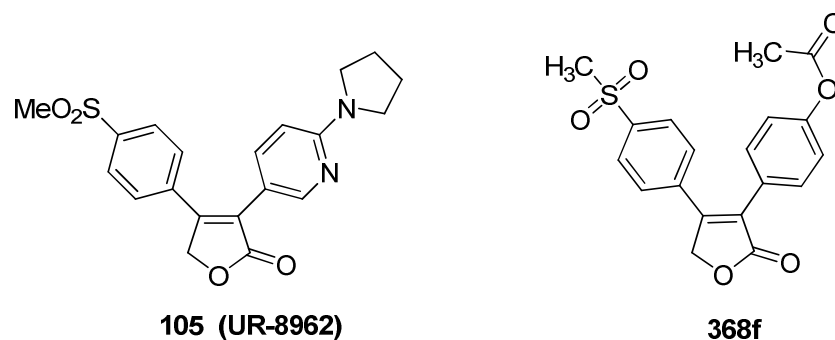


Figure 7: Some examples of furanones (**105**) derivatives and Rofecoxib analogue (**368f**)

Pyrroles (Tables 34-39) can present very high selectivity and inhibition potency against COX-2 (SI >1000-6666, IC₅₀ = 5 μM-16 nM (**125**, **127**, **134**, **138**, **142**, **147a-e**)). Minor modifications on size and/or the nature of R₁ groups bore by the *N*-aromatic ring can dramatically affect the selectivity against COX-2 (R₁ = trifluorophenyl, SI >10000 (**133**)). Tetrasubstituted pyrroles are the most potent compounds [32], a EWG in position 5 enhancing the potency against COX-2 [78]. **Zomepirac** (**144** SI = 0.15, IC₅₀ = 2 μM), a former commercial drug, inspired the synthesis of numerous analogues, notably by replacing the COOH moiety by a pyridazin-3-one (**148**, SI = 1667, IC₅₀ = 0.6 μM). In 2008, Biava et al. [80] developed a series of compounds (**147b-e**) exhibiting high potency and selectivity against COX-2 (SI = 900-6600, IC₅₀ (COX-2) >0.015-0.040 μM) with an ether group acting as the COOH function of classical NSAIDs. Pyrroles compounds with fused indole ring and bearing a 4-SO₂NH₂Ph or 4-SO₂MePh moiety are also highly selective COX-2 inhibitor (SI >30000-1.6.10⁶, IC₅₀: 0.006-0.3 nM) (**152**, **153**, **159,160**, **162**). SAR studies indicate that replacing the indole N-H hydrogen by a methyl leads to a decreased COX-2 selectivity [81] (**164-166**). More recently, pyrroles derivated by acid, amide or ester functions (**36a-e**) were synthesized with high selectivity and potency [82]. The highly COX-2 potency and selectivity of ester derivatives are explained by the hydrogen bonds and hydrophobic interaction between

the ester function and the binding site [83]. Additionally, esters derivatives containing hydroxyl or NO₂ groups increase the ability to create several intramolecular and intermolecular hydrogen bonds to enhance compounds stability and thus their COX-2 selectivity and inhibition potency (SI >700-4000, **149k-n**). Pyrrole-2-ones (**167a-c**) and even more pyrrole-2,5-diones (**168a-h**) compounds display strong COX-2 selectivity (SI >100-1000) [84-87]. Taking into account the differences in binding site volume, series of indoles containing larger substituents (SI = 1000-5000 (**158h-l, n**)), pyrroles and pyrrolidines fused with heterocyclic ring system (SI >100-200, **169**) were synthesized and presented high COX-2 selectivity.

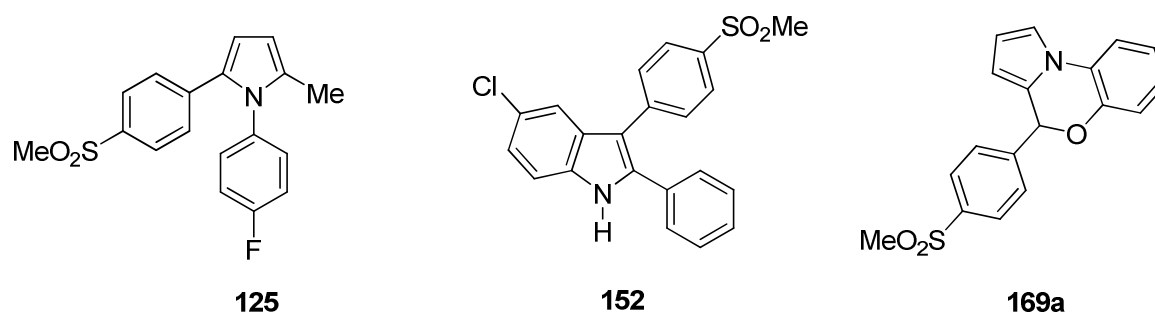


Figure 8: Some examples of pyrroles derivatives compounds (**125, 152, 169a**)

Pyrazoles (Tables 40-43): The first potent COX-2 inhibitor with a pyrazole ring was the **SC-58125 (171)**. To avoid SC-58125 metabolic concerns, the 4-fluoro-phenyl group was replaced by a 4-methyl substituent, providing the celecoxib (**172**, SI = 325, IC₅₀ (COX-2) = 0.04 μM) [32], a drug currently marketed to treat pain and inflammation mainly in rheumatic affection. Celecoxib displays a three-step mechanism for the inhibition of COX-2 in which the third step is responsible for the selectivity against COX-2 by the formation of a tightly bound between the enzyme and the drug [43]. The sulfonamide moiety of celecoxib is stabilized in the COX-2 specific additional pocket by electrostatic interactions with Asn 192, Leu 352 and Arg 513 [88]. The remaining structure interacts through Van der Waals contacts with the binding site

[88, 89] and an electrostatic interaction between the nitrogen atom of the pyrazole ring and the Arg 120 (Figure 9). Another interesting compound of this family is **SC-558 (173)**, SI = 1903, IC₅₀ = 9.3 nM). Pyrazoles compounds with phenylsulfonamide and CF₃ groups display great selectivity against COX-2 (**175, 180, 191, 193-196**, SI >1000, IC₅₀ = 3.7-84 nM). Other compounds present a 4-FPh substituent and a 4-SO₂CH₃Ph group rather than a 4-SO₂NH₂Ph group (**198, 199**, SI = 10000, IC₅₀ = 0.10 μM and 41 nM respectively). Additionally, pyrazole fused with aromatic ring also display great COX-2 selectivity, particularly when this aromatic ring is a pyridine (**202**, SI = 33333, IC₅₀ = 3 nM). More recently, pyrazole derivatives with large bulkier groups were elaborated and reached great COX-2 selectivity (**200j** and **m**, SI = 450, 1350 respectively) and the substitution with groups favoring hydrogen bonds: 4-SO₂MePh, -(CH₂)₂-ONO₂ and -CH₂OH (**200 q-r**) was favorable to the activity. Associated with heterocycle ring system, compounds display interesting COX-2 inhibitory potency (SI >500, **207c**) thanks to the oxygen atom that makes hydrogen bonds at COX-2 active site. Pyrazolone derivatives (**208**, SI >100-400, Table 44) and pyrazoline compounds (**209d-e**, % inhibition at 100 μM: 83.69% and 88.43% respectively, Table 45) are also potent COX-2 selective inhibitors [90-92].

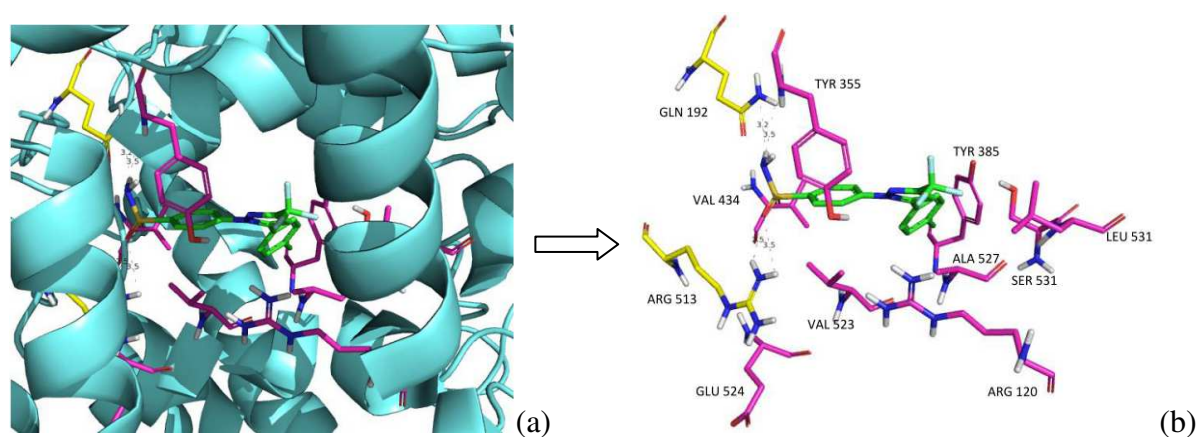


Figure 9 : (a) Celecoxib (green) inserts in the COX-2 active site (cyan). (b) Main interactions between celecoxib and hydrophobic residues (pink) and residues making hydrogen bonds (yellow).(adapted [43]).

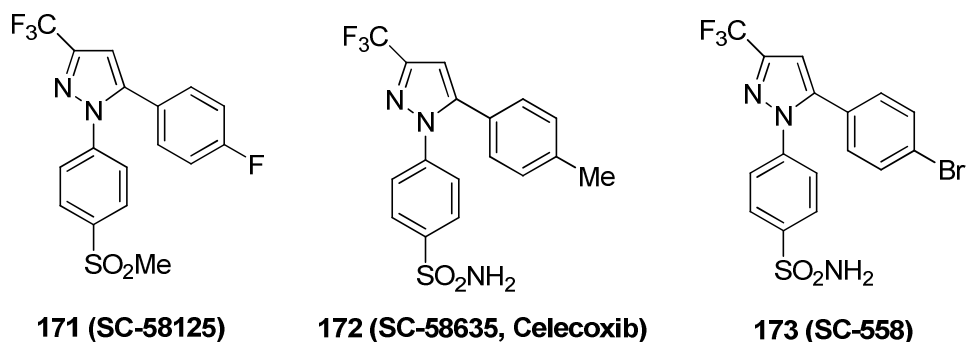


Figure 10: Some examples of pyrazoles derivatives compounds (**171**, **172**, **173**)

Imidazoles (Tables 46-48) derivatives display great up to 8000 fold COX-2 selectivity (**211**, **224**, **230**, SI > 8000, IC₅₀ = 0.08-0.12 μM). These molecules are substituted in R₄ by a halogenated group (CF₃ or a Cl) and in R₁ by a 4-NH₂SO₂Ph or a 4-CH₃SO₂Ph group, essential for the COX-2 selectivity [93]. Electrophilicity and hydrophobic properties of substituents also play a role in the COX-2 selectivity. For 4,5 diarylimidazoles family, R₄ substitutions with SO₂NH₂ or 4-SO₂N₃ or EWG (NO₂, COOH) are associated with the best results in COX-2 inhibition [94]. For both R₄ and R₅, if the substituent is a phenyl, small hydrophobic and electronegative groups introduced in *para* position increase the selectivity while electropositive group in R₂ (SO₂-alkyl > SO-alkyl > S-alkyl) is required for inhibitory potency. Imidazoles compounds fused with aromatic rings (Table 48) also display good selectivity (**241**, **242**, SI > 625, 715 IC₅₀ = 0.16, 0.14 respectively). Recently, imidazoles derivatives substituted on one of the two nitrogen atoms of the central scaffold displayed good COX-2 selectivity (SI: 100-200, **237**). The same range of selectivity is observed when imidazole is fused with benzene or non-aromatic rings (**238-240**). Inversely, 1,2-disubstituted imidazoles are poor COX-2 inhibitors [95].(Tables 47, 48)

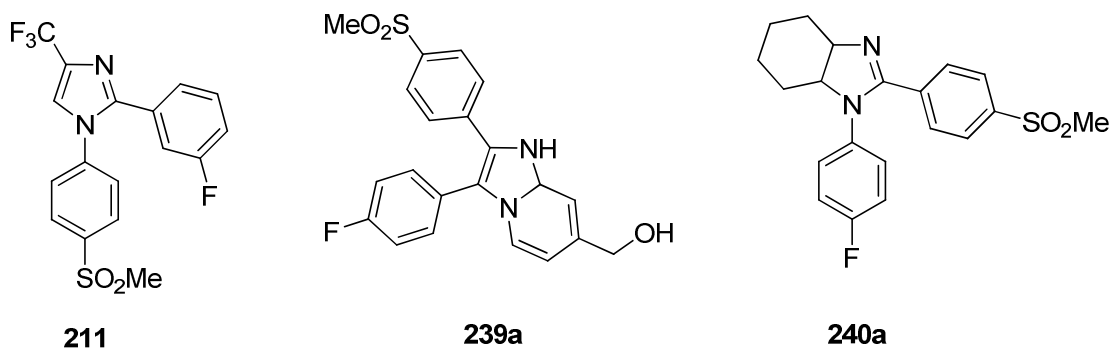


Figure 11: Some examples of imidazoles derivatives compounds (**211**, **239a**, **240a**)

Triazoles compounds (Tables 49-51) COX-2 inhibitory potency and selectivity are mainly dependent of the size and the nature of substituents attached in C-3 and C-4: thiol groups ($\text{SH} > \text{SMe} > \text{SEt}$) and moieties with electronic properties increase the COX-2 selectivity. The most selective compounds are fused with thiazole rings ($\text{SI} > 1600-4300$, $\text{IC}_{50} = 6-20 \text{ nM}$ (**248a-e**)). Recently, new compounds with high COX-2 selectivity ($\text{SI} > 1000-2000$ (**243c-f**)) were obtained, bearing 4- $\text{NH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ and amide groups essential for the activity. Triazole-5(*4H*)-thione derivatives were evaluated but displayed a poor COX-2 selectivity ($\text{SI} > 4$, **246**). [96-98]

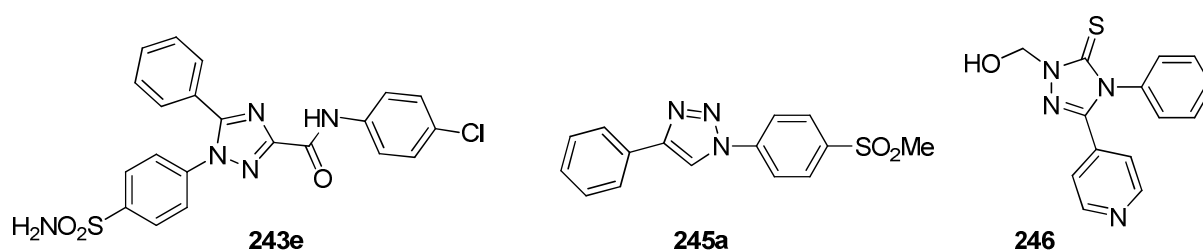


Figure 12: Some examples of triazoles derivatives compounds (**243e**, **245a**, **246**)

Tetrazoles (Table 52) compounds (**249a et d**) possess only weak COX-2 inhibition potency ($\text{IC}_{50} (\text{COX-2}) > 30 \mu\text{M}$) justifying the lack of interest for this class of compounds. More recently, tetrazoles with a 200-fold COX-2 selectivity were synthesized (**249b, c**) by introducing a mono-substitution in *para* position of the phenyl group. [99, 100]

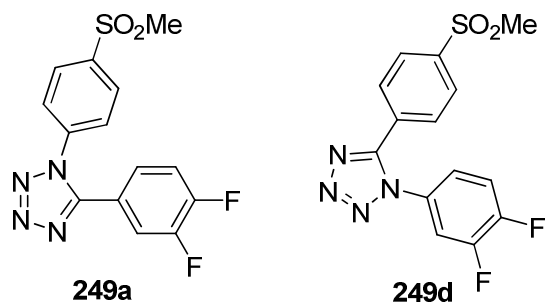


Figure 13: Some examples of tetrazoles derivatives compounds (**249a**, **249d**)

Oxazoles (Tables 53-55) compounds were inspired by Oxaprozin (**250**) [101, 102]. Oxazoles, isoxazoles and oxazolines derivatives (Table 53) possess the stronger COX-2 selectivity with a SI reaching 10000-64500 (**251n**, **252b**, **253a** $IC_{50} = 4\text{nM}-97\text{nM}$) for the most selective. Valdecoxib (**252b**, SI = 28000, $IC_{50} = 5\text{ nM}$) and its prodrug Parecoxib (**252c**), a commercially available drug, are potent and selective COX-2 inhibitors. Regioisomers of these two compounds display better selectivity against COX-2 (**252e** and **252f** SI $>10^5$ and 1113) [103]. The position 2 of the oxazole ring can support a large variety of substituent without altering the selectivity for COX-2 [78]. Replacing 4-SO₂MePh or 4-SO₂NH₂Ph by a cyclohexyl substituent lead to JTE-522 (**251e**, SI >1176 , $IC_{50} = 85\text{ nM}$) [58, 104] [105, 106]. Oxazol-2-one, 1,3-dioxol-2-one and 1,2,5-oxadiazole derivatives compounds (Table 54) are also selective COX-2 inhibitors (**254**, **255**, **257** SI <100 , $IC_{50} = 0.06$ to $>30\mu\text{M}$). SAR studies [107] demonstrated that a *para*- SO₂MePh or a *para*- SO₂NH₂Ph attached to C-3 or C-4 on the central ring is essential for COX-2 selectivity, while unsubstituted C-3 or C-4 positions giving selective COX-1 inhibitors. Recent isoxazoles (Table 53) and oxadiazoles (Table 55) derivatives display quite COX-2 selectivity (SI >100 , **252h-j**, **256a-j**). For isoxazole scaffold, small groups in R₃ (CH₃, CF₃...) instead of hydrogen bond donor or acceptor groups enhance strongly the COX-2 potency and selectivity (SI >10000 , $IC_{50} = 6\text{ nM}$ **252j**).

Benzoxazoles derivatives compounds (Table 56) substituted by larger substituents, such as isoxazoles, thiazoles, display good COX-2 selectivity (SI $>300-500$, **258g-i**, **k-l**). Others

compounds, substituted by diaryl groups (258 c and d) have been synthesized but they have displayed a lower COX-2 selectivity (COX-2 SI <100)

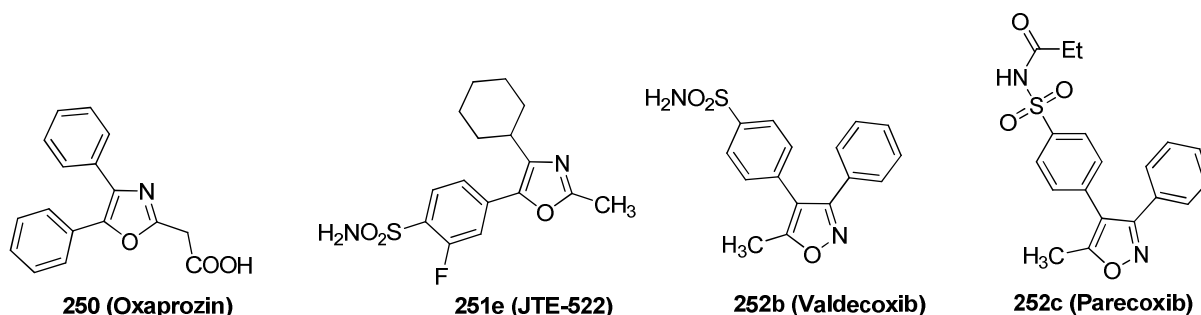


Figure 14: Some examples of oxazoles derivatives compounds (**250**, **251e**, **252b**, **252c**)

Thiazoles, isothiazoles, 1,2,3-thiadiazoles, dithiolethiones, and thiazolidinones derivatives

(Tables 57-58) display great COX-2 inhibition and selectivity with a SI reaching 10000 (**259s**, **t**) whereas thioimidazolinones display interesting inhibition but weak selectivity (**265c**). Compounds presenting aromatic rings fused with thiazoles and diathiazoles (Table 59) show important COX-2 selectivity: (SI >3000-4000 and $IC_{50} < 20$ nM, **266a-e**). Thiazolones series with benzylidene substituents display weak potency against COX-2 [108]. Recently it has been shown that oxazolidinones substituted by triazoles ring system and thiazolidines derivatives compounds (Table 60) present good COX-2 inhibitory potency and selectivity (SI >300-500, $IC_{50}(\text{COX-2}) \leq 5.6$ μM , **267a-h** except for **267d** the % inhibition at 10 μM is 70.14%).

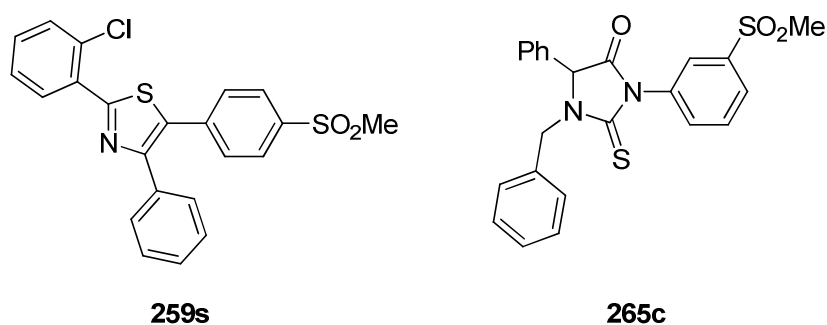


Figure 15: Some examples of thiazoles (**259s**) and thioimidazolines (**265c**) derivatives compounds.

Hydantoin derivatives (Table 61) bearing a methylsulfonyl function at the para position of the phenyl ring have been described as interesting COX-2 inhibitors. *In vitro* COX-1/COX-2 inhibition studies indicated that hydantoin compounds were selective inhibitors of the COX-2 with IC₅₀ values in the highly potent 0.077 to 0.171 μ M range, and COX-2 SI in the 70.2 to > 1298 range (**268a-d**). These results also revealed the effect of different alkyl substituents at the N-3 hydantoin ring. A modeling study showed that the most stable enzyme-ligand complex of unsubstituted compound was not docked into the active site of COX-1 justifying the high COX-2 inhibitory activity and selectivity. [109]

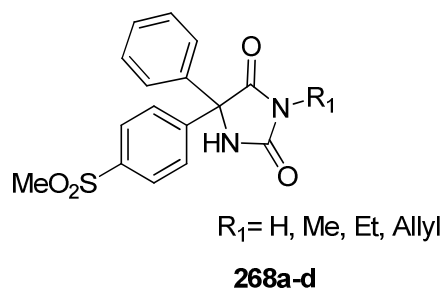


Figure 16: Example of hydantoin derivative compound (**268a**).

Diaryl-substituted cycles with a central 6-membered ring

Benzenes derivatives (Tables 62) substituted in R₁ by a 4-SO₂MePh or a 4-SO₂NH₂Ph and in R₃ and R₄ by halogens, in particular fluorine, are associated with potent and selective COX-2 inhibition (SI >7000-20000, IC₅₀ <15 nM, **269i**, **269l-s**). For naphthalene derivatives (Tables 63) substituted by a SO₂Me in R₄ and by a phenyl in R₂, lipophilicity and large *ortho*-substituent on the R₂-phenyl ring are critical for COX-2 activity while hydrophobic substituents are essential for COX-2 selectivity [110]. Recent benzene, naphthalene (**270**), benzoyl (**271**) derivatives compounds (Tables 63, 64) were developed by incorporating sulfonamides with mono-substituted phenyl (**269t-u**), alkene groups (*trans* stereoisomer, **269v-w**), or pyridine moiety (**271e**). Those compounds failed to ameliorate the COX-2 selectivity (SI = 100-200) [111-113].

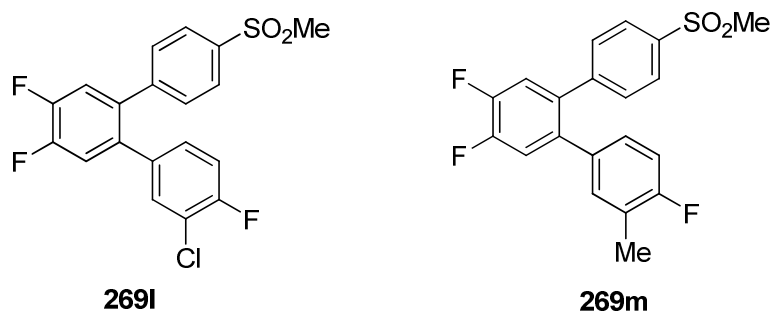


Figure 17: Some examples of benzene derivatives compounds (**269l**, **269m**).

Pyridines family (Table 65) is led by the marketed drug etoricoxib, metabolized (**272 d-g**) in less potent and selective structures. SAR studies reveal that a wide range of substituents can be attached to the pyridine ring leading to selective COX-2 inhibitors (SI >800-1100, **272 q-s**). Bulkier and larger substituents were added to pyridines and pyridinone derivatives (Table 66), but the resulting compounds have proven to be poor COX-2 selective inhibitors (SI: 20, **272t-ab**, **273**). Quinolines (SI >300-1200, **274**) and tetrahydroquinolinone (SI = 62.3; 97.6, **275 a and b**) derivatives (Table 67) present good COX-2 selectivity. The most potent compounds (SI >100-514, $IC_{50} < 25 \mu M$, **274h-k**) present a COOH moiety and thus a similar binding mode than classical NSAIDs. The COX-2 selectivity varies according to the position of the substituent in the central scaffold (**274c-d**, **275a-b**). More recently, new pyridazinone derivatives (Table 68) bearing various ring systems such as isoxazoles or triazole-5(4H)-thiones (SI = 10-333, **276a-c**) were designed without gain in COX-2 selectivity and inhibition potency. [114].

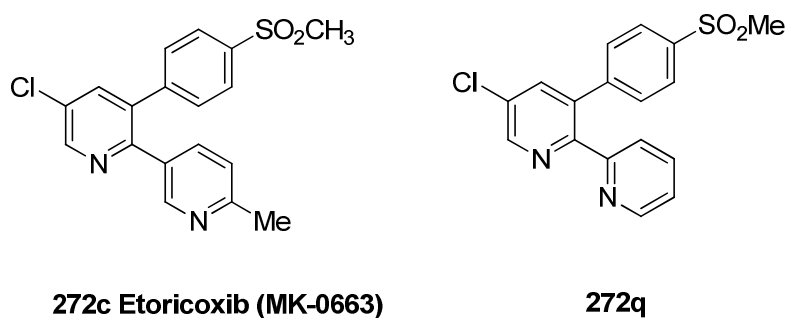


Figure 18: Some examples of pyridines derivatives compounds (**272c**, **272q**)

Pyrazines, pyridazinones and quinolaxines derivatives (Tables 69-70) display good (SI <300) to great selectivity against COX-2 (SI >500-3333, **279a, b, f**). Most of these structures contain a 4-SO₂MePh or a 4-SO₂NH₂Ph substituent. For the pyrazine scaffold, a 4-FPh (**278a**) increases the selectivity by 2 fold compared to a methyl analogue (**278b**), and the IC₅₀ by 8 fold. For the pyridazinone derivatives (**279**), the best compound is substituted by a 1-methoxy-cyclopropane in R₂ and a benzyl in R₃ (SI >33333, IC₅₀ (COX-2) = 3 nM, **279a**), whereas replacing the R₂ by a methoxypropane (**279b**) decreases the selectivity and the COX-2 inhibition potency. The quinolaxines (**280**) describe good COX-2 selectivity (SI <100) but poor COX-2 potency (IC₅₀ ~ 40 μM). [115, 116]

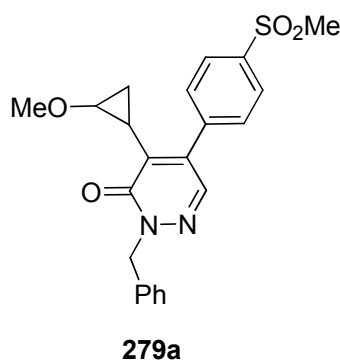


Figure 19: Example of pyridazinone derivatives (**279a**).

Pyrimidines (Table 71) compounds can present a very high COX-2 selectivity (>400000 (**281g, i**). SAR studies suggested that an electron donating group (-OMe, -OEt) at R₂ position increases the potency better than an EWG (**281r-t** IC₅₀ = 0.3-0.4 nM) and that CH₃SO₂Ph (R₄) gives better selectivity than other sulfonyl moieties [117]. Molecules with 4- CH₃SO₂Ph (R₄) group associated with a benzylamine moiety (R₁) exhibit the higher COX-2 selectivity (**281g, i**). Recently it has been shown that pyrimidines derivatives compounds bearing 4-SO₂MePh and CF₃ groups are highly selective against COX-2 (SI >1000-350000, **281w-ay**) [118].

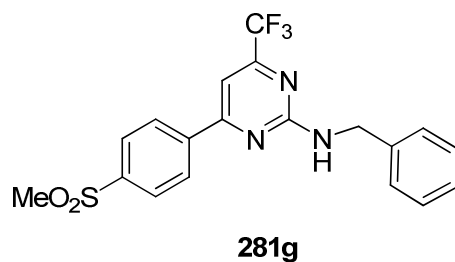


Figure 20: One example of pyrimidines derivatives (**281g**).

Pyrimidinones derivatives (Table 72) and pyrimidines or pyrimidinone fused with aromatic rings (Table 73) are poor COX-2 selective inhibitors (**282a-c**, **285**) [119-121], nevertheless certain compounds display good COX-2 selectivity (SI = 400-600, **286a-b**). The substitution of these groups by an amide or a smaller group such as H, Me decreases dramatically the COX-2 selectivity (SI= 2-4.35, **282**, **283**).

Pyrans derivatives (Table 74) can display great potency with SI value superior 120000 for the most selective compound (**288c**, IC₅₀ = 3.2 nM). SAR study [122] specify that R₃ substituents such as alkyl-, alkoxy-, alkylthio- or *para*-substituted phenyl orientate the central pyranone ring close to the COX-2 selective side pocket and are thus critical for COX-2 inhibition potency and selectivity.

Recently, chiral pyrans (Table 75, SI > 1000-41000, **289**, **290**) and benzofurans substituted by the combination of -COOH and CF₃ (Table 76, SI >1000-4700, **291a**, **c-f**, **k**, **l**, and **o**) demonstrate an enhanced COX-2 selectivity, whereas coumarins (Table 77) substituted by pyrazole scaffold display a weak COX-2 selectivity (SI < 20, **292**). [89, 118, 123, 124-127]

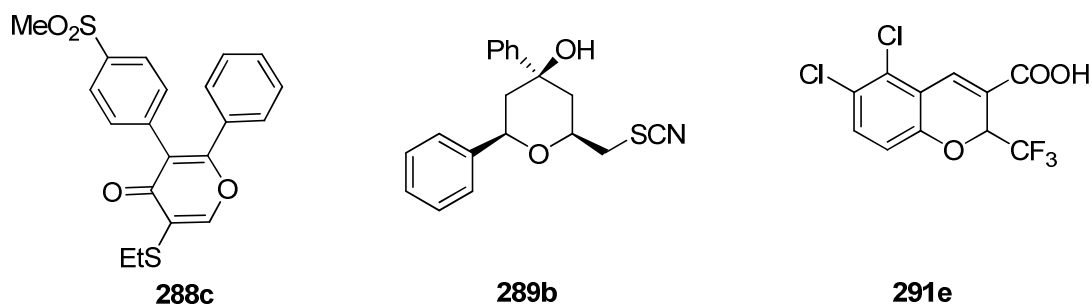


Figure 21: Some examples of pyrans derivatives (**288c**, **289b**, **291e**)

Thiazinanones compounds (Table 78-79) display average COX-2 inhibition and selectivity ($IC_{50} = 0.05-0.08 \mu M$, $SI >100-200$, **293a-c**, **294a-d**). Recent thiazinanones and benzothiazinanones derivatives exhibit similar COX-2 selectivity ($SI >200$, **293d**, **294a-b**) than the former member of this series. [118, 128, 129]

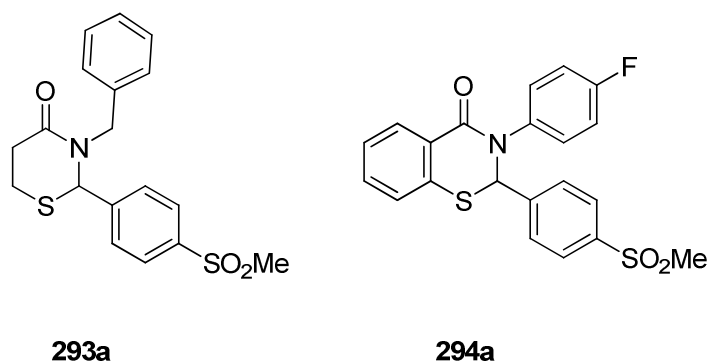


Figure 22: Some examples of thiazinanones (**293a**) and benzothiazinanones derivatives (**294a**).

1,2 diarylethenes and 1,1,2-triarylethenes compounds (Tables 80, 81) forming the stilbenes family were inspired from the natural product resveratrol (**295a**) a selective COX-1 inhibitor [115]. Various analogues were designed to enhance the COX-2 inhibition and decrease the COX-1 potency. 1,2 diarylethenes derivatives (*trans*-stilbenes) exhibit good inhibition and selectivity against COX-2 ($SI >400-700$, $IC_{50} = 1-11 \text{ nM}$, **295b,c**). Acyclic diaryl (*E*)-olefins are also potent inhibitors of COX-2 and their selectivity is dependent of the size and length of acyclic substituent attached to C-2 position [130]. 1, 1, 2- triarylethenes derivatives (*trans*- and *cis*- stilbenes), synthesized by analogy with the tamoxifen (**297a**) exhibit greater COX-2 selectivity ($SI >7000$, $IC_{50} = 14 \text{ nM}$, **298a,d**) than 1,2 diarylethenes compounds. Acyclic substituents play a key role in the COX-2 inhibition (**298a** with *n*Bu substituent) for these compounds [131].

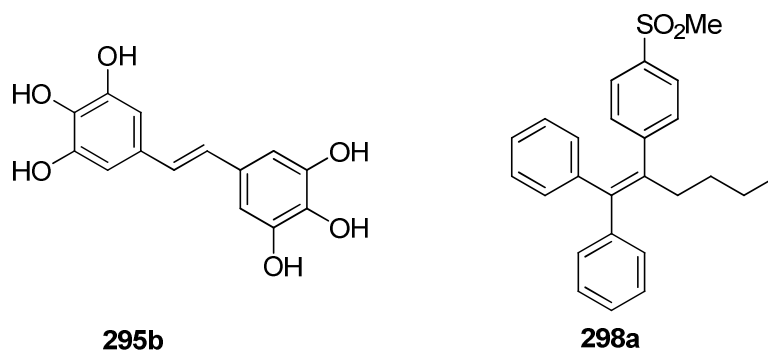


Figure 23: Examples of 1,2 diarylethenes (**295b**) and 1,1,2-triarylethenes derivatives (**298a**).

Di-*tert*-butylphenol compounds (Table 82) present a quite good COX-2 inhibition and selectivity ($IC_{50} = 140$ and 64 nM for **299d**, **g**, **i** with SI >700). The phenolic OH group surrounded by *tert*-butyl substituents is essential for COX-2 selectivity. Many of these compounds inhibit both COX and lipoxygenase (LOX) active sites, such as **Darbufelone** (**299a**) and **BF-389** (**299b**) but their COX-2 mechanism of inhibition remains unsolved [132].

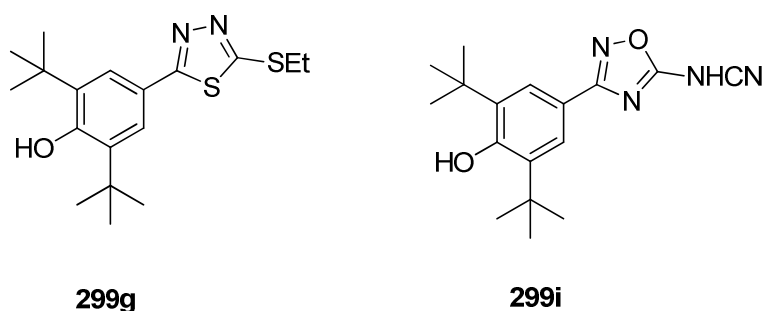


Figure 24: Some examples of di-*tert*-butylphenols derivatives (**299g** and **299i**).

Triazines and benzotriazinones (Table 83) are recent compounds, with a poor to good COX-2 selectivity (SI >5-400, **300**, **301**). [133, 134]

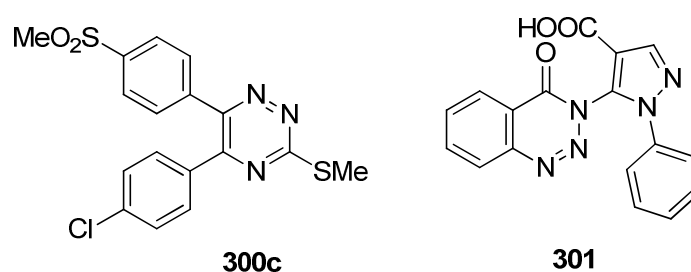


Figure 25: Some examples of triazines and benzotriazinones derivatives (**300c** and **301**).

Piperidine derivatives (Table 84) were recently synthesized and compounds exhibit quite good COX-2 selectivity (SI > 100, **302**). The substitution of the central scaffold nitrogen atom by large groups promote hydrogen bonds and to prevent the insertion in COX-1 binding site. [135]

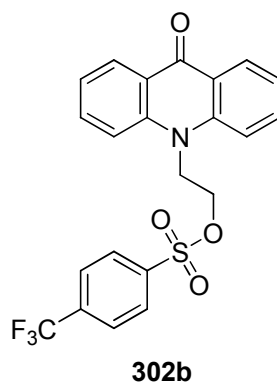


Figure 26: One example of piperidinone derivative (**302b**).

Diaryl-substituted cycles with a central acetylene (Table 85)

COX-2 inhibitors display quite good COX-2 inhibition and selectivity (SI >100-300, IC₅₀ = 0.89 μM-50 nM, **303**). Compounds substituted in R₂ with 4-MeSO₂Ph are selective COX-2 inhibitors whereas the 3-MeSO₂Ph and 2-MeSO₂Ph substituents lead to respectively mixed COX inhibitors and selective COX-1 inhibitors. Similarly, for the R₁ substitution, the best selectivity is obtained with 3-SO₂NH₂Phe group, and the worst with 4-SO₂NH₂Phe. [136].

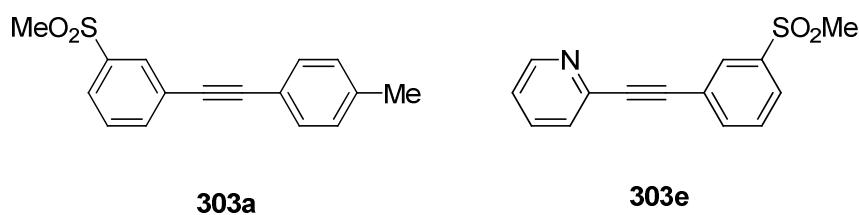


Figure 27: Examples of acetylenes derivatives (**303a** and **303e**).

Others compounds

Chromene compounds (Tables 86, 87) can exhibit high selectivity and inhibition potency against COX-2 (SI >1000, IC₅₀ = 40-110 nM, **304e,f,k**), and chromen-4-one derivatives present good COX-2 inhibition *in vivo* (**305f** 0.03 μg/mL). Recently, new chromene

compounds were elaborated with larger substituents such as cyclooctane or mono-substitution of phenyl introduced in α -position of the chromenes ketone and presented poor COX-2 selectivity (SI >2-60, **305a, e**). Additionally, smaller groups (H, Me) introduced in R₄ display good COX-2 selectivity (SI >200-600, **305b,d**)

Chalcone derivatives (Table 88), display weaker COX-2 potency (SI >100, IC₅₀ <1 μ M, **306h,j**). The potency and selectivity of these compounds are mainly explained by the insertion of 4-MeSO₂Ph into the COX-2 secondary pocket. For chalcone derivatives the alkene *trans* stereochemistry controls the optimal insertion and binding of the compounds into the COX-2 active site [137]. New chalcone derivatives with the phenyl substituted by a piperidyl moiety associated with halogens incorporated on the other phenyl display interesting COX-2 selectivity (**306 d,f,g**). [138]

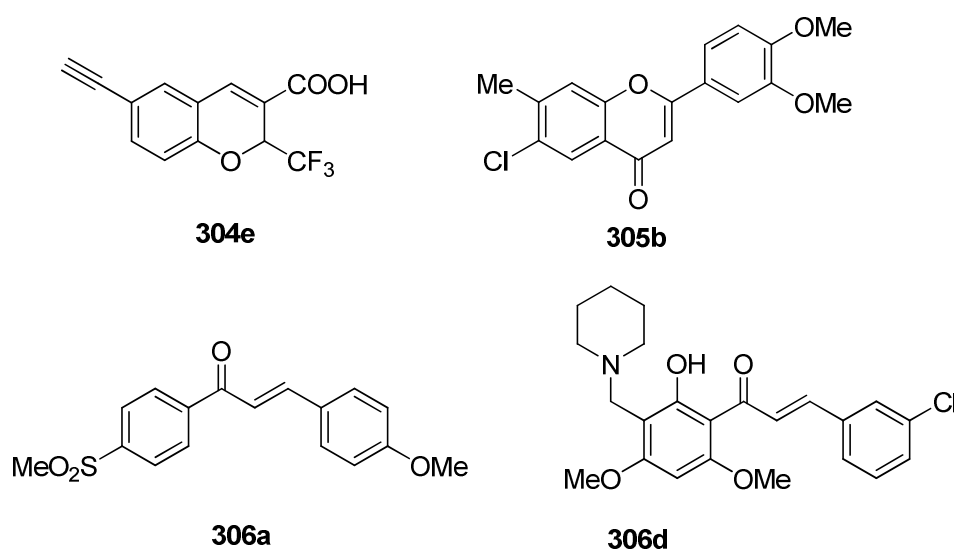


Figure 28: Examples of chromenes (**304e** and **305b**) and chalcones derivatives (**306a,d**).

Heteroalkenes (Table 89) are recent and original structures, but the currently compounds of this family show poor COX-2 selectivity (SI > 5-100, **307, 308**). [118, 139-141]

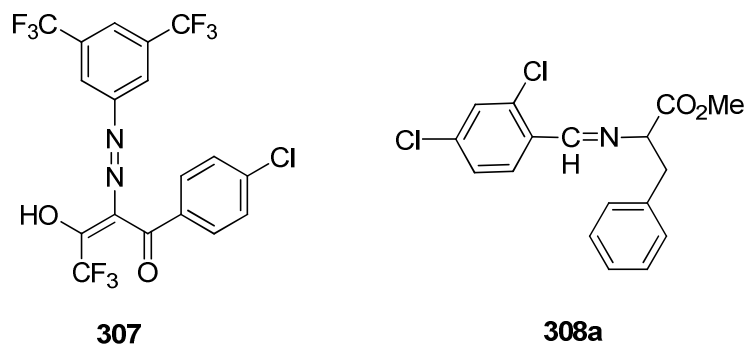
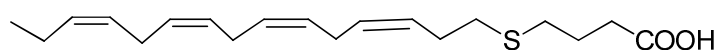


Figure 29: Examples of heteroalkenes derivatives (**307** and **308a**)

Natural compounds (Tables 90, 91) are the starting point in the development of new potent COX-2 selective inhibitors since the National Cancer Institute [142] tested for COX inhibition the 6% of the marketed drug that are natural products. These natural compounds exhibit a great variety of structures: alkaloids, terpenoids, stilbenes, flavonoids, chalcones, phenolic derivatives and most of them are specifically selective COX-1 inhibitors and show poor selectivity against COX-2.

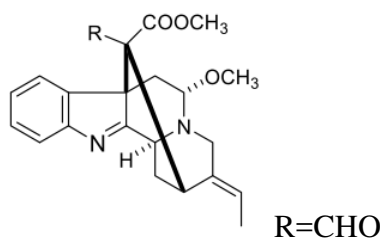
Fatty acids extracted from natural compounds (Table 92) such as 5-thia-8, 11, 14, 17-eicosatetraenoic acid (**348**) show some inhibitory against COX-2 (SI = 6.7, IC₅₀ = 3.9 μM).

Miscellaneous compounds (**349-365**) (Table 93), COX-2 selective inhibitors that do not belong to the COX-2 inhibitor classes previously described, display potent COX-2 inhibitory up to SI >3000-125000. Recently, some natural compounds extracted from *Alstonia rupestris* (**330**, **331**, 92-96% of COX-2 inhibition against 37-39% of COX-1 inhibition at 100 μM), *Cryptotanshinone* (**333**, 31% of COX-2 inhibition with none COX-1 inhibition at 10 μM), *Senkyunolide O* (**334**, 52% of COX-2 inhibition with none COX-1 inhibition at 10 μM) demonstrated great COX-2 selectivity.



5-thia-8,11,14,17-eicosatetraenoic acid (348)

Figure 30: Example of a fatty acid derivative (**5-thia-8,11,14,17-eicosatetraenoic acid, 346**) from *Plantago major*

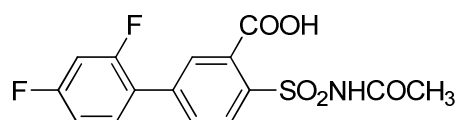


331

Figure 31: Example of a compound isolated (**331**) from *Alstonia rupestris* displaying a selective inhibition towards COX-2.

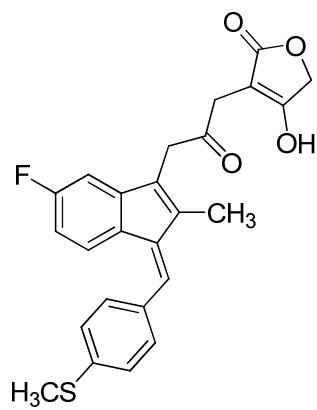
Analogues of known drugs were also studied. Benzenesulfonamides modified (Table 94) by the introduction of a *N*-acetylsulfonamido group have a great COX-2 selectivity (SI >1100, **366**, IC₅₀ = 87 nM. Sulindac (**367a**) and zomepirac (**367 d-e**) modified compounds (Table 95) exhibit from 300 to 1000-fold better COX-2 selectivity than their parent compounds and a better inhibition potency. The selectivity gain of fluosulide analogues (**367 b,c**) is limited (1-fold better) without alter the potency. [58, 143, 144]

Analogues of rofecoxib (**368, 369**, Table 96) and celecoxib (**370**, Table 97) were synthesized by replacing the sulfoalkyl moiety by a sulfonamide group able to interact through hydrogen bonds with residues of the COX-2 active site [145]. Celecoxib analogues exhibited good anti-inflammatory activity (ED₅₀ = 42.3 mg/kg) which was lower than celecoxib (ED₅₀ = 10.8 mg/kg), but greater than ibuprofen (ED₅₀ = 67.4 mg/kg) and aspirin (ED₅₀ = 128.7 mg/kg) [145] whereas some Rofecoxib analogues display similar activity compared to their parent compound. Mono- or di-substitutions by halogens or other functional groups (amines, esters) decreased the COX-2 selectivity compared to the parent structures (**368-370**) [103, 145-151]

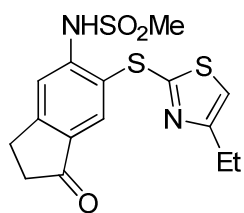


366

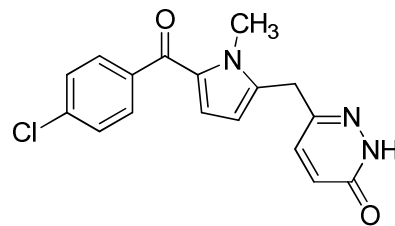
Figure 32: Example of a benzenesulfonamide modified compound (**366**).



367a



367c



367d RS-57067

Figure 33: Examples of sulindac (**367a**), fluosulide (**367c**) and zomepirac (**367d RS-57067**) modified compounds.

Other alternatives therapies to treat inflammation

To reduce the gastrointestinal tract (GI) side effects of COX-2 inhibitors, gastroprotective agents such as antisecretory agents are often used as (omeprazole, ranitidine, and cimetidine). However, some studies suggest that these compounds neutralize gastric acidity resulting in a decrease of NSAIDs bioavailability [152, 153]. Several strategies were thus developed to obtain COX-2 inhibitors with less GI toxicity.

CINODS (COX Inhibitor-Nitric Oxide Donors) and H₂S releasing compounds

Nitric oxide and hydrogen sulfide present protective effects in gastric mucosa. NSAIDS able to release NO and H₂S were thus developed to decrease the NSAIDS GI side effects. Several NSAIDS (diclofenac, aspirin, ibuprofen...) were coupled with NO or H₂S moiety (compounds **371**, **372** see Tables 98, 99) and the resulting compounds present better GI tolerability than classical selective COX-2 inhibitors [154]. Cyclooxygenase Inhibitor-Nitric Oxide Donors (CINODS) [155] were synthesized by modifying coxibs with introduction of a NO-donor group and displayed a reduced cardiovascular risk compared to selective COX-2 compounds [156-164]. Since NO and H₂S act in concert for the maintenance of gastric mucosa, dual H₂S-NO releasing compounds were also elaborated [156, 165] (compounds **372 g-j**, see Table 99).

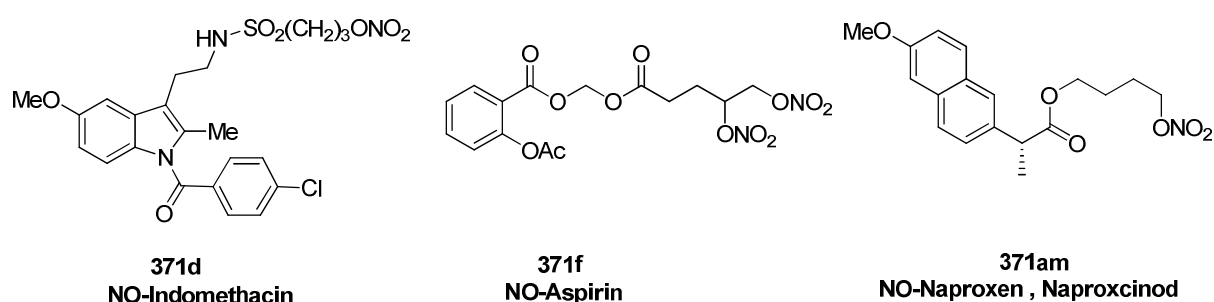


Figure 34: Some examples of CINODs derivated from NSAIDS (**371d**, **371f**, **371al**)

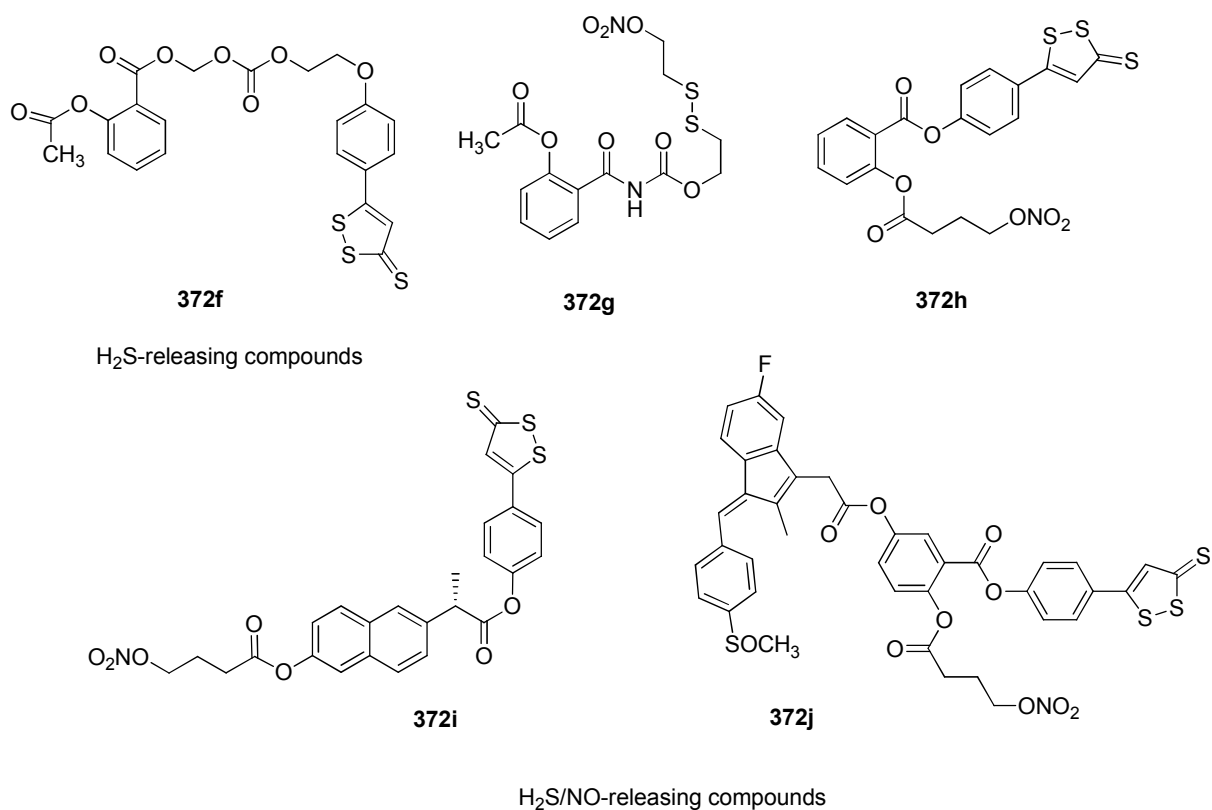


Figure 35: Some examples of H₂S-(**372f**) and H₂S/NO-releasing (**372 g-j**) compounds.

Dual COX-2/5-LOX compounds

Since leukotrienes participate in gastric mucosa injuries and inhibitors of 5-LOX demonstrated their protective effect in gastric mucosa [156], dual COX-2/5-LOX inhibitors were developed. This class of compounds present enhance anti-inflammatory activity [166] and good inhibition potency for the 2 active sites (IC₅₀ (μM)/ CI-986 (**373a**): 0.86/5.7, Licofelone (**373b**): 0.37/0.21, Darbufelone (**373c**): 0.48/0.77). (compounds **373**, see Table 100).

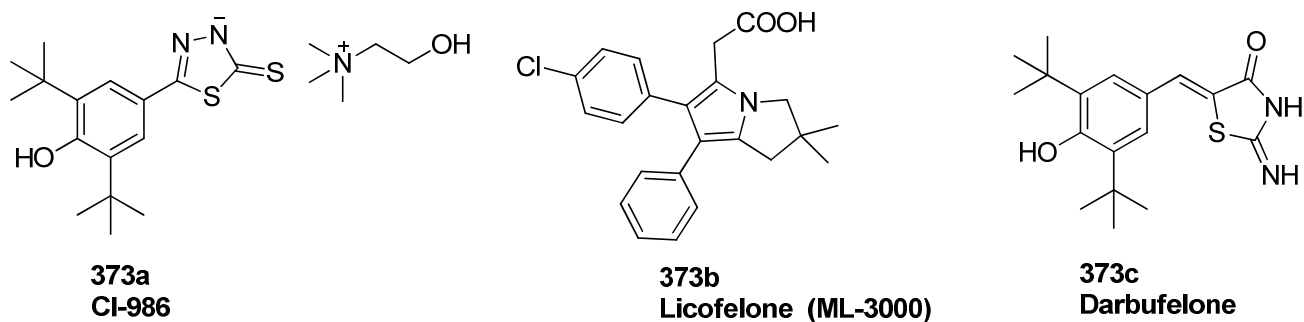
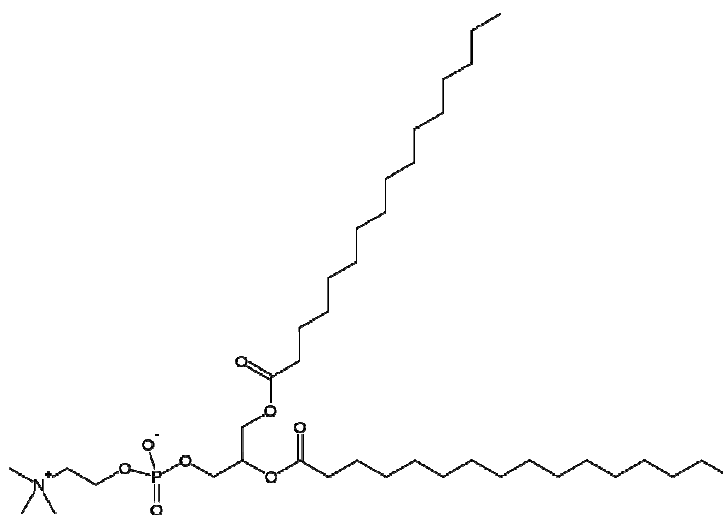


Figure 36: Examples of some COX-2/5-LOX (**373a-c**) compounds.

Zwitterionic phospholipids compounds

Combination of zwitterionic phospholipids like DPPC (**374**, Figure 37) and NSAIDs enables to prevent the interaction of NSAIDs with the mucosa avoiding GI side effects since the interaction with NSAIDs decreases the protective ability of the mucosa. [167]. Some zwitterionic phospholipids compounds associated with NSAIDs have been developed: phosphatidylcholine-associated with aspirin (PL2200), phosphatidylcholine-associated with ibuprofen (PL1100) [165].



1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)(374)

Figure 37: Zwitterionic phospholipids compound

The process of inflammation is very complex, and several approaches to reduce and relieve inflammation exist. Current trend is to develop molecules that act on one of the multiple signaling pathways of inflammation: NFκB, MAPKs, lipopolysaccharides (LPS), microsomal prostaglandin E2 synthase inhibitors (mPGHES-1), TNFα. In the literature, a great numbers of papers and reviews refer to these kinds of inhibitors [165, 168]

Adverse effects of COX inhibitors

Both selective and non-selective COX-2 inhibitors are associated with adverse side effects affecting particularly the gastro-intestinal and cardiovascular systems (Table B).

Gastrointestinal tract

GI injuries caused by COX inhibition, is one of the major side effects of anti-inflammatory drugs leading to hospitalizations and deaths. These side effects range from diarrhea, nausea, abdominal pain and flatulence to severe complications such as perforations, ulcerations, bleeding and obstruction [161]. These GI adverse effects can be explained mainly by two features. The first one is the acidic character of the classical NSAIDS [169]: these inhibitors are present in a non-ionized state in the highly acidic medium of the stomach, facilitating their migration through the gastric mucosa barrier where they are metabolized. Their ionized metabolites are responsible of several injuries in GI [170, 171]. The second risk factor for GI side effects is the inhibition of the synthesis of protective prostaglandins associated with the COX inhibition. For a long time, only the COX-1 inhibition was held responsible for the GI damages, through the inhibition of the synthesis of TXA₂. However, inhibition of COX-2 induces a delay in healing and an exacerbation of inflammation on the GI tract [11]. Furthermore, COX-2 assists COX-1 in the maintenance and the protection of gastric mucosa integrity [10, 172]. Experiences *in vivo* have demonstrated that selective inhibitors that only inhibit one COX isoform (either COX-1 or COX-2), are not associated with GI damages [156, 173]. However, these findings and the involvement of COX-2 inhibition in GI damages remain controversial [164, 174]. Despite the relative low rate of GI side effects associated with selective COX-2 inhibitors such as coxibs in several clinical studies [160, 161, 175, 176], efforts are still made to enhance GI tolerability of AINS. The current solutions include the use of NSAIDS or coxibs in combination with proton-pump inhibitor [177, 178], and the

development of new drugs with NO or H₂S releasing parts added to the structure of known NSAIDS.

Cardiovascular tract (CV)

The second most important side effects of selective COX-2 inhibitors are their adverse cardiovascular effects as illustrated by several clinical studies (VIGOR, CLASS, TARGET...)[161]. These side effects are the consequence of an over aggregation of platelets, obstructing arterials and vessels, [179] and can result in myocardial infarction, atherosclerosis, chronic heart failure and hypertension [177, 180-183]. They led to the withdrawal from the market of several coxibs, notably rofecoxib in 2004 and valdecoxib in 2005 [155, 184]. The CV adverse effects were first associated with the disequilibrium of the balance between the COX-1 TXA₂ prothrombotic effects and the COX-2 PGI₂ antithrombotic effects [177, 179, 184]. However, in 2013, Mitchell's group [185] found that COX-1 controls the synthesis of PGI₂ in CV system and is responsible of CV events. The CV side effects of the coxibs were then linked to their sulfone moiety which oxidation releases free radicals [186]. To counterpart the CV events, several propositions have been made: the use of meloxicam that presents better GI and CV profiles; the use of NO-NSAIDS; the combination with low dose of aspirin to reduce the synthesis of platelets [29, 182], or a proton pump inhibitor, and a change of lifestyle for patients susceptible to develop CV events [182].

Kidney

About 1 to 5% of patients develop renal side effects due to the use of NSAIDS [178]. PGs inhibition by COX-2 selective or non-selective NSAIDS induce a decrease in water, sodium and potassium excretion, a decrease of the glomerular filtration rate, and changes in the release of renin, resulting in hypertension, edema, renal insufficiency and failure [161, 180, 186-190].

Reproductive tract

PG such as PGE₂ and PGF₂α are involved in all stage of the pregnancy and in reproductive process [191] and PGE₂ inhibition prevents infertility [180]. The PGs synthesized by COX-1 appear to be essential for survival of fetus during the pregnancy and COX-1 inhibition can result in premature child death [2, 172]. The PGs synthesized by COX-2 act particularly in the delivery process [191]. Non-selective NSAIDS, such as indomethacin, associated with delay in the delivery and high child mortality [61] should be avoided during the pregnancy. COX-2 selective drugs may lead to failures in ovulation, fertilization, implantation [11] but can be useful in reducing preterm labor [49, 155, 192] and to treat endometriosis [193].

Central Nervous System (CNS)

COX-1 and COX-2 are expressed in the CNS and a large range of adverse effects affecting the CNS can be observed with the use of NSAIDS, from headaches and confusion to the aggravation of psychiatric illness such as epilepsy and Parkinson disease [194]. However, studies suggested that NSAIDS could reduce cerebral edema to prevent cerebral cardiovascular accident and reduce neuronal death [195].

Respiratory tract

COX-2 seems to be implied in the pathogenesis of asthma based on its over-expression in asthmatic patients [196, 197] by promoting inflammation and airways constriction [180]. Classical NSAIDS can worsen asthma by inducing bronchoconstriction and edema, whereas selective COX-2 inhibitors can be used to reduce asthma [49, 171].

Other organs

All NSAIDS can damage the liver, resulting in asymptomatic transaminase elevation to clinical hepatitis [194] and more particularly sulindac, diclofenac and aspirin [198]. Skin allergic reactions can be observed with classical NSAIDS and selective drugs: urticaria, alopecia, photosensitivity, erythema multiform, Stevens-Johnson syndrome and rarely

necrosis of epidermal [188, 199]. Other events have been also observed such as in bone healing, dizziness, headache, flu symptoms, fatigue and insomnia [161].

The prescription of NSAIDs, and particularly the determination of the therapeutic dose and the duration of the treatment, must be adapted to each patient susceptibility to minimize adverse events [176, 178].

COX inhibitors: future therapies for cancers and neuronal diseases

COX inhibitors were developed to treat inflammation and can thus be used in a large number of inflammatory diseases. However, for more than twenty years, the use of COX inhibitors to treat cancers and neuronal diseases such as Alzheimer's and Parkinson's is investigated.

Cancer

The involvement and the over-expression of COX-2 in cancers have been reported [180]. Evidence suggest that NSAIDS tumor inhibition could be mediated by their ability to inhibit angiogenesis [11, 180] and to restore apoptosis in APC-deficient cells [200, 201]. However, the knowledge of the anti-oncogenic mechanism remains uncompleted and the involvement of LOX and COX- independent pathways were also highlighted [195]. NSAIDs could be used to prevent and to participate in tumor decrease in several cancers [202-204] The COX-2 over-expression in colorectal cancer reaches 80% [180]. Several clinical studies revealed that NDAIDS could be used for the prevention (long-term use of aspirin [157]) and treatment of colon cancer (SC-58125 [157], celecoxib and rofecoxib [205]). In animal models, other NSAIDs like piroxicam, indomethacin, sulindac, ibuprofen or ketoprofen decrease 40-50% the risk to develop the colon cancer [202, 205, 206]. Similarly, in familial adenomatous polyposis (FAP), celecoxib [11, 180, 205] or the combination of aspirin and sulindac [11] inhibits significantly the growth of adenomatous polyps and leads to the regression of existing polyps [11, 167, 180, 205, 207]. Several studies described the potency of aspirin and NSAIDs in the prevention of esophageal cancer [11, 180, 208, 209] Coxibs and particularly celecoxib are used to prevent tobacco-related cancers [157] [210] or to reduce tumoral growth [11, 180]. Celecoxib and its derivatives are efficient antiproliferative agents in prostate and breast cancer [202, 208, 211]. Nimesulide is used in the treatment of breast cancer [212] where COX-2 is overexpressed up to 40% [213].

Alzheimer's disease (AD)

Several epidemiological studies suggest an association between the long term use of NSAIDS and a reduced risk of AD [214-216]. However, this protection differs according to the NSAIDS used. Some NSAIDS such as ibuprofen and naproxen demonstrated significantly reduced AD risk [216], However, rofecoxib in a 12-18 month clinical trial of in patients with mild cognitive impairment showed in the contrary no protective effect on AD development and was even suspected to increase the rate of conversion to AD [217]. In fact, several factors seem to be essential for NSAIDS protection effect against AD: early NSAIDS chronic exposition, earlier onset subjects, ApoE4 carriers, a COX-1 inhibition potency... [218]. The initial hypothesis that the COX-2 inhibition could be responsible for a reduced neuro-inflammation and thus for the protective effect is now refuted but the complete mechanisms of amyloid accumulation reduction are still unclear.

Parkinson's disease (PD)

Patients suffering PD present an over-expression of COX-2 in the brain [202]. Several evidences indicate that COX-2 is involved in the pathogenesis of PD and could be an interesting target to delay the apparition of PD or to stop its progression [219]. Rofecoxib and Parecoxib are notably considered as neuroprotective agents [103, 220].

CONCLUSION

Since its discovery in 1990's, COX-2 enzyme has aroused the development of a great numbers of selective inhibitors: with chemical diversity, different in inhibitory potency, contrasting in their ability to reduce side effects and enhancing tolerability compared to classical NSAIDs. Recently, an important effort has been focused on COX-2 selective drugs as future therapies for a wide kind of cancers and neuronal diseases. Currently, new researches turn toward nanotechnology where selective drugs will be associated with nanoparticles.

	COX-1	COX-2
Location on chromosome	9q32-q33.3	1q25
Enzyme location	Endoplasmic reticulum	Nuclear envelope
Enzyme size (weight kDa)	600-602 AA (70-72)	603-604 AA (70-72)
Regulation	Constitutive	Inductible
Induced gene expression	2-4 folds	10-80 folds
Function	Homeostasis, organs protection	Inflammation
Tissue expression	Ubiquitous (particularly in stomach, kidney and platelet)	Quasi-undetectable at basal condition Induced by inflammatory stimuli (macrophages, monocytes...)

Table A. (adapted Pairet *et al* [196]).

Localisation	Adverse effects
Cardiovascular	Myocardial infarction Thrombosis events, stroke Hypertension
Renal	Reduced glomerular filtration rate and renal plasma flow Sodium retention Acute interstitial nephritis Acute renal failure
Gastrointestinal	Inhibition of ulcer healing Hepatic complications
Regenerative	Retarded wound healing Slowing of fracture healing Retarded ligament healing
Neuropsychiatric	Depression Confusion and hallucination Somnolence or insomnia Abnormal thinking
Reproductive	Delayed follicular rupture Reduction of preterm labour
Cutaneous	Hypersensitivity reactions Fatal skin reactions Allergy

Table B: Summary of some adverse effects associated with the use of COX-2 selective inhibitors (adapted Puhlmann *et al*[155]).

BIBLIOGRAPHIE

1. Vane, J.R., *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs*. Nature (London), New Biol., 1971. **231**(25): p. 232-5.
2. Vane, J.R., *The mechanism of action of anti-inflammatory drugs*. Ernst Schering Res. Found. Workshop, 2000. **31**(Advances in Eicosanoid Research): p. 1-23.
3. Xie, W., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L., and Simmons, D.L., *Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1991. **88**(7): p. 2692-6.
4. Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W., and Herschman, H.R., *TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homolog*. J. Biol. Chem., 1991. **266**(20): p. 12866-72.
5. Hemler, M., Lands, W.E.M., and Smith, W.L., *Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme*. J. Biol. Chem., 1976. **251**(18): p. 5575-9.
6. Xie, W., Robertson, D.L., and Simmons, D.L., *Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Drug Dev. Res., 1992. **25**(4): p. 249-65.
7. Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M., *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*. Annu. Rev. Biochem., 2000. **69**: p. 145-182.
8. Crofford, L.J., *COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions*. J. Rheumatol., Suppl., 1997. **49**(Progress toward a New Class of Therapeutics: Selective COX-2 Inhibition): p. 15-19.
9. Golden, B.D. and Abramson, S.B., *Selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. Rheum Dis Clin North Am, 1999. **25**(2): p. 359-78.
10. Penglis, P.S., James, M.J., and Cleland, L.G., *Cyclooxygenase inhibitors: any reservations?* Intern. Med. J., 2001. **31**(1): p. 37-41.
11. Claria, J., *Cyclooxygenase-2 biology*. Curr. Pharm. Des., 2003. **9**(27): p. 2177-2190.
12. Griswold, D.E. and Adams, J.L., *Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date*. Med. Res. Rev., 1996. **16**(2): p. 181-206.
13. Al-Turki, D.A., Abou-Zeid, L.A., Shehata, I.A., and Al-Omar, M.A., *Therapeutic and toxic effects of new NSAIDs and related compounds: a review and prospective study*. Int. J. Pharmacol., 2010. **6**(6): p. 813-825.
14. Cryer, B. and Dubois, A., *The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review*. Prostaglandins Other Lipid Mediators, 1998. **56**(5-6): p. 341-361.
15. Luo, C., He, M.-l., and Bohlin, L., *Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial*. Acta Pharmacol. Sin., 2005. **26**(8): p. 926-933.
16. Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C., and Stallings, W.C., *Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents*. Nature (London), 1996. **384**(6610): p. 644-648.
17. Dannhardt, G. and Kiefer, W., *Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **36**(2): p. 109-126.
18. Flower, R.J., *The development of COX2 inhibitors*. Nat. Rev. Drug Discovery, 2003. **2**(3): p. 179-191.
19. Vane, J., *Towards a better aspirin*. Nature, 1994. **367**(6460): p. 215-6.
20. Warner, T.D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J.A., and Vane, J.R., *Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are*

- associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1999. **96**(13): p. 7563-7568.
21. Barnett, J., Chow, J., Ives, D., Chiou, M., Mackenzie, R., Osen, E., Nguyen, B., Tsing, S., Bach, C., and et, a., *Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system.* Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol., 1994. **1209**(1): p. 130-9.
 22. Engelhardt, G., Boegel, R., Schnitzer, C., and Utzmann, R., *Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part. 1. In vitro findings.* Biochem. Pharmacol., 1996. **51**(1): p. 21-8.
 23. Li, C.-S., Black, W.C., Brideau, C., Chan, C.C., Charleson, S., Cromlish, W.A., Claveau, D., Gauthier, J.Y., Gordon, R., Greig, G., Grimm, E., Guay, J., Lau, C.K., Riendeau, D., Therien, M., Visco, D.M., Wong, E., Xu, L., and Prasit, P., *A new structural variation on the methanesulfonylphenyl class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999. **9**(22): p. 3181-3186.
 24. Panara, M.R., Greco, A., Santini, G., Sciulli, M.G., Rotondo, M.T., Padovano, R., di Gamberardino, M., Cipollone, F., Cuccurullo, F., and et, a., *Effects of the novel anti-inflammatory compounds, N-[2-cyclohexyloxy]-4-nitrophenyl] methanesulfonamide (NS-398) and 5-methanesulfonylamido-6-(2,4-difluorothiophenyl)-1-indanone (L-745,337), on the cyclo-oxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases.* Br. J. Pharmacol., 1995. **116**(5): p. 2429-34.
 25. Gierse, J.K., Hauser, S.D., Creely, D.P., Koboldt, C., Rangwala, S.H., Isakson, P.C., and Seibert, K., *Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase.* Biochem. J., 1995. **305**(2): p. 479-84.
 26. Carabaza, A., Cabre, F., Rotllan, E., Gomez, M., Gutierrez, M., Garcia, M.L., and Mauleon, D., *Stereoselective inhibition of inducible cyclooxygenase by chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs.* J. Clin. Pharmacol., 1996. **36**(6): p. 505-512.
 27. Grossman, C.J., Wiseman, J., Lucas, F.S., Trevethick, M.A., and Birch, P.J., *Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human platelets and mononuclear cells by NSAIDS and Cox 2 inhibitors.* Inflammation Res., 1995. **44**(6): p. 253-7.
 28. Richardson, C. and Emery, P., *The clinical implications of inhibition of the inducible form of cyclo-oxygenase.* Drug Saf., 1996. **15**(4): p. 249-260.
 29. Capone, M.L., Tacconelli, S., Di Francesco, L., Sacchetti, A., Sciulli, M.G., and Patrignani, P., *Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans.* Prostaglandins Other Lipid Mediators, 2007. **82**(1-4): p. 85-94.
 30. Dannhardt, G. and Kiefer, W., *Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects.* Eur. J. Med. Chem., 2001. **36**(2): p. 109-126.
 31. Jouzeau, J.-Y., Terlain, B., Abid, A., Nedelec, E., and Netter, P., *Cyclooxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs.* Drugs, 1997. **53**(4): p. 563-582.
 32. De Leval, X., Delarge, J., Somers, F., De Tullio, P., Henrotin, Y., Pirotte, B., and Dogne, J.-M., *Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition.* Curr. Med. Chem., 2000. **7**(10): p. 1041-1062.
 33. Winter, C.A., Risley, E.A., and Nuss, G.W., *Carrageenin-induced edema in hind paw of rat as an assay for antiinflammatory drugs.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962. **111**: p. 544-7.
 34. Otterness, I.G. and Moore, P.F., *Carrageenan foot edema test.* Methods Enzymol, 1988. **162**: p. 320-7.
 35. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., and Isakson, P., *Pharmacological and biochemical demonstration of the role of*

- cyclooxygenase 2 in inflammation and pain*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1994. **91**(25): p. 12013-17.
36. Penning, T.D., Talley, J.J., Bertenshaw, S.R., Carter, J.S., Collins, P.W., Docter, S., Graneto, M.J., Lee, L.F., Malecha, J.W., Miyashiro, J.M., Rogers, R.S., Rogier, D.J., Yu, S.S., Anderson, G.D., Burton, E.G., Cogburn, J.N., Gregory, S.A., Koboldt, C.M., Perkins, W.E., Seibert, K., Veenhuizen, A.W., Zhang, Y.Y., and Isakson, P.C., *Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib)*. J. Med. Chem., 1997. **40**(9): p. 1347-1365.
 37. Richardson, J.D., Kilo, S., and Hargreaves, K.M., *Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors*. Pain, 1998. **75**(1): p. 111-119.
 38. Anderson, G.D., Hauser, S.D., McGarity, K.L., Bremer, M.E., Isakson, P.C., and Gregory, S.A., *Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and cyclooxygenase (COX)-2 in rat adjuvant arthritis*. J. Clin. Invest., 1996. **97**(11): p. 2672-2679.
 39. Jaffee, B.D., Kerr, J.S., Jones, E.A., Giannaras, J.V., McGowan, M., and Ackerman, N.R., *The effect of immunomodulating drugs on adjuvant-induced arthritis in Lewis rats*. Agents Actions, 1989. **27**(3-4): p. 344-6.
 40. Simon, L.S., Lanza, F.L., Lipsky, P.E., Hubbard, R.C., Talwalker, S., Schwartz, B.D., Isakson, P.C., and Geis, G.S., *Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor, in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects*. Arthritis Rheum., 1998. **41**(9): p. 1591-1602.
 41. Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J., and Vane, J.R., *Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993. **90**(24): p. 11693-7.
 42. Christoph, T. and Buschmann, H. *Cyclooxygenase inhibition: From NSAIDs to selective COX-2 inhibitors*. 2002. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
 43. Blobaum, A.L. and Marnett, L.J., *Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition*. J. Med. Chem., 2007. **50**(7): p. 1425-1441.
 44. Campos, C., De Gregorio, R., Garcia-Nieto, R., Gago, F., Ortiz, P., and Alemany, S., *Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol*. Eur. J. Pharmacol., 1999. **378**(3): p. 339-347.
 45. Sanphui, P., Bolla, G., Nangia, A., and Chernyshev, V., *Acemetacin cocrystals and salts: structure solution from powder X-ray data and form selection of the piperazine salt*. IUCrJ, 2014. **1**(2): p. 136-150.
 46. Rowlinson, S.W., Kiefer, J.R., Prusakiewicz, J.J., Pawlitz, J.L., Kozak, K.R., Kalgutkar, A.S., Stallings, W.C., Kurumbail, R.G., and Marnett, L.J., *A Novel Mechanism of Cyclooxygenase-2 Inhibition Involving Interactions with Ser-530 and Tyr-385*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(46): p. 45763-45769.
 47. Picot, D., Loll, P.J., and Garavito, R.M., *The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1*. Nature, 1994. **367**(6460): p. 243-9.
 48. Hinz, B., Cheremina, O., and Brune, K., *Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man*. FASEB J., 2008. **22**(2): p. 383-390, 10.1096/fj.07-8506com.
 49. Warner, T.D. and Mitchell, J.A., *Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic*. FASEB J., 2004. **18**(7): p. 790-804, 10.1096/fj.03-0645rev.

50. Kis, B., Snipes, J.A., and Busija, D.W., *Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: Sorting out facts, fictions, and uncertainties*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2005. **315**(3): p. 1415-1416.
51. Botting, R.M., *Mechanism of action of acetaminophen: Is there a cyclooxygenase 3?* Clin. Infect. Dis., 2000. **31**(Suppl. 5): p. S202-S210.
52. Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., and Simmons, D.L., *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002. **99**(21): p. 13926-13931.
53. Buschmann, H.H., Gutierrez Silva, B., Holenz, J., and Farre Gomis, A., *Analgesic anti-inflammatory combination comprising a carbinol and an NSAID*. 2005, Laboratorios del Dr. Esteve, S. A., Spain . p. 84 pp.
54. Xu, S., Hermanson, D.J., Banerjee, S., Ghebreselasie, K., Clayton, G.M., Garavito, R.M., and Marnett, L.J., *Oxicams Bind in a Novel Mode to the Cyclooxygenase Active Site via a Two-water-mediated H-bonding Network*. J. Biol. Chem., 2014. **289**(10): p. 6799-6808.
55. Carty, T.J., Stevens, J.S., Lombardino, J.G., Parry, M.J., and Randall, M.J., *Piroxicam, a structurally novel antiinflammatory compound. Mode of prostaglandin synthesis inhibition*. Prostaglandins, 1980. **19**(5): p. 671-82.
56. Kalgutkar, A.S., Rowlinson, S.W., Crews, B.C., and Marnett, L.J., *Amide derivatives of meclofenamic acid as selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002. **12**(4): p. 521-524.
57. Iqbal, M.S., Khurshid, S.J., and Muhammad, B., *Anti-inflammatory and selective COX-2 inhibitory activities of metal complexes of Schiff bases derived from aldoses*. Med. Chem. Res., 2013. **22**(2): p. 861-868.
58. Marnett, L.J. and Kalgutkar, A.S. *Structural diversity of selective COX-2 inhibitors*. 2004. Birkhaeuser Verlag.
59. Zarghi, A. and Ghodsi, R., *Design, synthesis, and biological evaluation of ketoprofen analogs as potent cyclooxygenase-2 inhibitors*. Bioorg. Med. Chem., 2010. **18**(16): p. 5855-5860.
60. Randy L. Bell, R.R.H., Andrew O. Stewart, *COX-2 Inhibitors and Leukotriene Modulators*. 2003: Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. .
61. Kam, P.C.A. and See, A.U.L., *Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role*. Anaesthesia, 2000. **55**(5): p. 442-449.
62. Chan, C.-C. and Rodger, I.W., *Selective cyclooxygenase-2 inhibitors as potential therapeutic agents for inflammatory diseases*. Adv. Exp. Med. Biol., 1997. **407**(Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury 3): p. 157-161.
63. Talley, J.J., *Selective inhibitors of cyclooxygenase-2*. Expert Opin. Ther. Pat., 1997. **7**(1): p. 55-62.
64. Rufer, C., Schillinger, E., Boettcher, I., Repenthin, W., and Herrmann, C., *Nonsteroidal antiinflammatories. XII. Mode of action of antiinflammatory methane sulfonanilides*. Biochem. Pharmacol., 1982. **31**(22): p. 3591-6.
65. Vigdahl, R.L. and Tukey, R.H., *Mechanism of action of novel anti-inflammatory drugs diflumidone and R-805*. Biochem. Pharmacol., 1977. **26**(4): p. 307-11.
66. Guo, Q., Wang, L.-H., Ruan, K.-H., and Kulmacz, R.J., *Role of Val509 in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase activity by isoform-selective agents*. J. Biol. Chem., 1996. **271**(32): p. 19134-19139.
67. Gierse, J.K., McDonald, J.J., Hauser, S.D., Rangwala, S.H., Koboldt, C.M., and Seibert, K., *A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2*

- (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 1996. **271**(26): p. 15810-15814.
68. Wu, K.K.-Y., *Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. *Biochem. Pharmacol.*, 1998. **55**(5): p. 543-547.
 69. Copeland, R.A., Williams, J.M., Giannaras, J., Nurnberg, S., Covington, M., Pinto, D., Pick, S., and Trzaskos, J.M., *Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994. **91**(23): p. 11202-6.
 70. Friesen, R.W., Dube, D., Fortin, R., Frenette, R., Prescott, S., Cromlish, W., Greig, G.M., Kargman, S., Wong, E., and et, a., *Novel 1,2-diarylcyclobutenes: selective and orally active COX-2 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996. **6**(22): p. 2677-2682.
 71. Arefi, H. and Zarghi, A., *Synthesis and biologic evaluation of new 3-phenoxyazetidino-2-one derivatives as selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. *Med. Chem. Res.*, 2013. **22**(8): p. 3881-3887.
 72. Talley, J.J., Bertenshaw, S.R., Brown, D.L., Carter, J.S., Graneto, M.J., Koboldt, C.M., Masferrer, J.L., Norman, B.H., Rogier, D.J., Jr., Zweifel, B.S., and Seibert, K., *4,5-Diaryloxazole inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2)*. *Med. Res. Rev.*, 1999. **19**(3): p. 199-208.
 73. Reitz, D.B., Huang, H.-C., Li, J.J., Garland, D.J., Anderson, G.D., Gregory, S.A., Koboldt, C.M., Perkins, W.E., Seibert, K., and Isakson, P.C., *Selective cyclooxygenase inhibitors: novel diarylspirocycloalkenes are potent and orally active COX-2 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995. **5**(8): p. 867-72.
 74. Huang, H.-C., Li, J.J., Garland, D.J., Chamberlain, T.S., Reinhard, E.J., Manning, R.E., Seibert, K., Koboldt, C.M., Gregory, S.A., and et, a., *Diarylspiro[2.4]heptenes as Orally Active, Highly Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Synthesis and Structure-Activity Relationships*. *J. Med. Chem.*, 1996. **39**(1): p. 253-66.
 75. Leblanc, Y., Gauthier, J.Y., Ethier, D., Guay, J., Mancini, J., Riendeau, D., Tagari, P., Vickers, P., Wong, E., and Prasit, P., *Synthesis and biological evaluation of 2,3-diarylthiophenes as selective Cox-2 and Cox-1 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995. **5**(18): p. 2123-8.
 76. Pinto, D.J.P., Copeland, R.A., Covington, M.B., Pitts, W.J., Batt, D.G., Orwat, M.J., Lam, G.N., Joshi, A., Chan, Y.-C., Wang, S., Trzaskos, J.M., Magolda, r.L., and Kornhauser, D.M., *Chemistry and pharmacokinetics of diarylthiophenes and terphenyls as selective cox-2 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996. **6**(24): p. 2907-2912.
 77. Bertenshaw, S.R., Talley, J.J., Rogier, D.J., Graneto, M.J., Rogers, R.S., Kramer, S.W., Penning, T.D., Koboldt, C.M., Veenhuizen, A.W., and et, a., *3,4-Diarylthiophenes are selective COX-2 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995. **5**(23): p. 2919-22.
 78. Talley, J.J., *Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2)*. *Prog. Med. Chem.*, 1999. **36**: p. 201-234.
 79. Zanatta, S.D., Jarrott, B., and Williams, S.J., *Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of aryl dithiolethiones with cyclooxygenase-2-selective inhibitory activity and hydrogen sulfide-releasing properties*. *Aust. J. Chem.*, 2010. **63**(6): p. 946-957.
 80. Anzini, M., Rovini, M., Cappelli, A., Vomero, S., Manetti, F., Botta, M., Sautebin, L., Rossi, A., Pergola, C., Ghelardini, C., Norcini, M., Giordani, A., Makovec, F., Anzellotti, P., Patrignani, P., and Biava, M., *Synthesis, Biological Evaluation, and Enzyme Docking Simulations of 1,5-Diarylpyrrole-3-Alkoxyethyl Ethers as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors Endowed with Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity*. *J. Med. Chem.*, 2008. **51**(15): p. 4476-4481.

81. Campbell, J.A., Bordunov, V., Broka, C.A., Browner, M.F., Kress, J.M., Mirzadegan, T., Ramesha, C., Sanpablo, B.F., Stabler, R., Takahara, P., Villasenor, A., Walker, K.A.M., Wang, J.-H., Welch, M., and Weller, P., *Rational design of 6-methylsulfonylindoles as selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004. **14**(18): p. 4741-4745.
82. Consalvi, S., Alfonso, S., Di Capua, A., Poce, G., Pirolli, A., Sabatino, M., Ragno, R., Anzini, M., Sartini, S., La Motta, C., Di Cesare Mannelli, L., Ghelardini, C., and Biava, M., *Synthesis, biological evaluation and docking analysis of a new series of methylsulfonyl and sulfamoyl acetamides and ethyl acetates as potent COX-2 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2015. **23**(4): p. 810-820.
83. Biava, M., Porretta, G.C., Poce, G., Battilocchio, C., Manetti, F., Botta, M., Forli, S., Sautebin, L., Rossi, A., Pergola, C., Ghelardini, C., Galeotti, N., Makovec, F., Giordani, A., Anzellotti, P., Patrignani, P., and Anzini, M., *Novel Ester and Acid Derivatives of the 1,5-Diarylpyrrole Scaffold as Anti-Inflammatory and Analgesic Agents. Synthesis and in Vitro and in Vivo Biological Evaluation*. *J. Med. Chem.*, 2010. **53**(2): p. 723-733.
84. Kim, K.J., Choi, M.J., Shin, J.-S., Kim, M., Choi, H.-E., Kang, S.M., Jin, J.H., Lee, K.-T., and Lee, J.Y., *Synthesis, biological evaluation, and docking analysis of a novel family of 1-methyl-1H-pyrrole-2,5-diones as highly potent and selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014. **24**(8): p. 1958-1962.
85. Al-Suwaidan, I.A., Alanazi, A.M., El-Azab, A.S., Al-Obaid, A.M., ElTahir, K.E.H., Maarouf, A.R., Abu El-Enin, M.A., and Abdel-Aziz, A.A.M., *Molecular design, synthesis and biological evaluation of cyclic imides bearing benzenesulfonamide fragment as potential COX-2 inhibitors. Part 2*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013. **23**(9): p. 2601-2605.
86. Abdel-Aziz, A.A.M., El Tahir, K.E.H., and Asiri, Y.A., *Synthesis, anti-inflammatory activity and COX-1/COX-2 inhibition of novel substituted cyclic imides. Part 1: Molecular docking study*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2011. **46**(5): p. 1648-1655.
87. Alanazi, A.M., El-Azab, A.S., Al-Suwaidan, I.A., El Tahir, K.E.H., Asiri, Y.A., Abdel-Aziz, N.I., and Abdel-Aziz, A.A.M., *Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015. **92**: p. 115-123.
88. Soliva, R., Almansa, C., Kalko, S.G., Luque, F.J., and Orozco, M., *Theoretical Studies on the Inhibition Mechanism of Cyclooxygenase-2. Is There a Unique Recognition Site?* *J. Med. Chem.*, 2003. **46**(8): p. 1372-1382.
89. Wang, J.L., Limburg, D., Graneto, M.J., Springer, J., Hamper, J.R.B., Liao, S., Pawlitz, J.L., Kurumbail, R.G., Maziasz, T., Talley, J.J., Kiefer, J.R., and Carter, J., *The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010. **20**(23): p. 7159-7163.
90. Fioravanti, R., Bolasco, A., Manna, F., Rossi, F., Orallo, F., Ortuso, F., Alcaro, S., and Cirilli, R., *Synthesis and biological evaluation of N-substituted-3,5-diphenyl-2-pyrazoline derivatives as cyclooxygenase (COX-2) inhibitors*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010. **45**(12): p. 6135-6138.
91. Abdellatif, K.R.A., Elshemy, H.A.H., and Azoz, A.A., *1-(4-Methane(amino)sulfonylphenyl)-3-(4-substituted-phenyl)-5-(4-trifluoromethylphenyl)-1H-2-pyrazolines/pyrazoles as potential anti-inflammatory agents*. *Bioorg. Chem.*, 2015. **63**: p. 13-23.

92. Bandgar, B.P., Adsul, L.K., Chavan, H.V., Jalde, S.S., Shringare, S.N., Shaikh, R., Meshram, R.J., Gacche, R.N., and Masand, V., *Synthesis, biological evaluation, and docking studies of 3-(substituted)-aryl-5-(9-methyl-3-carbazole)-1H-2-pyrazolines as potent anti-inflammatory and antioxidant agents*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012. **22**(18): p. 5839-5844.
93. Yadav, M.R., Puntambekar, D.S., Sarathy, K.P., Vengurlekar, S., and Giridhar, R., *Quantitative structure activity relationship studies of diarylimidazoles as selective COX-2 inhibitors*. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 2006. **45B**(2): p. 475-482.
94. Bhandari, S., Bothara, K., Pawar, V., Lokwani, D., and Devale, T., *Design of new chemicals entities as selective COX-2 inhibitors using structure optimization by molecular modeling studies*. *Internet Electron. J. Mol. Des.*, 2009. **8**(2): p. 14-28.
95. Handler, N., Jaeger, W., Kuen-Krismer, B., and Erker, T., *Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 inhibition of novel 1,2-disubstituted imidazoles*. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*, 2005. **338**(12): p. 602-604.
96. Abu-Rahma, G.E.-D.A.A., Abdel-Aziz, M., Farag, N.A., and Kaoud, T.S., *Novel 1-[4-(Aminosulfonyl)phenyl]-1H-1,2,4-triazole derivatives with remarkable selective COX-2 inhibition: Design, synthesis, molecular docking, anti-inflammatory and ulcerogenicity studies*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014. **83**: p. 398-408.
97. Radwan, A.A. and El Tahir, K.E.H., *Synthesis and in-silico studies of some diaryltriazole derivatives as potential cyclooxygenase inhibitors*. *Arch. Pharmacol Res.*, 2013. **36**(5): p. 553-563.
98. Roy, P.L.Y., Gall, R.g., Brideau, C., Chan, C.C., Chauret, N., Cromlish, W., Ethier, D., Gauthier, J.Y., Gordon, R., Greig, G., Guay, J., Kargman, S., Lau, C.K., O'Neill, G., Silva, J., Therien, M., van Staden, C., Wong, E., Xu, L., and Prasit, P., *A new series of selective COX-2 inhibitors: 5,6-diarylthiazolo[3,2-b][1,2,4]triazoles*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997. **7**(1): p. 57-62.
99. Al-Hourani, B.J., Sharma, S.K., Mane, J.Y., Tuszynski, J., Baracos, V., Kniess, T., Suresh, M., Pietzsch, J., and Wuest, F., *Synthesis and evaluation of 1,5-diaryl-substituted tetrazoles as novel selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011. **21**(6): p. 1823-1826.
100. Jawabrah Al-Hourani, B., Sharma, S.K., Kaur, J., and Wuest, F., *Synthesis, bioassay studies, and molecular docking of novel 5-substituted 1H tetrazoles as cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors*. *Med. Chem. Res.*, 2015. **24**(1): p. 78-85.
101. Kawai, S., Nishida, S., Kato, M., Furumaya, Y., Okamoto, R., Koshino, T., and Mizushima, Y., *Comparison of cyclooxygenase-1 and -2 inhibitory activities of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human platelets and synovial cells*. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998. **347**(1): p. 87-94.
102. Rainsford, K.D., Omar, H., Ashraf, A., Hewson, A.T., Bunning, R.A.D., Rishiraj, R., Shepherd, P., and Seabrook, R.W., *Recent pharmacodynamic and pharmacokinetic findings on oxaprozin*. *Inflammopharmacology*, 2002. **10**(3): p. 185-239.
103. Praveen Rao, P.N. and Knaus, E.E., *Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond*. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2008. **11**(2): p. 81s-110s.
104. Hashimoto, H., Imamura, K., Haruta, J.-i., and Wakitani, K., *4-(4-Cycloalkyl/aryl-oxazol-5-yl)benzenesulfonamides as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Enhancement of the Selectivity by Introduction of a Fluorine Atom and Identification of a Potent, Highly Selective, and Orally Active COX-2 Inhibitor JTE-522*. *J. Med. Chem.*, 2002. **45**(7): p. 1511-1517.

105. Hashimoto, H., Maeda, K., Ozawa, K., Haruta, J.-i., and Wakitani, K., *4-Arylcycloalkyl-5-phenyloxazole derivatives as selective COX-2 inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002. **12**(1): p. 65-8.
106. Wakitani, K., Nanayama, T., Masaki, M., and Matsushita, M., *Profile of JTE-522 as a human cyclooxygenase-2 inhibitor*. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1998. **78**(3): p. 365-371.
107. Velazquez, C., Rao, P.N.P., McDonald, R., and Knaus, E.E., *Synthesis and biological evaluation of 3,4-diphenyl-1,2,5-oxadiazole-2-oxides and 3,4-diphenyl-1,2,5-oxadiazoles as potential hybrid COX-2 inhibitor/nitric oxide donor agents*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005. **13**(8): p. 2749-2757.
108. Song, Y., Connor, D.T., Doubleday, R., Sorenson, R.J., Sercel, A.D., Unangst, P.C., Roth, B.D., Gilbertsen, R.B., Chan, K., Schrier, D.J., Guglietta, A., Bornemeier, D.A., and Dyer, R.D., *Synthesis, structure-activity relationships, and in vivo evaluations of substituted di-tert-butylphenols as a novel class of potent, selective, and orally active cyclooxygenase-2 inhibitors. 1. Thiazolone and oxazolone series*. *J. Med. Chem.*, 1999. **42**(7): p. 1151-1160.
109. Zarghi, A., Javid, F.S., Ghodsi, R., Dadrass, O.G., Daraei, B., and Hedayati, M., *Design, synthesis and biological evaluation of new 5,5-diarylhydantoin derivatives as selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. *Sci. Pharm.*, 2011. **79**(3): p. 449-460.
110. Pinto, D.J.P., Batt, D.G., Pitts, W.J., Petraitis, J.J., Orwat, M.J., Wang, S., Jetter, J.W., Sherk, S.R., Houghton, G.C., Copeland, R.A., Covington, M.B., Trzaskos, J.M., and Magolda, R.L., *Terphenyl cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: optimization of the central ring and o-biphenyl analogs*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999. **9**(7): p. 919-924.
111. Negi, V.J., Sharma, A.K., and Ram, V., *Synthesis and biological evaluation of 4-(substituted phenylsulfamoyl)-2-hydroxyphenyl acetate derivatives as potent anti-inflammatory and selective COX-2 inhibitors*. *Pharma Chem.*, 2013. **5**(3): p. 18-25.
112. Adel Moallem, S., Hadizadeh, F., and Yavar, I., *New N-aryl-4-(methylsulfonyl)aminobenzenesulfonamides as selective COX-2 inhibitors*. *J. Biol. Sci. (Faisalabad, Pak.)*, 2011. **11**(8): p. 496-499.
113. Silva, T., Borges, F., Edraki, N., Alizadeh, M., Miri, R., Saso, L., and Firuzi, O., *Hydroxycinnamic acid as a novel scaffold for the development of cyclooxygenase-2 inhibitors*. *RSC Adv.*, 2015. **5**(72): p. 58902-58911.
114. Zarghi, A., Ghodsi, R., Azizi, E., Daraie, B., Hedayati, M., and Dadrass, O.G., *Synthesis and biological evaluation of new 4-carboxyl quinoline derivatives as cyclooxygenase-2 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009. **17**(14): p. 5312-5317.
115. Chakraborti, A.K., Garg, S.K., Kumar, R., Motiwala, H.F., and Jadhavar, P.S., *Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far*. *Curr. Med. Chem.*, 2010. **17**(15): p. 1563-1593.
116. Singh, S.K., Saibaba, V., Ravikumar, V., Rudrawar, S.V., Daga, P., Rao, C.S., Akhila, V., Hegde, P., and Rao, Y.K., *Synthesis and biological evaluation of 2,3-diarylpyrazines and quinoxalines as selective COX-2 inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004. **12**(8): p. 1881-1893.
117. Shah, U.A., Deokar, H.S., Kadam, S.S., and Kulkarni, V.M., *Pharmacophore generation and atom-based 3D-QSAR of novel 2-(4-methylsulfonylphenyl)pyrimidines as COX-2 inhibitors*. *Mol. Diversity*, 2010. **14**(3): p. 559-568.
118. Jawabrah Al-Hourani, B., Sharma, S.K., Suresh, M., and Wuest, F., *Cyclooxygenase-2 inhibitors: a literature and patent review (2009 - 2010)*. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2011. **21**(9): p. 1339-1432.

119. Devesa, I., Alcaraz, M.J., Riguera, R., and Ferrandiz, M.L., *A new pyrazolo pyrimidine derivative inhibitor of cyclooxygenase-2 with anti-angiogenic activity*. Eur. J. Pharmacol., 2004. **488**(1-3): p. 225-230.
120. Santagati, A., Granata, G., Marrazzo, A., and Santagati, M., *Synthesis and effects on the COX-1 and COX-2 activity in human whole blood ex vivo of derivatives containing the [1]benzothienol[3,2-d]pyrimidin-4-one heterocyclic system*. Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.), 2003. **336**(9): p. 429-435.
121. Raffa, D., Maggio, B., Plescia, F., Cascioferro, S., Raimondi, M.V., Plescia, S., and Cusimano, M.G., *Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Derivatives as COX-2 Selective Inhibitors: Synthesis and Molecular Modelling Studies*. Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.), 2009. **342**(6): p. 321-326.
122. Rao, P.N.P., Uddin, M.J., and Knaus, E.E., *Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Studies of 3,4,6-Triphenylpyran-2-ones as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors*. J. Med. Chem., 2004. **47**(16): p. 3972-3990.
123. Zhang, Y., Tortorella, M.D., Wang, Y., Liu, J., Tu, Z., Liu, X., Bai, Y., Wen, D., Lu, X., Lu, Y., and Talley, J.J., *Synthesis of Deuterated Benzopyran Derivatives as Selective COX-2 Inhibitors with Improved Pharmacokinetic Properties*. ACS Med. Chem. Lett., 2014. **5**(10): p. 1162-1166.
124. Wang, J.L., Aston, K., Limburg, D., Ludwig, C., Hallinan, A.E., Koszyk, F., Hamper, B., Brown, D., Graneto, M., Talley, J., Maziasz, T., Masferrer, J., and Carter, J., *The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part III: The three microdose candidates*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010. **20**(23): p. 7164-7168.
125. Wang, J.L., Carter, J., Kiefer, J.R., Kurumbail, R.G., Pawlitz, J.L., Brown, D., Hartmann, S.J., Graneto, M.J., Seibert, K., and Talley, J.J., *The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors-part I: The first clinical candidate*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010. **20**(23): p. 7155-7158.
126. Grover, J., Kumar, V., Sobhia, M.E., and Jachak, S.M., *Synthesis, biological evaluation and docking analysis of 3-methyl-1-phenylchromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-ones as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2014. **24**(19): p. 4638-4642.
127. Begum, T., Mohammed, T., and Khan, S.A., *Mannich bases of 7-hydroxy coumarins and their biological activity*. World J. Pharm. Pharm. Sci., 2015. **4**(1): p. 26-37.
128. Zebardast, T., Zarghi, A., Daraie, B., Hedayati, M., and Dadrass, O.G., *Design and synthesis of 3-alkyl-2-aryl-1,3-thiazinan-4-one derivatives as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009. **19**(12): p. 3162-3165.
129. Zarghi, A., Zebardast, T., Daraie, B., and Hedayati, M., *Design and synthesis of new 1,3-benzthiazinan-4-one derivatives as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors*. Bioorg. Med. Chem., 2009. **17**(15): p. 5369-5373.
130. Uddin, M.J., Rao, P.N.P., Rahim, M.A., McDonald, R., and Knaus, E.E., *A new class of acyclic 2-alkyl-1,2-diaryl (E)-olefins as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004. **14**(19): p. 4911-4914.
131. Uddin, M.J., Rao, P.N.P., McDonald, R., and Knaus, E.E., *Design and synthesis of (E)-1,1,2-triarylethenes: novel inhibitors of the cyclooxygenase-2 (COX-2) isozyme*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005. **15**(2): p. 439-442.
132. Johnson, A.R., Marletta, M.A., and Dyer, R.D., *Slow-Binding Inhibition of Human Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 with Darbufelone, an Isoform-Selective Antiinflammatory Di-tert-butyl Phenol*. Biochemistry, 2001. **40**(25): p. 7736-7745.
133. Dadashpour, S., Kucukkilinc, T.T., Tan, O.U., Ozadali, K., Irannejad, H., and Emami, S., *Design, Synthesis and In Vitro Study of 5,6-Diaryl-1,2,4-triazine-3-ylthioacetate*

- Derivatives as COX-2 and β -Amyloid Aggregation Inhibitors*. Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.), 2015. **348**(3): p. 179-187.
134. Irannejad, H., Kebriaieezadeh, A., Zarghi, A., Montazer-Sadegh, F., Shafiee, A., Assadieskandar, A., and Amini, M., *Synthesis, docking simulation, biological evaluations and 3D-QSAR study of 5-Aryl-6-(4-methylsulfonyl)-3-(methylthio)-1,2,4-triazine as selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. Bioorg. Med. Chem., 2014. **22**(2): p. 865-873.
 135. Bhardwaj, A., Kaur, J., Sharma, S.K., Huang, Z., Wuest, F., and Knaus, E.E., *Hybrid fluorescent conjugates of COX-2 inhibitors: Search for a COX-2 isozyme imaging cancer biomarker*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2013. **23**(1): p. 163-168.
 136. Chen, Q.-H., Rao, P.N.P., and Knaus, E.E., *Design, synthesis, and biological evaluation of linear 1-(4-, 3- or 2-methylsulfonylphenyl)-2-phenylacetylenes: A novel class of cyclooxygenase-2 inhibitors*. Bioorg. Med. Chem., 2005. **13**(23): p. 6425-6434.
 137. Zarghi, A., Arfaee, S., Rao, P.N.P., and Knaus, E.E., *Design, synthesis, and biological evaluation of 1,3-diarylprop-2-en-1-ones : A novel class of cyclooxygenase-2 inhibitors*. Bioorg. Med. Chem., 2006. **14**(8): p. 2600-2605.
 138. Bandgar, B.P., Patil, S.A., Gacche, R.N., Korbadi, B.L., Hote, B.S., Kinkar, S.N., and Jalde, S.S., *Synthesis and biological evaluation of nitrogen-containing chalcones as possible anti-inflammatory and antioxidant agents*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010. **20**(2): p. 730-733.
 139. El-Sayed, M.A.A., Abdel-Aziz, N.I., Abdel-Aziz, A.A.M., El-Azab, A.S., Asiri, Y.A., and El Tahir, K.E.H., *Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors: Molecular docking study*. Bioorg. Med. Chem., 2011. **19**(11): p. 3416-3424.
 140. Palkar, M.B., Praveen, D.M., Ronad, P.M., Viswanathswamy, A.H.M., Rane, R.A., Patel, H.M., Shaikh, M.S., Hampannavar, G.A., Jain, K.S., and Karpoornath, R., *Novel series of phenylalanine analogs endowed with promising anti-inflammatory activity: synthesis, pharmacological evaluation, and computational insights*. Med. Chem. Res., 2015. **24**(5): p. 1988-2004.
 141. Che, H., Tuyen, T.N., Kim, H.P., and Park, H., *1,5-Diarylimidazoles with strong inhibitory activity against COX-2 catalyzed PGE2 production from LPS-induced RAW 264.7 cells*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010. **20**(14): p. 4035-4037.
 142. Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M., *Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002*. J. Nat. Prod., 2003. **66**(7): p. 1022-1037.
 143. Barnett, J.W., Dunn, J.P., Kertesz, D.J., Miller, A.B., Morgans, D.J., Jr., Ramesha, C.S., Sigal, C.E., Sjogren, E.B., Smith, D.B., and Talamas, F.X., *Pyrrrole derivatives*. 1996, F. Hoffmann-La Roche Ag, Switz. . p. 55 pp.
 144. Ouimet, N., Chan, C.-C., Charleson, S., Claveau, D., Gordon, R., Guay, D., Li, C.-S., Ouellet, M., Percival, D.M., Riendeau, D., Wong, E., Zamboni, R., and Prasit, P., *Substituted heterocyclic analogs as selective COX-2 inhibitors in the flosulide class*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999. **9**(2): p. 151-156.
 145. Abdur Rahim, M., Praveen Rao, P.N., Bhardwaj, A., Kaur, J., Huang, Z., and Knaus, E.E., *Isomeric acetoxy analogs of celecoxib and their evaluation as cyclooxygenase inhibitors*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2011. **21**(20): p. 6074-6080.
 146. Zarghi, A., Rao, P.N.P., and Knaus, E.E., *Synthesis and biological evaluation of methanesulfonamide analogues of rofecoxib: Replacement of methanesulfonyl by methanesulfonamido decreases cyclooxygenase-2 selectivity*. Bioorg. Med. Chem., 2007. **15**(2): p. 1056-1061.

147. Zarghi, A., Rao, P.N.P., and Knaus, E.E., *Design and synthesis of new rofecoxib analogs as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: replacement of the methanesulfonyl pharmacophore by an N-acetylsulfonamido bioisostere*. J. Pharm. Pharm. Sci., 2007. **10**(2): p. 159-167.
148. Abdur Rahim, M., Praveen Rao, P.N., and Knaus, E.E., *Isomeric acetoxy analogues of rofecoxib: A novel class of highly potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002. **12**(19): p. 2753-2756.
149. Abdellatif, K.R.A., Abdelgawad, M.A., and Helmy, N.A., *Synthesis of new rofecoxib analogs of expected anti-inflammatory activity*. Eur. J. Exp. Biol., 2013. **3**(2): p. 524-534.
150. Bhardwaj, A., Huang, Z., Kaur, J., and Knaus, E.E., *Rofecoxib Analogues Possessing a Nitric Oxide Donor Sulfohydroxamic Acid (SO₂NHOH) Cyclooxygenase-2 Pharmacophore: Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation as Anti-inflammatory Agents*. ChemMedChem, 2012. **7**(1): p. 62-67.
151. Kim, S.-H., Margalit, O., Katoh, H., Wang, D., Wu, H., Xia, D., Holla, V.R., Yang, P., and DuBois, R.N., *CG100649, a novel COX-2 inhibitor, inhibits colorectal adenoma and carcinoma growth in mouse models*. Invest. New Drugs, 2014. **32**(6): p. 1105-1112.
152. Lichtenberger, L.M., Ulloa, C., Romero, J.J., Vanous, A.L., Illich, P.A., and Dial, E.J., *Nonsteroidal anti-inflammatory drug and phospholipid prodrugs: Combination therapy with antisecretory agents in rats*. Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 990-995.
153. Giraud, M.N., Sanduja, S.K., Felder, T.B., Illich, P.A., Dial, E.J., and Lichtenberger, L.M., *Effect of omeprazole on the bioavailability of unmodified and phospholipid-complexed aspirin in rats*. Aliment. Pharmacol. Ther., 1997. **11**(5): p. 899-906.
154. Wolfe, M.M., *Future trends in the development of safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Am. J. Med., 1998. **105**(5A): p. 44S-52S.
155. Puhlmann, U., Schaefer, D., and Ziemann, C., *Update on COX-2 inhibitor patents with a focus on optimised formulation and therapeutic scope of drug combinations making use of COX-2 inhibitors*. Expert Opin. Ther. Pat., 2006. **16**(4): p. 403-430.
156. Coruzzi, G., Venturi, N., and Spaggiari, S., *Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond*. Acta Bio Med. Atenei Parmensis, 2007. **78**(2): p. 96-110.
157. Marnett, L.J., *The COXIB experience: a look in the rearview mirror*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2009. **49**: p. 265-290.
158. Rainsford, K.D., *Anti-inflammatory drugs in the 21st century*. Subcell Biochem, 2007. **42**: p. 3-27.
159. Patrignani, P., Tacconelli, S., Sciulli, M.G., and Capone, M.L., *New insights into COX-2 biology and inhibition*. Brain Res. Rev., 2005. **48**(2): p. 352-359.
160. Casturi, S.R., Hegde, P., and Ramanujam, R., *Development of COX-2 selective inhibitors - therapeutic perspectives*. Curr. Med. Chem.: Immunol., Endocr. Metab. Agents, 2005. **5**(3): p. 241-248.
161. Shi, S. and Klotz, U., *Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors*. Eur. J. Clin. Pharmacol., 2008. **64**(3): p. 233-252.
162. Yuan, Y. and Hunt, R.H., *Assessment of the safety of selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors: where are we in 2003?* Inflammopharmacology, 2003. **11**(4-6): p. 337-354.
163. Khanna, D., Khanna, P.P., and Furst, D.E., *COX-2 controversy: where are we and where do we go from here?* Inflammopharmacology, 2005. **13**(4): p. 395-402.
164. Cirino, G., *Nitric oxide releasing drugs: from bench to bedside*. Dig. Liver Dis., 2003. **35**(Suppl. 2): p. S2-S8.

165. Suthar, S.K. and Sharma, M., *Recent Developments in Chimeric NSAIDs as Safer Anti-Inflammatory Agents*. Med. Res. Rev., 2015. **35**(2): p. 341-407.
166. Charlier, C. and Michaux, C., *Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Eur. J. Med. Chem., 2003. **38**(7-8): p. 645-659.
167. Lichtenberger, L.M., Wang, Z.-M., Romero, J.J., Ulloa, C., Perez, J.C., Giraud, M.-N., and Barreto, J.C., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury*. Nat. Med. (N. Y.), 1995. **1**(2): p. 154-8.
168. De Leval, X., Julemont, F., Delarge, J., Sanna, V., Pirotte, B., and Dogne, J.-M., *Advances in the field of COX-2 inhibition*. Expert Opin. Ther. Pat., 2002. **12**(7): p. 969-989.
169. Rainsford, K.D., *Structure-activity relationships of non-steroid antiinflammatory drugs I. Gastric ulcerogenic activity*. Agents Actions, 1978. **8**(6): p. 587-605.
170. Simon, L.S., *The COX 2 selective inhibitors: what the newspapers have not told you*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2007. **65**(3): p. 229-41.
171. Green, G.A., *Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2*. Clin Cornerstone, 2001. **3**(5): p. 50-60.
172. Botting, R.M., *Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004)*. J. Therm. Biol., 2006. **31**(1-2): p. 208-219.
173. Parente, L. and Perretti, M., *Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight*. Biochem. Pharmacol., 2003. **65**(2): p. 153-159.
174. Wallace, J.L., *Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)*. Am. J. Med., 1999. **107**(6A): p. 11S-17S.
175. Black, W.C., *Selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. Annu. Rep. Med. Chem., 2004. **39**: p. 125-138.
176. Bjarnason, I. and Thjodleifsson, B., *The murky world of the COX-2-selective agents*. Inflammopharmacology, 2005. **13**(4): p. 381-393.
177. Gatti, D. and Adami, S., *Coxibs: a significant therapeutic opportunity*. Acta Biomed, 2010. **81**(3): p. 217-24.
178. Harirforoosh, S., Asghar, W., and Jamali, F., *Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications*. J. Pharm. Pharm. Sci., 2013. **16**(4): p. 821-847, 27 pp.
179. Ong, C.K.S., Lirk, P., Tan, C.H., and Seymour, R.A., *An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Clin. Med. Res., 2007. **5**(1): p. 19-34.
180. Simmons, D.L., Botting, R.M., and Hla, T., *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. Pharmacol. Rev., 2004. **56**(3): p. 387-437.
181. Kawai, S., Kojima, F., and Kusunoki, N., *Recent advances in nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Allergol. Int., 2005. **54**(2): p. 209-215.
182. Fosslien, E., *Review: cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Ann. Clin. Lab. Sci., 2005. **35**(4): p. 347-385.
183. Hermann, M. and Ruschitzka, F., *Coxibs, non-steroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk*. Intern. Med. J., 2006. **36**(5): p. 308-319.
184. Zarghi, A. and Arfaei, S., *Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships*. Iran. J. Pharm. Res., 2011. **10**(4): p. 655-683.
185. Kirby, N.S., Lundberg, M.H., Harrington, L.S., Leadbeater, P.D.M., Milne, G.L., Potter, C.M.F., Al-Yamani, M., Adeyemi, O., Warner, T.D., and Mitchell, J.A., *Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production*

- of prostacyclin in the cardiovascular system*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Early Ed., 2012(Oct. 8 2012): p. 1-6, 6 pp.
186. Mattia, C. and Coluzzi, F., *COX-2 inhibitors: pharmacological data and adverse effects*. Minerva Anesthesiol, 2005. **71**(7-8): p. 461-70.
 187. Grosser, T., *The pharmacology of selective inhibition of COX-2*. Thromb. Haemostasis, 2006. **96**(4): p. 393-400.
 188. Bennett, A. and Tavares, I.A., *COX-2 inhibitors compared and contrasted*. Expert Opin. Pharmacother., 2001. **2**(11): p. 1859-1876.
 189. Jackson, L.M. and Hawkey, C.J., *COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Do they really offer any advantages?* Drugs, 2000. **59**(6): p. 1207-1216.
 190. Harris, R.C. and Breyer, M.D., *Update on cyclooxygenase-2 inhibitors*. Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2006. **1**(2): p. 236-245.
 191. Katori, M. and Majima, M., *Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors*. Inflammation Res., 2000. **49**(8): p. 367-392.
 192. Kumar, A. and Gaur, A., *Remembering cyclooxygenases: a brief review*. Asian J. Pharm. Technol. Innovation, 2014. **2**(4): p. 1-8.
 193. Kilico, I., Kokcu, A., Kefeli, M., and Kandemir, B., *Regression of Experimentally Induced Endometriosis with a New Selective Cyclooxygenase-2 Enzyme Inhibitor*. Gynecol. Obstet. Invest., 2014. **77**(1): p. 35-39.
 194. Sharma, J.N. and Jawad, N.M., *Adverse effects of COX-2 inhibitors*. TheScientificWorld, 2005. **5**(Aug.): p. 629-645.
 195. Blain, H., Jouzeau, J.Y., Netter, P., and Jeandel, C., *Non-steroidal anti-inflammatory agents with selective inhibitory activity on cyclooxygenase-2. Interest and future prospects*. Rev Med Interne, 2000. **21**(11): p. 978-88.
 196. Pairet, M. and Engelhardt, G., *Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: Possible physiological and therapeutic implications*. Fundam. Clin. Pharmacol., 1996. **10**(1): p. 1-15.
 197. Vane, J.R. and Botting, R.M., *Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action*. Inflammation Res., 1998. **47**(Suppl.2): p. S78-S87.
 198. Savage, R., *Cyclo-oxygenase-2 inhibitors: when should they be used in the elderly?* Drugs Aging, 2005. **22**(3): p. 185-200.
 199. Hilario, M.O.E., Terreri, M.T., and Len, C.A., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors*. J Pediatr (Rio J), 2006. **82**(5 Suppl): p. S206-12.
 200. Tsujii, M. and DuBois, R.N., *Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2*. Cell, 1995. **83**(3): p. 493-501.
 201. He, T.-C., Chan, T.A., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W., *PPAR δ is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Cell (Cambridge, Mass.), 1999. **99**(3): p. 335-345.
 202. Luan, Y. and Xu, W., *The function of the selective inhibitors of cyclooxygenase 2*. Mini-Rev. Med. Chem., 2006. **6**(12): p. 1375-1381.
 203. Hayashi, S., Ueno, N., Murase, A., and Takada, J., *Design, synthesis and structure-activity relationship studies of novel and diverse cyclooxygenase-2 inhibitors as anti-inflammatory drugs*. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2014. **29**(6): p. 846-867.
 204. Thun, M.J., Henley, S.J., and Pairono, C., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues*. J. Natl. Cancer Inst., 2002. **94**(4): p. 252-266.
 205. Turini, M.E. and DuBois, R.N., *Cyclooxygenase-2: a therapeutic target*. Annu. Rev. Med., 2002. **53**: p. 35-57.

206. Bovill, J.G., *Pharmacology and clinical action of COX-2 selective NSAIDs*. Adv. Exp. Med. Biol., 2003. **523**(Advances in Modelling and Clinical Application of Intravenous Anaesthesia): p. 201-214.
207. Williams, G.W., *An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors*. Curr Pain Headache Rep, 2005. **9**(6): p. 377-89.
208. Chung, S., Lim, K.M., and Shin, S.S., *Profiles of COX-2 inhibitors: present and future*. Expert Opin. Ther. Pat., 2005. **15**(1): p. 9-32.
209. Corley, D.A., Kerlikowske, K., Verma, R., and Buffler, P., *Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: A systematic review and meta-analysis*. Gastroenterology, 2003. **124**(1): p. 47-56.
210. Xiao, J., Tan, Y., Pan, Y., Liang, G., Qu, C., Zhang, X., Zhang, Y., Li, X., and Yang, H., *A new cyclooxygenase-2 inhibitor, (1E,4E)-1,5-bis(2-bromophenyl)penta-1,4-dien-3-one (GL63) suppresses cyclooxygenase-2 gene expression in human lung epithelial cancer cells: coupled mRNA stabilization and posttranscriptional inhibition*. Biol. Pharm. Bull., 2010. **33**(7): p. 1170-1175.
211. Vosooghi, M. and Amini, M., *The discovery and development of cyclooxygenase-2 inhibitors as potential anticancer therapies*. Expert Opin. Drug Discovery, 2014. **9**(3): p. 255-267.
212. Carvalho, W.A., Carvalho, R.D.S., and Rios-Santos, F., *Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesics: therapeutic advances*. Rev. Bras. Anesthesiol., 2004. **54**(3): p. 448-464.
213. Takeda, S., Okazaki, H., Ikeda, E., Abe, S., Yoshioka, Y., Watanabe, K., and Aramaki, H., *Down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) by cannabidiolic acid in human breast cancer cells*. J. Toxicol. Sci., 2014. **39**(5): p. 711-716.
214. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., Finch, C.E., Frautschy, S., Griffin, W.S.T., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L.F., Mrak, R., Mackenzie, I.R., McGeer, P.L., O'Banion, M.K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., and Wyss-Coray, T., *Inflammation and Alzheimer's disease*. Neurobiol. Aging, 2000. **21**(3): p. 383-421.
215. McGeer, P.L. and McGeer, E.G., *NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies*. Neurobiol. Aging, 2007. **28**(5): p. 639-647.
216. Vlad, S.C., Miller, D.R., Kowall, N.W., and Felson, D.T., *Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease*. Neurology, 2008. **70**(19, Pt. 1): p. 1672-1677.
217. Aisen, P.S., Thal, L.J., Ferris, S.H., Assaid, C., Nessly, M.L., Giuliani, M.J., Lines, C.R., Norman, B.A., and Potter, W.Z., *Rofecoxib in patients with mild cognitive impairment: further analyses of data from a randomized, double-blind, trial*. Curr. Alzheimer Res., 2008. **5**(1): p. 73-82.
218. Cole, G.M. and Frautschy, S.A., *Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease*. CNS Neurol. Disord.: Drug Targets, 2010. **9**(2): p. 140-148.
219. Teismann, P., *COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease*. BioFactors, 2012. **38**(6): p. 395-397.
220. Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.-K., Wu, D.-C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S., *Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2003. **100**(9): p. 5473-5478.

**Troisième partie : Les méthodes de
criblages *in silico***

III.1 Généralités

Les méthodes de criblages *in silico* ont été développées pour diminuer le coût et le temps considérable nécessaires au processus de R&D d'un nouveau médicament [77, 78].

Les méthodes de criblage virtuel ont rapidement montré leur efficacité et leur utilité dès 1990 en guidant les scientifiques sur les molécules les plus actives parmi de grandes bibliothèques de composés. Le but des méthodes de criblage virtuel est d'éliminer, par le biais de filtres, les molécules inactives, toxiques, ou présentant des effets indésirables. A partir de millions de molécules initiales, ce sont quelques milliers de molécules [79] qui sont retenues et qui seront évaluées expérimentalement.

Les méthodes de criblage virtuel font désormais partie intégrante du processus R&D en permettant de réduire le nombre considérable de molécules à tester expérimentalement et en identifiant les molécules les plus prometteuses dans les phases d'identification de hits et d'optimisation des leads.

De nombreuses méthodes de criblage *in silico* ont été développées, divisées en 2 grandes classes selon les données disponibles. Lorsque la structure de la cible biologique a été résolue (cristallographie aux rayons X, résonance magnétique nucléaire (RMN), microscopie électronique ou modèles de structure), les méthodes « structure-based » ou « basées sur la structure » peuvent être utilisées. Elles permettent d'évaluer et de sélectionner les molécules capables de réaliser des interactions dans le site actif de la cible biologique [78]. La seconde classe regroupe les méthodes « ligand-based », ou « basées sur les ligands » et repose sur le principe que les molécules similaires partagent des propriétés similaires. Ces méthodes requièrent des informations sur les ligands bioactifs de la cible biologique étudiée.

Ces deux types de méthodes, utilisés seuls [80] ou en combinaison [81], ont fait leur preuve en révélant des molécules susceptibles d'être actives [80].

Par la suite, nous nous sommes particulièrement intéressés aux modèles pharmacophoriques et aux méthodes de docking.

III.2 Les modèles pharmacophoriques

Le concept de pharmacophore a été instauré pour la première fois en 1909, par Paul Ehrlich, [82] qui rapporte que certains groupes ou fonctions chimiques portés par une molécule sont responsables de l'effet biologique et que des molécules qui ont des effets similaires ont des

fonctions chimiques similaires [83]. Cinquante ans plus tard, le terme « pharmacophore » a été introduit par Schueler [84] qui le définit comme un système moléculaire qui porte (phoros) les caractéristiques essentielles responsables de l'activité biologique d'un médicament (pharmacon) [83, 85, 86].

La définition officielle donnée par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) date de 1997 et indique qu'« un pharmacophore possède l'ensemble des propriétés stériques et électroniques d'une molécule nécessaires pour assurer l'établissement d'interactions supramoléculaires optimales avec une cible biologique spécifique et engendrer ou bloquer une réponse biologique » [87]. Un pharmacophore ne représente pas une molécule ou une association de groupes fonctionnels mais un concept abstrait qui prend en compte les capacités d'un groupe de composés à réaliser des interactions moléculaires communes avec la structure de leur cible [83, 86]. Ces interactions sont définies comme les points pharmacophoriques : les donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène, les groupements cationiques et anioniques réalisant des interactions ioniques, les groupements aromatiques conduisant à du π -stacking et les groupements hydrophobes donnant des interactions hydrophobes [83] (Figure 12).

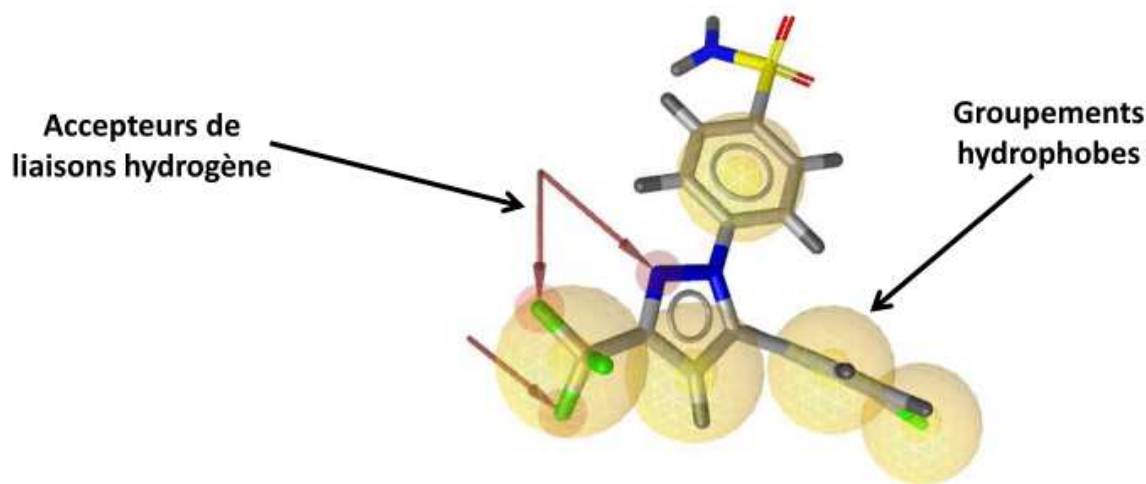


Figure 12 : Un exemple de pharmacophore généré avec le logiciel LigandScout 4.0, représentant le ligand S58 (1CX2), un inhibiteur sélectif de COX-2 (flèches rouges : groupements accepteurs de liaisons hydrogène, sphères jaunes : groupements hydrophobes)

Les approches pharmacophoriques ont été largement utilisées dans les processus de découverte de nouveaux médicaments, et ce notamment dans la phase d'optimisation [85].

Un modèle pharmacophorique peut être établi soit par une approche « ligand-based » en superposant des molécules actives et en extrayant les caractéristiques physicochimiques communes essentielles à leur activité biologique, soit par l'approche « structure-based » en recherchant les points d'interaction entre la cible et les ligands [85].

III.2.1 Modèles pharmacophoriques « ligand-based »

III.2.1.1 Approches pharmacophoriques 2D

Ces approches utilisent des descripteurs 2D capables de caractériser les points pharmacophoriques des ligands. Ces méthodes sont intéressantes puisqu'elles se basent tout particulièrement sur la connectivité des atomes du ligand permettant ainsi de réduire les temps de calculs.

CATS 2D (Chemically Advanced Template Search)

Cette méthode traduit la structure 2D du ligand en un graphe moléculaire où chaque noeud représente un point pharmacophorique (Figure 13) [88].

Chaque atome de la molécule se voit attribuer un des cinq points pharmacophoriques : lipophile, donneur de liaison hydrogène, accepteur de liaison hydrogène, ionisable positif et ionisable négatif. Les paires de points pharmacophoriques sont reliées ensemble selon le chemin le plus court en termes de liaison.

Enfin le nombre normalisé d'occurrences de chaque paire de points pharmacophoriques en fonction des distances constitue un vecteur. Ce vecteur servira de comparaison entre les molécules [88-90].

La similarité entre deux molécules est évaluée grâce à la mesure de la distance euclidienne : plus la distance est petite, plus les molécules se ressemblent et plus leur activité biologique est susceptible d'être similaire [91].

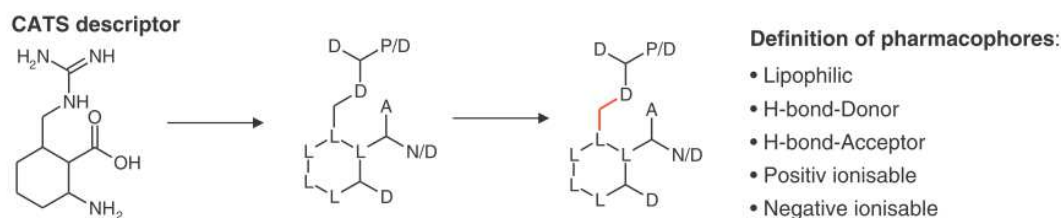


Figure 13 : Exemple illustrant les descripteurs CATS 2D [88]

Similog keys

Les “Similog keys” (Figure 14) sont une variante de la méthode CATS 2D.

Des “Similog keys” définissent des triplets d’atomes et sont caractérisés par le nombre de liaisons séparant les atomes et les propriétés de l’atome : donneur ou accepteur de liaisons hydrogène, encombrement, et électropositivité [89, 92].

La représentation d’un ligand est un vecteur précisant les occurrences des différents “Similog keys” dans la structure du ligand. Par la suite ce vecteur sera utilisé comme outil de comparaison pour évaluer la similarité entre différentes molécules [89, 92].

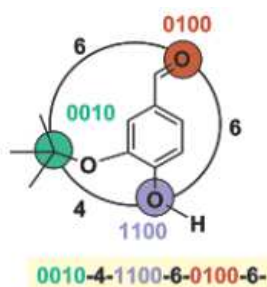


Figure 14 : Représentation de « Similog keys » : le tert-butyle considéré comme encombrant est codé 0010, l’hydroxyle de l’alcool pouvant être un accepteur de liaisons hydrogène (0100) et/ou donneur de liaisons hydrogène (1000), est codé 1100 et l’aldéhyde étant un accepteur de liaisons d’hydrogène est codé 0100 [92]

MACCS keys (Molecular Access System)

Cette méthode, similaire à la méthode de “Similog keys”, représente la structure du ligand par un vecteur qui codifie d’une part la présence ou l’absence des différents fragments ou points pharmacophoriques et d’autre part leurs positions dans la structure (Figure 15) [92].

Ces fragments / points pharmacophoriques sont définis dans des tables par la nature des atomes (halogène, azote, oxygène...), les propriétés de l’atome (appartenance ou non à un cycle aromatique, les différents types de liaisons...) et l’environnement atomique (connectivité entre les atomes) [93]. Ensuite, pour chaque fragment les keys assignent un chiffre spécifique à la caractéristique chimique du fragment (Key position), décrivent la caractéristique chimique de ce fragment (Key description) et indiquent la présence ou l’absence de ce fragment dans la molécule étudiée (Key code)[94]. En tout, MACCS contient 166 keys de structures qui permettent de définir l’empreinte du ligand qui sera par la suite comparée à d’autres molécules pour évaluer leur similarité.

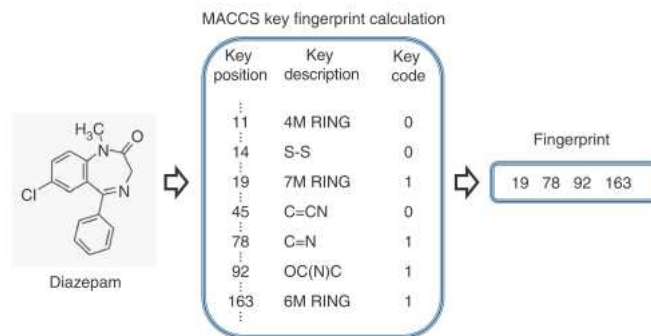
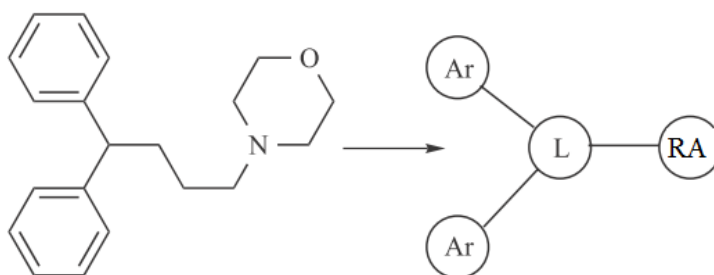


Figure 15 : Exemple de quelques MACCS keys utilisés pour décrire l’empreinte partielle du diazepam : le numéro 19 indique un cycle à 7 chaînons (seven-member ring), 78 précise le groupe C=N, 92 décrit le groupe OC(N)C et 163 représente un cycle à 6 chaînons (six-member ring) [94]

RG (Reduced Graphs)

La méthode des graphes réduits consiste à représenter chaque groupe chimique du ligand par un nœud en conservant la connectivité entre eux. La description des caractéristiques chimiques de la molécule y est très simple et indicative (ex : cyclique ou acyclique). Ainsi la représentation globale du ligand est approximative et moins complexe [89, 95]. Les graphes réduits sont considérés comme des descripteurs topologiques de pharmacophores (Figure 16) [96].



Nodes values : Ar =aromatic ring, L= linker, RA = alicyclic ring, hydrogen bond acceptor

Figure 16 : Exemple de graphes réduits, adapté selon [89, 95, 96]

Extended Reduced Graphs (ErG)

La méthode ErG est une variante de la méthode des graphes réduits (Figure 17). La structure du ligand est représentée *via* des nœuds reliés entre eux. Chaque nœud correspond à un point pharmacophorique, supposé essentiel aux interactions ligand-récepteur [97].

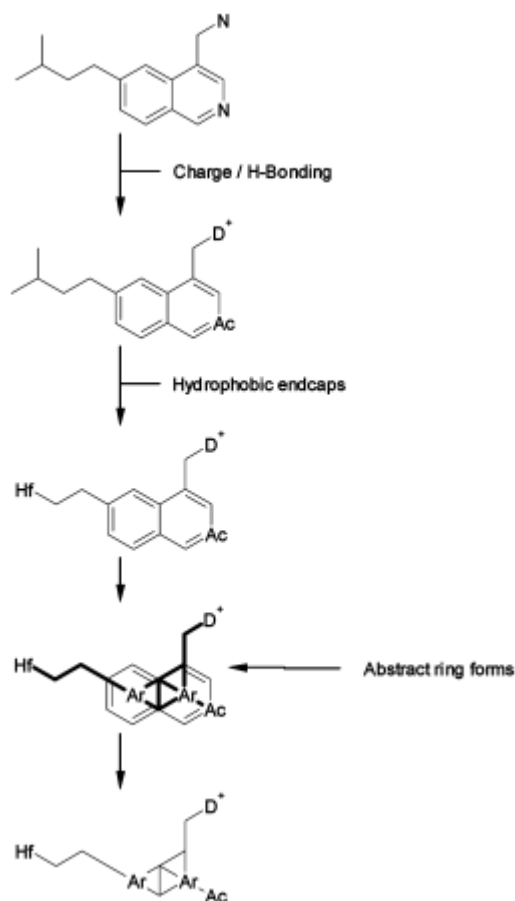


Figure 17 : Exemple d'une structure convertie selon la méthode ErG. (D : donneur de liaison hydrogène, Ac : accepteur de liaison hydrogène, Hf : groupement hydrophobe situé à l'extrémité de la structure, Ar : cycle aromatique, + : charge positive). Adapté selon [97]

La structure finale est ensuite convertie en un vecteur formé de triplets de la forme : Point Pharmacophorique 1 - distance topologique - Point Pharmacophorique 2. Par la suite ce vecteur servira de comparaison entre le ligand et différentes molécules afin d'évaluer leur similarité.

Les Feature Trees

La méthode des « feature trees » (Figure 18) représente la structure du ligand sous la forme d'un arbre où chaque nœud représente un point pharmacophorique et décrit les propriétés chimiques des différents groupes d'atomes constituant le ligand. Cette méthode est une variante plus précise de la méthode des graphes réduits [88, 89, 98] puisqu'elle indique les propriétés des groupes d'atomes du ligand participant à l'établissement de liaisons entre le ligand et sa cible [88, 98].

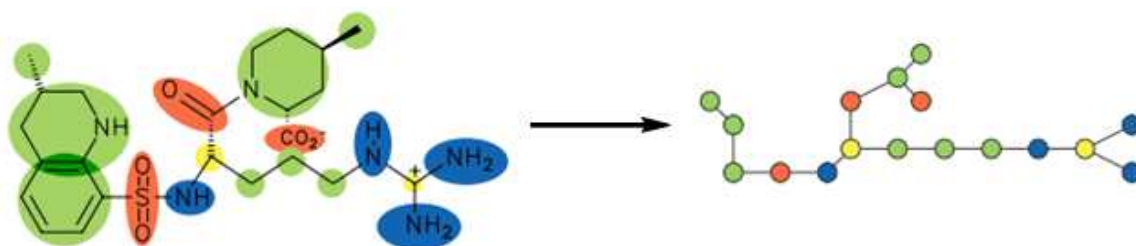


Figure 18 : Exemple d'un « feature tree ». Les nœuds, de couleurs différentes, représentent les groupes chimiques capables d'établir des interactions. (vert : hydrophobes, rouge : accepteurs de liaisons hydrogène, bleu : donneurs de liaisons hydrogène, jaune : pas d'interaction directe) [99]

La similarité entre deux molécules est évaluée par une procédure de matching entre les deux arbres correspondants. Les arbres sont alignés en superposant un maximum de nœuds et un score est attribué selon la qualité du matching (0 signifie une dissimilarité complète entre les deux molécules, et 1 signifie que les molécules sont identiques) [88, 98].

Les méthodes 2D se sont révélées très utiles lors d'un criblage *in silico* [89, 100], cependant, elles identifient en général des molécules similaires au ligand de référence [90] et ne prennent pas en compte la flexibilité conformationnelle. De nouvelles approches pharmacophoriques 3D ont donc été développées [88].

III.2.1.2 Approches pharmacophoriques 3D

A la différence des pharmacophores 2D, les pharmacophores 3D prennent en compte l'arrangement spatial des caractéristiques chimiques essentielles d'une molécule [101]. Les pharmacophores peuvent être générés soit en se basant uniquement sur des ligands bioactifs (« ligand-based ») soit en utilisant un complexe ligand-protéine (« structure-based ») ou de la protéine seule. Dans tous les cas, l'évaluation de la similarité des molécules d'une chimiothèque avec un pharmacophore repose sur la présence ou l'absence de points pharmacophoriques situés rigoureusement dans la même position spatiale que ceux du pharmacophore de référence.

III.2.1.2.1 Approche ligand-based

Pour générer un pharmacophore, plusieurs étapes sont nécessaires :

1) Recherche et identification des ligands de référence

Le choix des ligands de référence (généralement moins de 100 ligands) a un grand impact sur le modèle pharmacophorique final. Pour construire le modèle pharmacophorique, la plupart des méthodes 3D utilisent uniquement les ligands connus comme présentant une activité similaire pour une cible biologique donnée. D'autres méthodes telles que DISCO [102] ou CLEW [103] permettent d'ajouter des ligands inactifs dans le but de trouver l'information structurale qui expliquerait l'inactivité de ces composés et de l'exclure du pharmacophore. Enfin d'autres méthodes, semblables à HypoGen [104], utilisent des valeurs d'activité biologique (très différentes) afin de générer un pharmacophore capable de prédire l'activité de nouvelles molécules. La diversité des ligands de référence permet d'identifier les points pharmacophoriques les plus importants participant à l'établissement d'interactions dans le site actif de la protéine. Cependant les ligands ne doivent pas être trop différents les uns des autres, aux quels cas ils risqueraient de se lier à différents sites de liaison de la protéine. [101].

2) La recherche conformationnelle

Le but de cette recherche est de mettre en évidence la conformation bioactive des ligands de référence, c'est-à-dire la conformation dans laquelle ils se lient au récepteur, car c'est à partir de celle-ci que le pharmacophore sera généré.

Il existe deux manières de procéder à la recherche conformationnelle : soit avant que la création de pharmacophore ; c'est le cas des méthodes DISCO [102] et RAPID [105], soit parallèlement à la génération du pharmacophore comme dans les méthodes de SCAMPI [106], GASP [107] et GAMMA [108].

3) Identification des points pharmacophoriques de chaque ligand de référence

Cette étape consiste à identifier et définir les points pharmacophoriques expliquant potentiellement l'activité biologique des ligands de référence. Ces points peuvent être définis de trois manières :

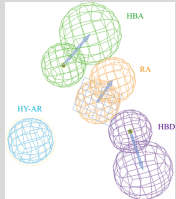
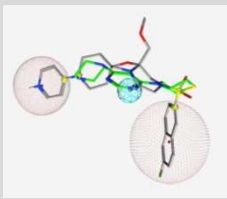
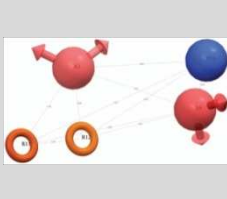
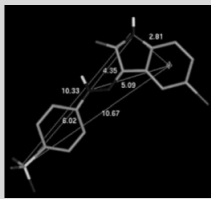
-en se basant sur les atomes : les points définissent le type d'atome et sa position spatiale. Ce type de point est utilisé dans les méthodes MPHIL [109], GAMMA [108] et RAPID [105].

-en se basant sur la topologie : les atomes voisins sont assemblés en groupes chimiques connus (phényle, carbonyle...).

-en se basant sur la fonction : les propriétés chimiques de groupes d'atomes (accepteurs de liaison hydrogène, donneurs de liaison hydrogène, groupes chargés positivement et négativement, aromatiques et groupes hydrophobes) sont utilisées pour traduire les interactions entre le ligand et son récepteur. Cette dernière définition des points pharmacophoriques est la plus répandue et est utilisée dans de nombreuses méthodes telles que : PATTY [110], SCAMPI, [106], CATALYST [111] [112] MOE [113] [114] [115] [116] et PHASE [117]. [118, 119]. En général, ces propriétés pharmacophoriques contiennent un centre et une sphère de tolérance qui accepte la propriété pharmacophorique selon une certaine distance prédéfinie. [120]. Pour les liaisons hydrogènes et aromatiques, la direction (représentée par un vecteur) est souvent précisée, indiquant la position de l'atome correspondant à ces types d'interactions. De plus, chaque point (ou propriété) pharmacophorique contient trois types d'informations : la nature de la propriété (hydrophobe, donneur de liaison hydrogène...), la localisation (précisant les coordonnées du point pharmacophorique) et le poids (précisant l'importance de ce point pharmacophorique) (Figure 19, Tableau 3 et Tableau 4) [120].

Basic pharmacophore features	Hydrogen bond acceptor (HBA)	Matches: sp or sp ² N atoms that have a lone pair and charge less than or equal to zero, sp ³ O or S atoms that have a lone pair and charge less than or equal to zero, nonbasic amines that have a lone pair Does not match: Basic primary, secondary, and tertiary amines, which are protonated at physiological pH
	Hydrogen bond donor (HBD)	Matches: Nonacidic hydroxyls, thiols, acetylenic hydrogens, NHs (except tetrazoles and trifluoromethyl sulfonamide hydrogens) Does not match: Electron-rich pyridines and imidazoles that would be protonated, nitrogens that would be protonated due to their high basicity
	Hydrophobic (HY)	Matches: A neighboring set of atoms that are not adjacent to any concentrations of charge (charged atoms or electronegative atoms), in a conformation such that the atoms have surface accessibility, including phenyl, cycloalkyl, isopropyl, and methyl
	Hydrophobic aliphatic	Matches: This feature is a proper subset of the hydrophobic function definition that includes only aliphatic atoms
	Hydrophobic aromatic	Matches: This feature is a proper subset of the hydrophobic function definition that includes only aromatic atoms
	Negative charge	Matches: Negative charges not adjacent to a positive charge
	Positive charge	Matches: Positive charges not adjacent to a negative charge
	Negative ionizable (NI)	Matches atoms or groups of atoms those are likely to be deprotonated at physiological pH: Trifluoromethyl sulfonamide hydrogens, sulfonic acids (centroid of the three oxygens), phosphonic acids (centroid of the three oxygens), sulfinic, carboxylic, or phosphinic acids (centroid of the two oxygens), tetrazoles, negative charges not adjacent to a positive charge
	Positive ionizable (PI)	Matches atoms or groups of atoms those are likely to be protonated at physiological pH: Basic amines, basic secondary amidines (iminyl nitrogen), basic primary amidines, except guanidines (centroid of the two nitrogens), basic guanidines (centroid of the three nitrogens), positive charges not adjacent to a negative charge Does not match: Weakly basic aromatic nitrogens such as pyridine and imidazole
Ring aromatic (RA)	Matches: Aromatic rings with five or six member atoms	

Figure 19 : Les principaux points pharmacophoriques et leurs définitions. (selon [121])

Propriétés	CATALYST	MOE	PHASE	SCAMPI
Interaction par liaison hydrogène	Sphères centrées sur les atomes lourds et vecteurs indiquant la direction de la liaison hydrogène	Sphères centrées sur les atomes lourds	Vecteurs centrés sur l'atome d'hydrogène (donneur) ou sur l'atome lourd (accepteur) correspondant ou par leur point de projection	Atomes lourds
Groupelements hydrophobes	Sphères	Sphères (les aromatiques ne sont pas considérés comme hydrophobes)	Sphères (les aromatiques ne sont pas considérés comme hydrophobes)	Atomes lourds
Aromatiques	Sphères centrées sur le centroïde et anneaux plans indiquant l'orientation de l'aromatique	Sphères ou anneaux plans	Anneaux centrés sur le centroïde	Centroïdes
Interactions électrostatiques	Sphères (charges non précisées)	Sphères en précisant la charge	Sphères (charges non précisées)	Atomes lourds
Exemple				

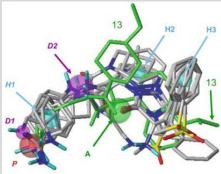
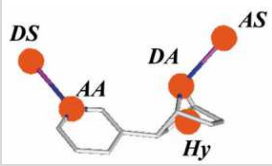
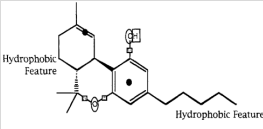
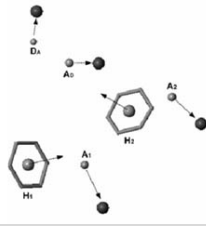
Propriétés	GALAHAD	DISCO	CLEW	GASP
Interaction par liaison hydrogène	Sphères centrées sur les atomes lourds	Sphères centrées sur les atomes lourds ou projections depuis le centre de l'atome vers le groupe complémentaire correspondant	Sphères centrées sur les atomes lourds	Sphères centrées sur les atomes lourds et projections depuis le centre de l'atome vers le groupe complémentaire correspondant
Groupements hydrophobes	Sphères centrées (les aromatiques sont considérés comme hydrophobes)	Sphères centrées sur le centroïde (les aromatiques ne sont pas considérés comme hydrophobes)	Sphères centrées (les aromatiques ne sont pas considérés comme hydrophobes)	Sphères centrées sur le centroïde (les aromatiques sont considérés comme hydrophobes)
Aromatiques	Sphères centrées	Sphères centrées sur le centroïde	Sphères centrées sur le centroïde	Sphères centrées sur le centroïde et vecteur indiquant l'orientation aromatique
Interactions électrostatiques	Sphères centrées précisant la charge	Sphères centrées précisant la charge	Sphères (charges non précisées)	Non défini
Exemple				

Tableau 3 : Différents programmes de génération de pharmacophores

Propriétés	PharmaGist	Pharmer	PharmID
Interaction par liaison hydrogène	Sphères centrées sur les atomes lourds	Sphères centrées sur les atomes lourds	Indiqué sur le modèle pharmacophorique
Groupements hydrophobes	Sphères centrées sur les atomes lourds (aromatiques sont considérés comme des hydrophobes)	Sphères centrées sur les atomes lourds (aromatiques sont considérés comme des hydrophobes)	Indiqué sur le modèle pharmacophorique

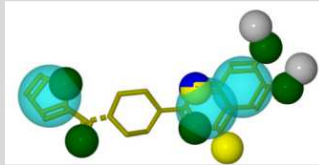
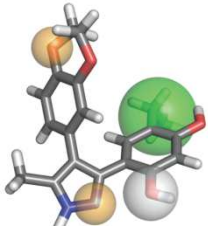
Propriétés	PharmaGist	Pharmer	PharmID
Aromatiques	Sphères centrées	Sphères centrées	Indiqué sur le modèle pharmacophorique
Interactions électrostatiques	Sphères centrées sur les atomes lourds (pas de précision sur la charge)	Sphères centrées sur les atomes lourds (pas de précision sur la charge)	Indiqué sur le modèle pharmacophorique
Exemple			

Tableau 4 : Différents programmes de génération de pharmacophores

4) Détermination des modèles pharmacophoriques

Active Analog Approach

L'une des premières méthodes de génération des modèles pharmacophoriques est la méthode des « Active analog » ou « analogues actifs » énoncé par Garland Marshall qui définit que l'identification de pharmacophores se fait à partir de l'intersection de l'espace conformationnel des molécules actives [122, 123]. Pour chaque conformation du ligand, la position des points pharmacophoriques est déterminée et reportée dans une carte « d'orientation ». Chaque point de cette carte représente une conformation de la molécule et donc un modèle pharmacophorique possible. L'intersection de toutes ces cartes d'orientation permet d'identifier les modèles pharmacophoriques les plus probables caractérisant tout le set de molécules analogues actives. Deux paramètres permettent d'éliminer les molécules inactives et de rendre le modèle pharmacophorique plus restrictif : la réalisation de cartes de volume d'exclusion et l'introduction de contraintes de distances [123].

Cette approche a inspiré la création de nombreux programmes capables de construire des modèles pharmacophoriques.

Protocole général de détermination d'un modèle pharmacophorique

Dans un premier temps les points pharmacophoriques de chaque ligand sont définis. Ensuite, il faut déterminer les points pharmacophoriques communs entre les différents ligands ce qui

permet de déduire un ou des modèles pharmacophoriques correspondant à l'ensemble des ligands choisis comme référence.

La génération de modèles pharmacophoriques nécessite un alignement des différents ligands bioactifs. Les méthodes d'alignements [124] sont généralement divisées en deux catégories [85]. La première dite de « point-based method » aligne les ligands en les superposant selon leurs atomes, fragments ou caractéristiques chimiques. La seconde méthode dite de « property-based method » consiste à utiliser des descripteurs moléculaires (résultats d'une procédure mathématique qui transforme l'information chimique d'une molécule en une représentation utilisant des chiffres ou des courbes [125]) (ex : les fonctions Gaussiennes).

Toutes ces méthodes d'alignements [124] se basent généralement sur le principe de recherche de la sous-structure commune maximale (MCS) utilisé dans de nombreux logiciels : DISCO [102], RAPID [105], GASP [107] et GAMMA [108]. Pour cette recherche, divers algorithmes ont été développés tels que la « clique detection » (utilisé dans DISCO [102] et MPHIL [109]), la recherche exhaustive (HipHop [126], HypoGen. [104], et SCAMPI [106]), et des algorithmes génétiques GASP [107] et GAMMA [108]) sont également utilisés pour générer les modèles pharmacophoriques (Tableau 5).

Logiciel	Ligands de référence	Recherche conformationnelle	Points pharmacophoriques	Méthode de détermination des pharmacophores	Algorithme de détermination des pharmacophores	Score
DISCO et DISCOtech	Faible nombre (<100), actifs et inactifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS	Clique-detection	Nombre de ligands et de propriétés et distance entre propriétés
GASP	Faible nombre (<100), actifs	Concomittante à la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS	Algorithme génétique	Inclus dans la génération du pharmacophore
GAMMA	Faible nombre (<100), actifs	Concomittante à la génération du pharmacophore	Basés sur les atomes	MCS	Algorithme génétique	Inclus dans la génération du pharmacophore
CATALYST	Faible nombre (<100), actifs, valeurs d'activité (HypoGen)	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS (HypoGen) et MCS assouplie (HipHop)	Recherche exhaustive	Rareté (HipHop)

Logiciel	Ligands de référence	Recherche conformationnelle	Points pharmacophoriques	Méthode de détermination des pharmacophores	Algorithme de détermination des pharmacophores	Score
PHASE	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS assouplie	Recherche exhaustive	Nombre de ligands, superposition des propriétés et des volumes, rareté
MOE	Faible nombre (<100), actifs (et inactifs) Possibilité de valeurs d'activités	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS assouplie	Aucun	Nombre de ligands et superposition des atomes
RAPID	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les atomes	MCS assouplie	Fusion linéaire	Superposition des propriétés
SCAMPI	nombre élevé (1000-2000), actifs	Concomittante à la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS	Recherche exhaustive	Inclus dans la génération du pharmacophore à l'aide un test de Student
CLEW	Faible nombre (<100), actifs et inactifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS	"Machine Learning" (algorithme génétique et programme évolutionnaire)	Superposition des propriétés
MPHIL	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les atomes	MCS assouplie	Click-detection et algorithme génétique	Inclus dans la génération du pharmacophore
GALAHAD	Faible nombre (<100), actifs	Concomittante à la génération du pharmacophore	Basés sur les atomes	MCS	Algorithme génétique	Inclus dans la génération du pharmacophore
PharmaGist	Faible nombre (<100), actifs	Avant et pendant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS assouplie (« weight pharmacophores »)	Recherche exhaustive	Superposition des propriétés
Pharmer	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	-	-	-
PharmID	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS	Click-detection	Nombre de ligands
DANTE	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS	Carte d'orientation	Sélectivité

Logiciel	Ligands de référence	Recherche conformationnelle	Points pharmacophoriques	Méthode de détermination des pharmacophores	Algorithme de détermination des pharmacophores	Score
ALADDIN	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	Recherche de sous-structures spécifiées au préalable	-	Inclus dans la génération du pharmacophore
XED	Faible nombre (<100), actifs	Avant et pendant la génération du pharmacophore	Basés sur les atomes	Interactions de Van der Waals et Champs électrostatiques (points chargés positivement et négativement)	-	-
APOLLO	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	MCS	Recherche exhaustive	Superposition des propriétés
APEX-3D	Faible nombre (<100), actifs	Avant la génération du pharmacophore	Basés sur les propriétés chimiques	Approche logico-structurale*	Algorithme de régression « pas à pas » (« stepwise regression »)	Plusieurs paramètres (6) dont la superposition des propriétés et le nombre de ligands

Tableau 5 : Exemples de logiciels et leurs méthodes permettant de générer des pharmacophores

5) Evaluation des modèles pharmacophoriques

Pour déterminer quels sont les meilleurs modèles pharmacophoriques parmi tous ceux générés, un score est attribué à chaque modèle ce qui permet de les classer. Le premier critère pris en compte est le nombre et la qualité de la superposition des points pharmacophoriques entre les ligands de référence. D'autres critères sont pris en compte dans la fonction de score comme l'énergie conformationnelle (une énergie basse est préférée), le volume de recouvrement entre les différents ligands (un recouvrement maximal est préféré), la distance entre les points pharmacophoriques du ligand et ceux du modèle pharmacophorique (évaluée en général par le RMSD) [120] et la rareté du pharmacophore (HipHop[126], ou Phase[117]) [127].

En effet, certains points ou association de points sont largement retrouvés pour divers ligands bioactifs agissant sur différentes cibles. Ils ne participent donc pas de manière significative à l'activité biologique. Ces modèles pharmacophoriques sont dit « communs » et ont un score faible. Tandis que d'autres points ou association de points pharmacophoriques se retrouvent

rarement dans d'autres cibles biologiques. Ces modèles pharmacophoriques sont dit « rares » et ont un score élevé [120, 127].

III.2.1.2.2 « Structure-based »

Les pharmacophores générés dits « structure-based » s'appuient sur les informations structurales 3D de la protéine seule (approche basée sur le récepteur) ou co-cristallisée avec un ligand (approche basée sur le complexe ligand-récepteur).

III.2.1.2.2.1 Approche basée sur le récepteur

Dans cette approche, seules les propriétés du site actif du récepteur sont étudiées. Étant donné que la structure 3D de la protéine est dépourvue de ligand, il est nécessaire d'utiliser des ligands actifs connus afin de valider les modèles.

Pour générer un modèle pharmacophorique, la démarche est la suivante [101] : Après avoir déterminé le site actif de la protéine, [128] une image négative du site actif est créée. Pour cela, le logiciel LUDI [128] par exemple, crée une carte d'interactions du site actif représentant les positions et les types de liaisons complémentaires au site actif. Par exemple, un donneur de liaison déterminé sur la carte correspond à un accepteur de liaison dans le site actif du récepteur. Des simulations de dynamiques moléculaires peuvent aussi être utilisées pour obtenir des images de la protéine avec différentes conformations [101, 129].

Les images négatives présentent un très grand nombre de propriétés rendant quasi-impossible la génération d'un seul modèle pharmacophorique. Une analyse avec des ligands actifs connus permet de sélectionner les propriétés principales participant aux interactions ligand-récepteur. Pour cela différents modèles avec un plus petit nombre de propriétés sont générés et testés sur les ligands actifs pour choisir quel(s) modèle(s) utiliser pour cribler des chimiothèques.

III.2.1.2.2.2 Approche basée sur le complexe ligand-récepteur

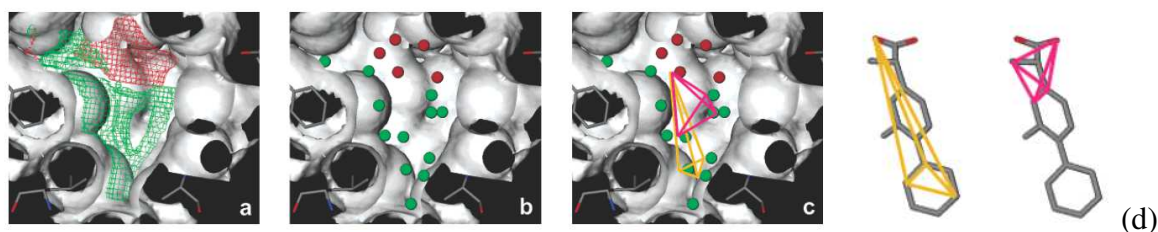
Dans cette approche, la structure 3D de la protéine co-cristallisée avec un ligand est utilisée. Cette approche fournit des informations directes sur les interactions s'établissant entre le ligand et son récepteur. Un modèle pharmacophorique unique peut être directement généré avec la structure de complexe. Cependant, un seul modèle pharmacophorique généré avec une seule structure n'est pas assez fiable et il est donc recommandé d'utiliser les informations d'un ensemble de complexes différents. A partir de l'alignement de ces différents complexes, les groupes fonctionnels qui se retrouvent bien alignés permettent l'élaboration d'un modèle

pharmacophorique commun à toutes ces structures. Lorsque plusieurs modes de liaisons existent pour un site actif, plusieurs modèles pharmacophoriques peuvent être générés.

Pour générer un modèle pharmacophorique [130] la première étape consiste à préparer la structure de la protéine en tenant compte de la flexibilité de la protéine. Cette flexibilité peut être réalisée à partir de différentes conformations du complexe protéine-ligand obtenues par dynamique moléculaire ou par docking [122].

L'étape suivante consiste à déterminer le site de liaison grâce à la position du ligand co-cristallisé puis à identifier et sélectionner des points pharmacophoriques. Pour cela, en partant du ligand co-cristallisé, les points pharmacophoriques réalisant des interactions favorables avec la protéine sont rapidement identifiés et localisés. Pour déterminer ceux qui expliquent l'activité biologique trois approches sont en général utilisées :

-la première approche consiste à sélectionner les points pharmacophoriques en évaluant les énergies d'interactions entre le ligand et la protéine (pour un mode de liaison connu) : les interactions les plus favorables sont conservées, celles qui apportent une faible contribution par rapport à l'énergie totale de liaison sont écartées. Différentes méthodes ont été développées : l'une des plus populaires est l'utilisation des MIFS (Molecular Interactions Fields) [131] qui consiste à décrire la variation de la surface correspondant à une interaction ligand-protéine en calculant l'énergie d'interaction (calcul réalisé par des logiciels comme GRID) [132] entre les atomes de la protéine et les atomes du ligand. Le logiciel FLAP (Figure 20) utilise notamment la méthode des MIFS générée par GRID [131]. Ces interactions favorables dans le site actif sont représentées par une multitude de points discrets correspondant aux points pharmacophoriques. La particularité de FLAP est qu'il recherche toutes les combinaisons possibles de 4 points pharmacophoriques dans le site actif. Les ligands correspondants à chacun des modèles pharmacophoriques à 4 points sont recherchés, puis alignés avec le modèle et la similarité est évaluée.



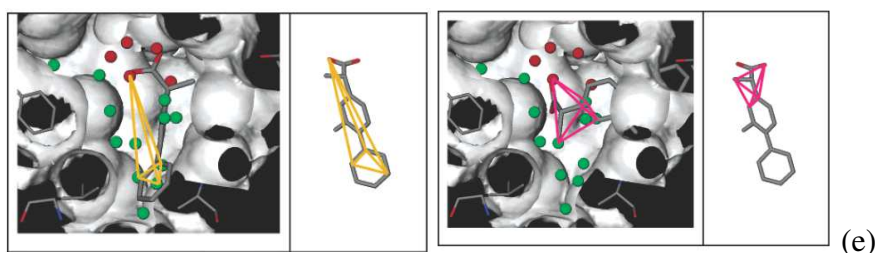


Figure 20 : Protocole de FLAP : (a) MIF calculés par GRID. (b) Génération de points pharmacophoriques par FLAP. (c) Recherche de toutes les combinaisons possibles de 4 points pharmacophoriques. (d) Recherche des ligands répondant aux modèles pharmacophoriques et évaluation de leur similarité. (e) Prise en compte de la forme du ligand et de la forme récepteur dans la sélection du modèle pharmacophorique (jaune) et élimination de ceux qui entraînent des clashes stériques entre le ligand et le site actif (modèle pharmacophorique rose) (Adapté selon [132, 133])

-la deuxième approche concerne les cas où la protéine a été co-cristallisée avec différents ligands. Les points pharmacophoriques sont sélectionnés à partir des interactions conservées entre le ligand et la protéine. Pour identifier ces interactions conservées, une des méthodes les plus fréquemment utilisées est de réaliser l’empreinte pharmacophorique. C’est le cas du logiciel MOE qui génère des empreintes des interactions ligand-protéine (PLIF ou protein-ligand interactions fingerprint) contenant non seulement les informations du type d’interaction mais aussi de la fréquence d’interaction entre un résidu spécifique de la protéine et le ligand. Par la suite, ces empreintes sont converties en modèles pharmacophoriques [120].

Pour optimiser un modèle pharmacophorique, une des méthodes consiste à sélectionner un groupe de ligands actifs connus qui permettrait de mettre en évidence uniquement les points pharmacophoriques spécifiques à l’activité biologique.

En ajoutant des contraintes de forme et de volume [120], le modèle pharmacophorique peut davantage être optimisé comme par exemple dans le logiciel LigandScout [134, 135] ou Catalyst [111, 112] (Figure 21) en ajoutant des sphères de volume d’exclusion représentant la forme du site actif.

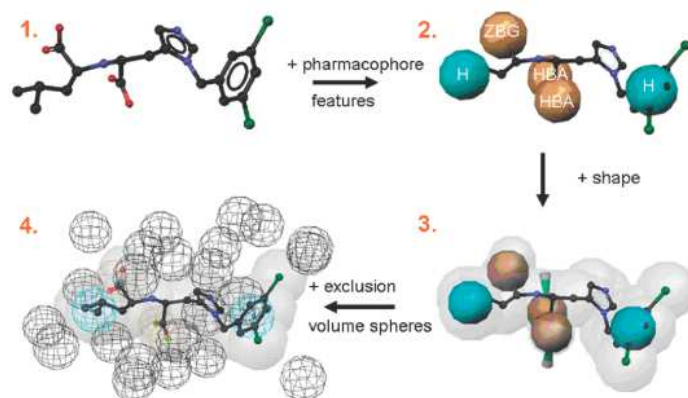


Figure 21 : Optimisation d'un pharmacophore par l'ajout de restriction de forme (en gris) et de volume d'exclusion (sphère grises quadrillées) pour identifier des inhibiteurs de l'ACE (angiotensin conversion enzyme). ZBG : zing binding group, HBA : hydrogen bond receptor, H : hydrophobes. Logiciel Catalyst 4.9 [136]

Définition d'une empreinte pharmacophorique

Après avoir constitué l'espace pharmacophorique, l'empreinte est définie comme une chaîne indiquant la présence (valeur de 1) ou l'absence (valeur de 0) des points pharmacophoriques dans une molécule. En général ce concept est utilisé pour générer une empreinte pharmacophorique de plusieurs ligands bioactifs plutôt que d'un seul qui servira de comparaison pour évaluer la similarité de divers composés [101].

Ainsi, après avoir obtenu une empreinte, la similarité entre composés peut être évaluée en utilisant divers coefficients de similarité [130, 137] comme le coefficient de Tanimoto (Tc)

$$Tc = \frac{N_{AB}}{(N_A + N_B - N_{AB})}$$

où N_A est le nombre de valeurs (1 ou 0) dans l'empreinte pharmacophorique de la molécule A, N_B est le nombre de valeurs (1 ou 0) dans l'empreinte pharmacophorique de la molécule B et N_{AB} est le nombre de valeurs (1 ou 0) communes dans les empreintes pharmacophoriques des molécules A et B. Ce coefficient attribue une valeur comprise entre 0 et 1 signifiant respectivement une dissimilarité et une identité entre les deux molécules (Figure 22) [130, 137].

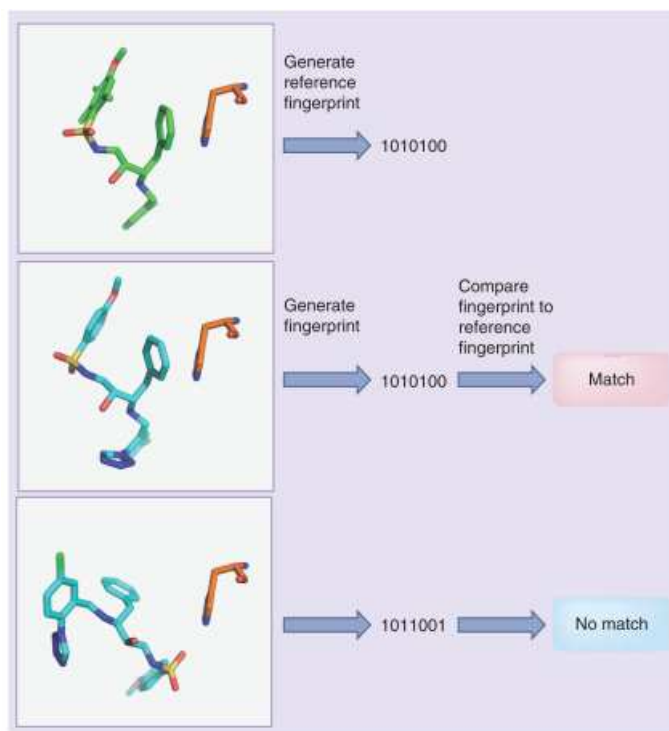


Figure 22 : Exemple d'une empreinte générée par SIFT (premier cadre: ligand de référence (en vert) avec sa protéine co-cristallisée et interagissant avec un résidu particulier (orange), les deux autres cadres : ligand candidat (bleu) avec deux conformations différentes : l'une match avec la référence et l'autre non grâce à la comparaison avec leurs empreintes respectifs.(selon[138])

De plus, de nos jours, de nombreux serveurs appelés les « web-based tools » [120] se sont développés. Facilement accessibles sur internet, ils permettent de générer automatiquement les modèles pharmacophoriques. C'est le cas de PharmaGist [139] qui est spécialisé dans la modélisation de pharmacophores « ligand-based », PharmMapper [140] qui contient plus de 7000 modèles pharmacophoriques « structure-based » et permet d'identifier les cibles potentielles de différents ligands. Enfin, ZincPharmer [141] génère des modèles pharmacophoriques « structure-based » et permet de cribler la base de données ZINC [142] à l'aide de ces pharmacophores.

Les pharmacophores « ligand-based » ou « structure-based » sont des outils puissants capables de guider la recherche à la découverte de nouvelles molécules.

Criblage virtuel de chimiothèques à l'aide d'un pharmacophore

Les modèles pharmacophoriques peuvent être utilisés pour cribler une grande chimiothèque de molécules. La chimiothèque utilisée peut être une base de données commerciale (ex : la

Zinc database [142] ou une base de données construite manuellement. Lors de la constitution de cette grande chimiothèque, il faut prendre en compte la flexibilité de chaque molécule et donc procéder à une recherche conformationnelle : cette étape est primordiale puisqu'un hit peut être éliminé si la conformation bioactive n'a pas été correctement prise en compte. Ainsi pour prendre en compte la flexibilité lors d'un criblage, deux approches ont été proposées [101, 122] : la première consiste à choisir un ensemble de conformations qui recouvrent l'espace conformationnel de chaque molécule de la chimiothèque (ex : Catalyst FAST [143]). Mais le nombre de conformations peut rapidement devenir considérable et augmente les temps de calculs ; de plus en décidant de choisir les conformations, le risque d'éliminer certaines conformations plus pertinentes n'est pas à écarter. La seconde approche consiste à prendre en compte la flexibilité des molécules au moment du criblage de la chimiothèque en utilisant le pharmacophore pour favoriser les chances de trouver les conformations des molécules qui correspondent au pharmacophore (ex : UNITY, CFS [144], 3DFS[118] utilisent cette méthode). Pour cela, la méthode « tweak » a été développée : elle consiste à partir d'une seule conformation du ligand, de réaliser des changements de torsions, de sorte que cette conformation s'adapte au mieux au modèle pharmacophorique [101, 122]. Enfin d'autres méthodes comme Catalyst BEST [143] propose d'associer ces deux approches, d'abord en générant les conformations de toutes les molécules durant la construction de la base puis en sélectionnant les conformations qui s'adaptent au mieux au pharmacophore au moment du criblage. [101, 122].

Le criblage se réalise en deux étapes. Tout d'abord un premier filtrage permet d'éliminer les molécules qui ne possèdent pas les propriétés de bases du pharmacophore. Ensuite, la seconde étape permet d'identifier parmi les molécules restantes celles capables de s'adapter au pharmacophores [85, 101].

L'un des avantages d'utiliser les pharmacophores pour cribler une chimiothèque est qu'ils peuvent représenter une grande diversité structurale. En effet, les pharmacophores permettent de mettre en évidence des hits qui appartiennent à la même classe que les composés actifs étudiés (hits similaires) mais aussi de découvrir des hits qui appartiennent à d'autres classes chimiques (nouveaux hits).

III.2.1.3 Applications des méthodes de pharmacophores

Il existe de nombreuses applications de l'utilisation des modèles pharmacophoriques et ce à différents stades du processus de recherche et développement mais aussi dans d'autres approches de criblage virtuel.

Pharmacophores et Drug Discovery

Une fois le modèle pharmacophorique identifié, il est utilisé pour trouver de nouvelles molécules actives. Les modèles pharmacophoriques dans le processus R&D peuvent être utilisés notamment dans la phase de découverte de hits ou d'optimisation des leads.

Lors de l'étape d'optimisation de leads, l'activité biologique d'une molécule lead est améliorée en lui rajoutant des groupements fonctionnels judicieusement choisis et positionnés de manière rationnelle. Les pharmacophores permettent de guider les chimistes dans la synthèse de ces composés [101]. Le chimiste médicinal peut aider à définir le pharmacophore ou réaffiner le modèle pharmacophorique à partir de ses connaissances : il peut indiquer quelles molécules sont les plus intéressantes pour générer le modèle pharmacophorique et peut redéfinir manuellement le pharmacophore généré à partir de ses connaissances sur les activités biologiques des molécules, leurs modes de liaisons. Cependant, la fiabilité des résultats du criblage constituent la limite de cette méthode [145].

Pharmacophore et autres approches de criblage virtuel

Deux autres approches de criblage virtuel utilisent les pharmacophores pour construire leur modèle et découvrir de nouveaux ligands. La première est la méthode de conception *de novo* comme le logiciel NEWLEAD [146] qui propose une construction de ligands pas à pas avec des fragments de molécules satisfaisant les contraintes physico-chimiques imposées par le modèle pharmacophorique. Les fragments sont ensuite liés *via* des « linkers » (atomes, chaînes...) de sorte à former la structure final du ligand. Des logiciels tels que LUDI ([147, 148] et BUILDER [149] permettent de construire un ligand en combinant des pharmacophores générés avec la méthode « structure-based » et l'approche *de novo* [85, 101]. Certains logiciels de 3D-QSAR (comme Phase [117]) (Quantitative Structure Activity Relationships), qui ont pour but de corrélérer l'activité biologique de composés actifs avec l'arrangement spatial de propriétés telles que les propriétés électroniques et stériques [101, 122, 150] utilisent les pharmacophores pour réaliser un alignement rigoureux des ligands actifs.

Pharmacophores et prédiction des interactions avec d'autres cibles

Les pharmacophores peuvent être utilisés pour établir le profil de bioactivité de la molécule en prédisant des interactions (avantageuses ou néfastes) de molécules avec des cibles potentielles non souhaitées ou « off-targets » [120].

Pour établir ce profil de bioactivité, la méthode de « Parallel screening » (Figure 23) est utilisée. Elle permet de cribler un petit nombre de molécules contre un grand nombre de modèles pharmacophoriques représentant diverses cibles. Cette méthode est très utilisée dans la recherche de nouveaux médicaments pour trouver la cible d'un composé et expliquer son mode d'action, prédire les effets secondaires, et aider le développement de nouvelles molécules basées sur d'anciennes molécules connues pour avoir des effets secondaires (par exemple une molécule qui provoque de l'hypotension peut être criblée contre les modèles pharmacophoriques des cibles impliquées dans la régulation de la pression sanguine dans le but de développer une nouvelle molécule anti-hypertensive) [120].

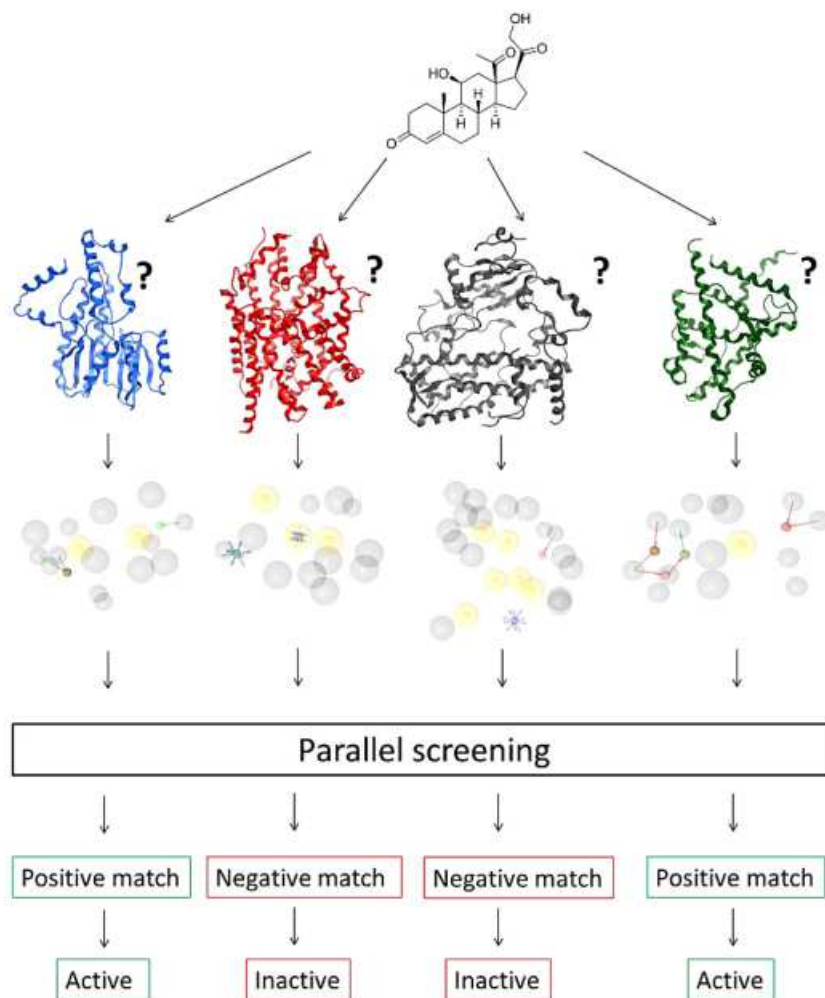


Figure 23 : Principe du « parallel screening » : pour plusieurs protéines cibles, les modèles pharmacophoriques sont établis et les composés concernés sont screenés. Si le composé match avec un des modèles pharmacophoriques il est prédit comme étant actif avec la ou les protéines en question, sinon il est considéré comme inactif [120]

Ainsi l'utilisation de pharmacophores dans le processus R& D est une stratégie judicieuse participant à la découverte de nouvelles molécules bioactives intéressantes.

Les pharmacophores sont également utilisés dans la prédiction des propriétés ADMET. En effet, les médicaments sont métabolisés par le foie *via* les cytochromes P450 (CYP450) et dans certains cas, des interactions médicamenteuses non attendues se produisent entraînant parfois le retrait de médicaments. Pour éviter ces problèmes, des méthodes de pharmacophores ont été proposées permettant de prédire ces interactions médicamenteuses. D'autres méthodes proposent de générer des pharmacophores des molécules capables d'inhiber les cytochromes (notamment inhibition de CYPs 2C9, 2D6 et 3A4) [83, 122].

III.2.1.4 Limites des méthodes de pharmacophores

Méthodes d'élucidation de pharmacophores : alignement, conformations et flexibilité

Lors de l'étape de « pharmacophore mapping » [151], le principal problème provient de l'alignement des ligands actifs qui nécessite des temps de calcul assez longs du fait de la prise en compte de l'espace conformationnel des molécules flexibles. Lorsque la structure du complexe ligand-recepteur est connue le problème de flexibilité de la protéine est à prendre en compte en plus de celui des ligands. D'autre part, la superposition des ligands devient difficile lorsque le site actif est constitué principalement d'interactions hydrophobes puisque ceux-ci indiquent très faiblement l'orientation contrairement aux liaisons hydrogène [152].

Les sources des données telles que ChEMBL, PubChem, et la PDB peuvent contenir des erreurs et peuvent être à l'origine d'une construction erronée d'un modèle pharmacophorique. Ainsi, en 2013 [153], il a été estimé que la base de données de ChEMBL contenait 5% d'erreurs dans les structures, 3% d'informations fausses sur les cibles biologiques et 1% de valeurs d'activités incorrectes [120].

Définition des points pharmacophoriques : tolérances, ionisations et équilibres tautomériques

Lors de la définition des points pharmacophoriques des erreurs peuvent se produire. En effet, les points pharmacophoriques sont définis en général soit par des vecteurs (liaisons hydrogène) soit par des sphères (hydrophobes, aromatiques et groupes chargés) [101] chacun ayant une tolérance de distance. Toutefois, ces tolérances peuvent devenir difficilement manipulable lors de la prise en compte de la flexibilité de la protéine. L'ionisation des molécules et les équilibres tautomériques représentent aussi un réel obstacle dans la définition des points pharmacophoriques puisqu'ils peuvent inverser la nature d'une propriété pharmacophorique : un donneur de liaison hydrogène devient un accepteur de liaison hydrogène et vice versa. Ces deux états (ionisation et équilibres tautomériques) doivent donc être pris en compte lors de la génération des conformations des molécules au risque d'éliminer des molécules actives dans ces états là [77, 152, 154].

Utilisation des pharmacophores dans le criblage virtuel

Lors du criblage virtuel, utiliser des pharmacophores présente aussi quelques limitations. En effet pour évaluer la concordance entre des molécules d'une chimiothèque et le modèle pharmacophorique, la méthode la plus utilisée est le RMSD (écart quadratique moyen) qui

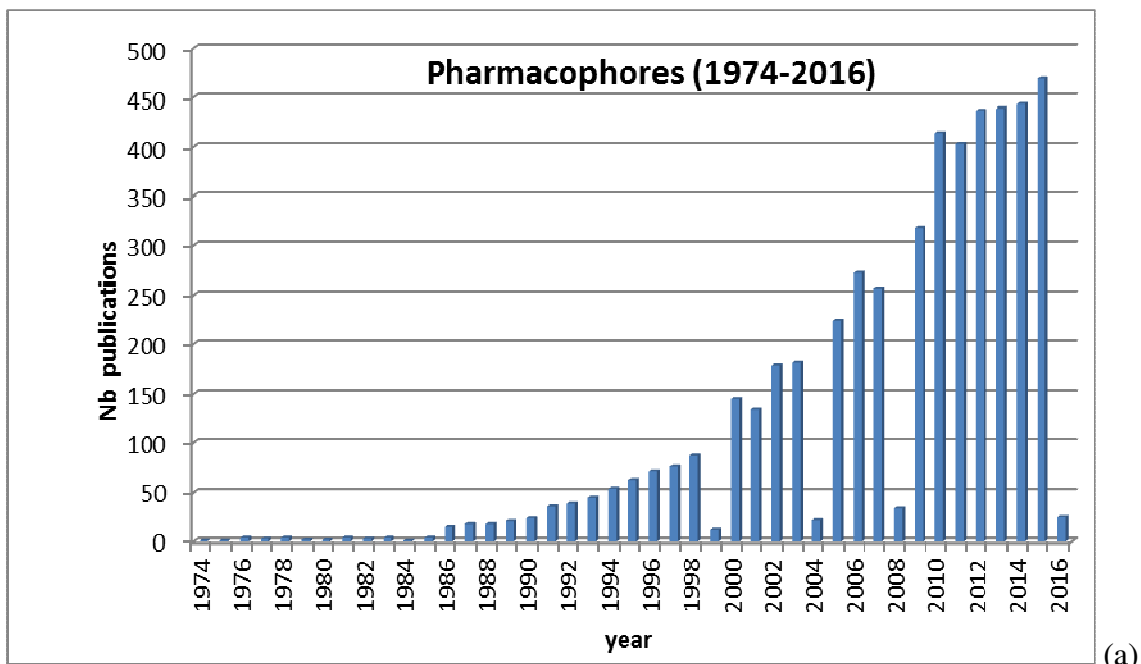
détermine la distance entre les positions des points pharmacophoriques de la molécule et les points pharmacophoriques du modèle. Cependant, le RMSD ne prédit en aucun cas la compatibilité de la molécule avec la protéine c'est-à-dire qu'un hit retenu après le criblage virtuel peut avoir des groupes fonctionnels non compatibles avec le site de liaison de la protéine et donc être une molécule inactive bien qu'elle ait présenté un très bon RMSD avec le modèle pharmacophorique [83]. D'autre part, la valeur du RMSD peut être trompeur, en fournissant une approximation précise sur une partie des structures de molécules qui s'alignent bien mais en donnant une approximation grossière sur le reste de structure à cause de leur flexibilité conformationnelle [124].

Une autre limitation de l'utilisation des pharmacophores lors de criblage virtuel est que les pharmacophores dépendent des conformations des molécules. Si l'étape de recherche conformationnelle est réalisée avant la génération du pharmacophore, une conformation d'une molécule active peut avoir été omise et donc cette molécule ne s'adaptera pas au modèle pharmacophorique. De plus, la stéréochimie doit être prise en compte lors de la génération des conformations [152, 155] puisqu'il s'agit un paramètre déterminant expliquant l'activité biologique de molécules chirales [83].

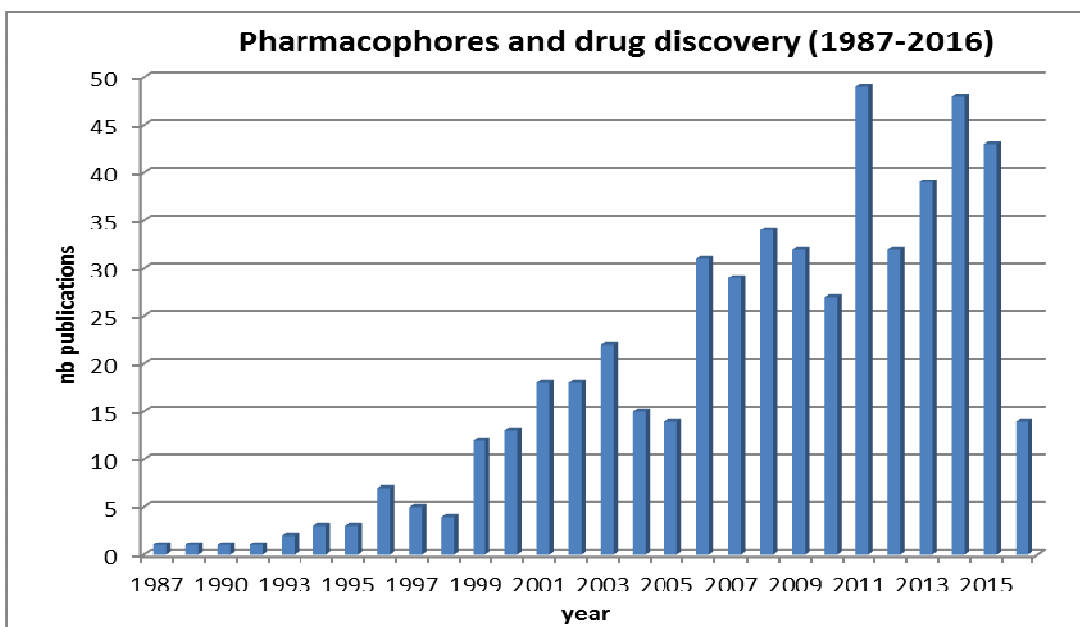
Enfin une dernière limite est qu'il n'y a pas une seule manière de construire un modèle pharmacophorique. Dans la plupart des cas, plusieurs modèles pharmacophoriques sont générés et même pour une cible biologique similaire les modèles pharmacophoriques générés présentent quelques différences [83].

Pour diminuer le taux de molécules inactives identifiées par criblage à l'aide de pharmacophores, des méthodes de validation et d'optimisation du modèle pharmacophorique ont été développées. Ainsi, l'utilisation d'un « test set » contenant un nombre plus petit de molécules (actives et inactives) à tester [120], permet d'évaluer rapidement la capacité du modèle pharmacophorique généré, à retrouver majoritairement des molécules actives [85].

Afin de diminuer ces limites, de nombreux logiciels de pharmacophores ont amélioré leur méthodes de conception de pharmacophores tant pour la génération des conformations des ligands que pour la prise en compte de la flexibilité de la protéine. Ainsi, depuis que le concept de pharmacophore est né, un effort considérable a été mené pour obtenir des logiciels de plus en plus robustes et fiables permettant aux pharmacophores de jouer un rôle majeur dans le processus de recherche de nouveaux médicaments (Figure 24 et Tableau 6).



(a)



(b)

Figure 24 : (a) Nombre de publications concernant les pharmacophores (source PubMed (juin 2016) en écrivant comme mot clé « pharmacophores »). (b) Nombre de publications concernant les pharmacophores et leur application en drug discovery (source PubMed (juin 2016) en écrivant comme mots clés « pharmacophores and drug discovery »).

Quelques exemples de nouveaux composés identifiés grâce à des modèles pharmacophoriques « ligand-based »			
Titre de la publication	Méthodes		Références
Antitumor compounds based on a natural product consensus pharmacophore	Pharmacophores manuels, synthèse		[156]
Identification of novel cannabinoid CB1 receptor antagonists by using virtual screening with a pharmacophore model	Pharmacophores générés par Catalyst HipHop et Catalyst search		[157]
Quinolone 3-carboxylic acid pharmacophore : design of second-generation HIV-1 integrase inhibitors	Catalyst HipHop, Catalyst search		[158]
Quelques exemples de nouveaux composés identifiés grâce à des modèles pharmacophoriques « structure-based »			
Titre	Structure de la protéine	Méthodes	Références
Discovery of novel cathepsin S inhibitors by pharmacophore-based virtual high-throughput screening	RX	Pharmacophores générés par Catalyst et LigandScout, Catalyst search	[159]
Pharmacophore modelling and virtual screening for identification of new aurora A kinase inhibitors	RX	Pharmacophores générés par Catalyst HypoGen et Catalyst search, docking	[160]
Novel aldosterone synthase inhibitors with extended carbocyclic skeleton by a combined ligand-based and structure-based drug design approach	Modélisation par homologie	Pharmacophores générés par GALAHAD, design de composés manuels, docking (FlexX-Pharm)	[161]

Tableau 6 : Quelques exemples illustrant l'application des pharmacophores en drug discovery ([145])

III.2.1.5 Exemple : LigandScout, un logiciel permettant de générer des modèles pharmacophoriques.

Le logiciel LigandScout a été développé par InteLigand et est capable de générer des pharmacophores par les approches « structure-based » et « ligand-based » (Figure 25) [134].

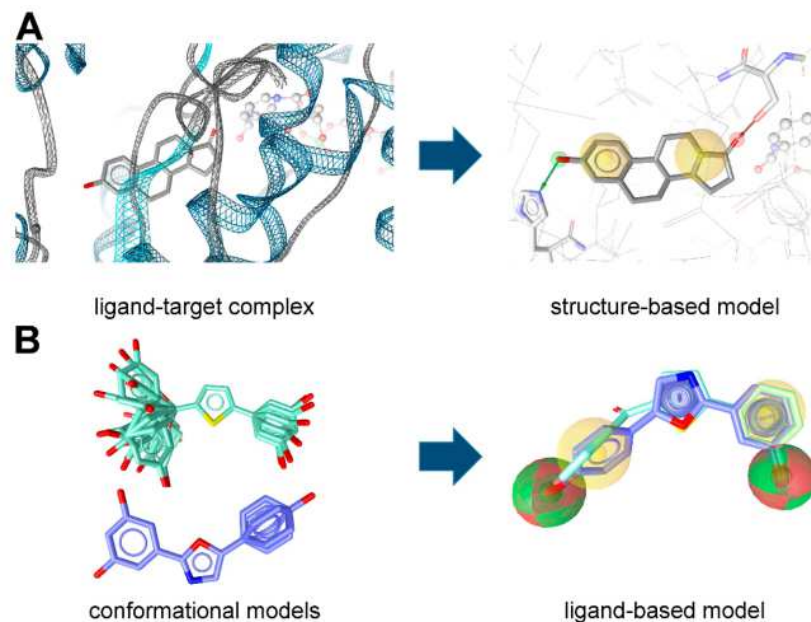


Figure 25 : Modèles pharmacophoriques (A) Structure- et (B) ligand-based générés par LigandScout [162]

La recherche conformationnelle est réalisée avant la génération du modèle pharmacophorique, en utilisant OMEGA et ICon. Ce logiciel permet une recherche rapide, non exhaustive mais minutieuse de l'espace conformationnel.

Identification des points pharmacophoriques

Les points pharmacophoriques sont définis selon les types d'interactions. LigandScout en distingue 6 principales : donneur de liaison hydrogène (HBD), accepteur de liaison hydrogène (HBA), zone chargée positivement (PI), zone chargée négativement (NI), interaction hydrophobe (H) et cycle aromatique (AR). Ajoutées à ces 6 types de points pharmacophoriques, le logiciel spécifie également les liaisons réalisées avec certains métaux (fer, zinc et magnésium) [120], (Tableau 7).

Propriétés	Interaction par liaison hydrogène	Interactions électrostatiques	Hydrophobes	Aromatiques	Interactions avec les métaux
Description	Vecteurs centrés sur l'atome d'hydrogène (donneur) ou sur l'atome lourd (accepteur) correspondant	Sphères centrées sur les atomes lourds ne précisant pas la charge	Sphères centrées sur le centroïde	Anneaux plans centrés sur le centroïde et vecteurs indiquant la direction de l'interaction aromatique	Sphères centrées sur les atomes de métaux

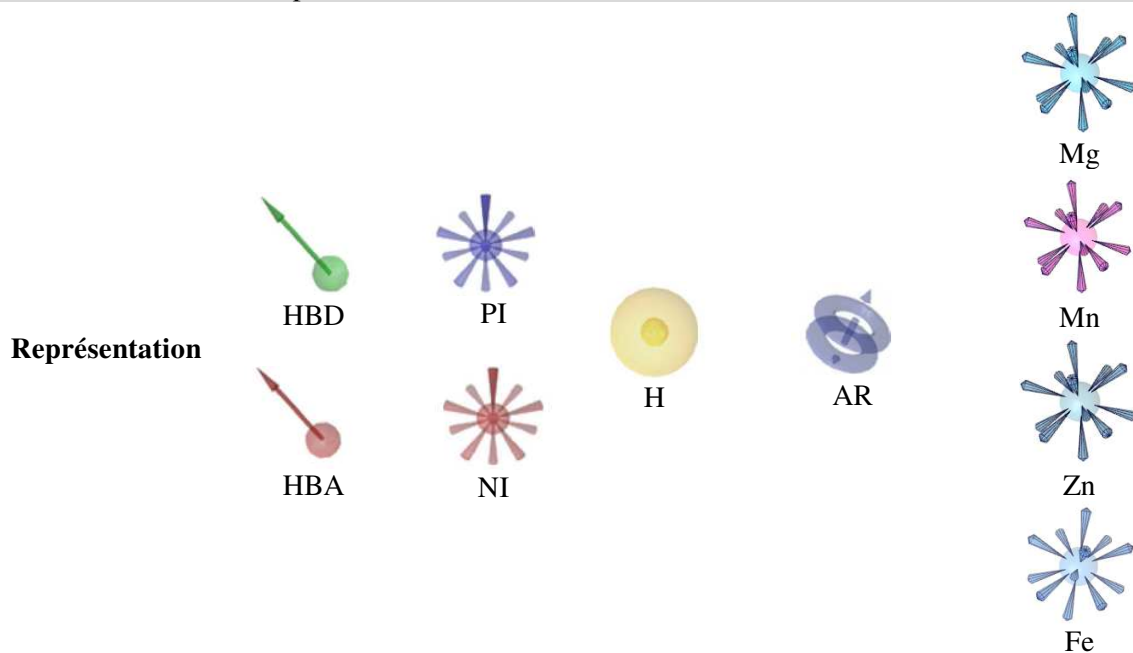


Tableau 7 : Définition et représentation des points pharmacophoriques décrits par le logiciel LigandScout

Détermination des modèles pharmacophoriques

a) Par la méthode « ligand-based »

La construction des modèles pharmacophoriques se réalise en 6 étapes [120, 163]. La première étape est celle de la génération du set de conformères pour chaque ligand du « training set » (groupe de ligands actifs à partir duquel le modèle pharmacophorique sera construit). La seconde étape consiste à ordonner les molécules selon leur flexibilité. Chaque conformation est ensuite analysée et les points pharmacophoriques sont placés dans toutes les conformations. En troisième étape, les deux composés les moins flexibles sont alignés selon leurs points pharmacophoriques. Cet alignement se fait par paires de propriétés pharmacophoriques présentant des caractéristiques chimiques identiques et géométriques

similaires. [135, 163]. Tous les alignements possibles sont donc réalisés et scorés. La fonction de score prend en compte notamment le nombre des paires de propriétés qui, géométriquement, matchent et le RMSD entre ces paires [135, 163].

La quatrième étape consiste à définir les points pharmacophoriques communs aux meilleurs alignements formant ainsi des modèles pharmacophoriques intermédiaires. Ces derniers sont ensuite scorés en cinquième étape. Enfin, la dernière étape consiste à aligner ces modèles pharmacophoriques à toutes les autres conformations des ligands du « training set ». Les étapes 4-6 sont répétées jusqu'à ce que chaque conformation ait un modèle pharmacophorique, dans le cas contraire, le processus est stoppé et le modèle rejeté [120, 163].

De plus, Ligandcout propose de créer deux types de modèles pharmacophoriques : « shared features pharmacophores » et « merged features pharmacophores ». Dans le mode « shared » tous les points pharmacophoriques des molécules sont identifiés et seuls les points pharmacophoriques présents dans toutes les molécules sont sélectionnés pour construire le modèle pharmacophorique final. Dans le mode « merged », tous les points pharmacophoriques des ligands sont sélectionnés pour construire le modèle pharmacophorique final et cela même si un point est présent chez un petit nombre de ligands et absent du reste des ligands. Des points pharmacophoriques optionnels représentent cette différence [120, 135, 163].

Pour éviter qu'il y ait un grand nombre de modèles pharmacophoriques générés en mode « merged », il est possible de définir un nombre de points pharmacophoriques qui peut être omis. Ce nombre indique combien de points pharmacophoriques par molécule peuvent être négligés lors de la construction du modèle pharmacophorique final [120, 135]. De plus, pour affiner le modèle final, des volumes d'exclusion peuvent être ajoutés automatiquement [120].

b) Par la méthode « structure-based »

• Approche basée sur le récepteur

Dans le cas où seule la structure de la protéine est disponible, LigandScout propose 4 manières de générer les modèles pharmacophoriques [163].

- à partir de ligands dockés au préalable dans le site de liaison de la protéine [163].

- basée sur la connaissance du site de liaison (Figure 26) : en indiquant à LigandScout les acides aminés qui constituent le site actif [163].

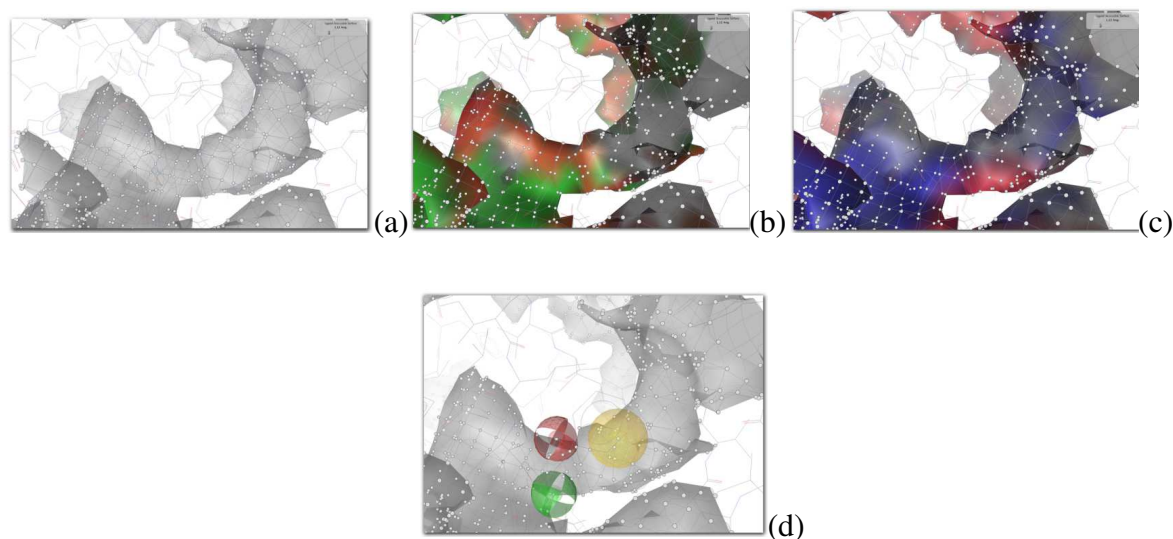


Figure 26 : (a) Surface accessible du ligand (b) Surface colorée : HBD (vert), HBA (rouge) (c) Surface colorée : PI (bleue), NI (rouge) (d) Modèle pharmacophorique [163].

- en important des cartes générées par GRID indiquant l'importance de certaines interactions ligand-protéine. [163].

- en important des fichiers de simulations de moléculaires dynamiques qui prennent en compte la flexibilité de la protéine et les changements résultants au sein de son site de liaison. [163].

• Approche basée sur le complexe ligand-récepteur

A partir d'une structure de protéine co-cristallisée avec un ligand, LigandScout détecte toutes les interactions protéine-ligand en analysant les propriétés chimiques qui constituent ces interactions. Ainsi la perception de chacune des 6 interactions (citées précédemment), est basée sur des principes prédéfinis.

Pour les liaisons hydrogène, la distance est comprise entre 2.5 et 3.8 Å par défaut et l'angle entre les donneurs et les accepteurs est de $180^\circ \pm 34^\circ$ [134]. De plus, la flexibilité entre les atomes sp^2 et sp^3 et les atomes hydrogènes adjacents est prise en compte.

Les HBDs sont reconnus comme étant la plupart des hydroxyles non acides, les thiols, les hydrogènes acétyléniques et les NHs. Dans le cas où un atome lourd comportant un HBA est

situé dans une distance et une zone permises, une liaison hydrogène est créée et représentée sous forme de vecteur. De plus, pour favoriser plus de flexibilité dans les conformations du ligand, les distances et angles de contraintes peuvent être ajustés [120, 134, 163].

Les zones hydrophobes sont des sphères centrées sur les groupes hydrophobes, les branches ou les chaînes [120, 134]. Si un groupe hydrophobe est détecté du côté de la protéine, le logiciel recherche les zones hydrophobes situées à une distance de 1 à 5 Å par rapport à la protéine avec une sphère de tolérance de 1.5 Å (paramètres modifiables) [120, 134, 163].

Tous les atomes ou groupes d'atomes qui sont protonés au pH physiologique sont considérés comme des groupes chargés positivement [120, 134]. De même tous les atomes ou groupes d'atomes qui sont déprotonés au pH physiologique sont considérés comme des groupes chargés négativement [120, 134]. Ces deux types de groupes sont reconnus s'ils répondent à une distance de 1.5-5.6 Å (et une sphère de tolérance de 1.5 Å) avec les atomes ou groupes d'atomes correspondants (paramètres ajustables) [120, 134, 163].

Evaluation et optimisation des modèles pharmacophoriques

Les modèles pharmacophoriques générés en « ligand-based » sont évalués au moment de l'étape de génération des modèles pharmacophoriques intermédiaires. Ces derniers sont ordonnés par rapport à 4 fonctions de scores différentes [163] :

i) Le score « pharmacophore fit » qui considère uniquement les propriétés pharmacophoriques et le RMSD de ces propriétés. ii) Le score « Relative pharmacophore fit » qui prend en compte le nombre de propriétés pharmacophoriques qui matchent et le RMSD des pharmacophores alignés. iii) Le score prenant en compte le recouvrement des atomes des sphères de Van der Waals et iv) Le score qui évalue la similarité de forme des courbes gaussiennes (courbes représentant le volume de la molécule) [163, 164].

De plus, le programme offre diverses possibilités pour optimiser le modèle pharmacophorique [163] :

- si le « training set » comporte une grande diversité structurale de composés, il est possible de les regrouper (« clusters ») en fonction de leurs similarités. Ces clusters sont formés suivant des mesures de similarité. L'ensemble des multiples modèles générés refléteront la diversité du « training set » [163].

-le modèle peut être ajusté manuellement soit en ajoutant des volumes d'exclusion sur des espaces occupés uniquement par les ligands inactifs, en définissant des points pharmacophoriques optionnels, en créant/supprimant des points pharmacophoriques, ou en modifiant la nature d'un point pharmacophorique. De plus, comme chaque point pharmacophorique a un poids prédéfini, celui-ci peut être modifié en fonction de son importance dans le mode de liaison ligand-protéine ou en capturant une caractéristique chimique commune étendue dans l'espace 3D à cause de la diversité conformationnelle des ligands. Enfin les contraintes de distances, de direction, d'angles et les sphères de tolérance de chacun des points pharmacophoriques peuvent être ajustées [163].

-il est également possible de générer un ensemble de sphères de volume d'exclusion (« excluded volumes coat ») reflétant la géométrie spatiale du site de liaison et influençant la qualité restrictive du modèle pharmacophorique [163].

Ainsi LigandScout propose de nombreuses possibilités pour optimiser le ou les modèles pharmacophoriques, les rendant ainsi plus sélectifs des ligands actifs que des ligands inactifs.

Virtual screening

Les modèles pharmacophoriques générés peuvent être utilisés lors d'un criblage contre une chimiothèque. LigandScout utilise la méthode suivante :

Il crée tout d'abord les points pharmacophoriques de toutes les conformations des molécules de la chimiothèque. Ensuite, pour chacun de ces points des distances entre les propriétés pharmacophoriques sont définies. Puis pour les modèles pharmacophoriques générés au préalable, les distances entre les propriétés pharmacophoriques sont également définies. Au cours du screening virtuel, les distances entre les points des conformères et les modèles pharmacophoriques sont comparées avec un premier algorithme d'alignement pour trouver des paires de propriétés pharmacophoriques similaires et pour minimiser les distances entre les propriétés, un deuxième algorithme d'alignement est utilisé. Si tous les points pharmacophoriques d'une molécule concordent avec les contraintes de distance, d'angle, de direction des vecteur, des sphères de tolérance, des volumes de sphères d'exclusion et des sphères de Van der Waals présents sur le modèle pharmacophorique, la molécule est considérée comme un hit. D'autre part, LigandScout permet de réaliser des correspondances

partielles en autorisant que certains points pharmacophoriques soient omis (ou définis en tant qu'optionnels) durant la recherche de matching [163, 165].

Enfin les molécules hit sont scorées par une fonction de score. Deux types de fonctions existent : le « pharmacophore fit » et le « relative pharmacophore fit » [163].

Différentes options de LigandScout sont utilisables lors de la réalisation du criblage. Deux modes de screening sont possibles : le mode « match all query features » où les points pharmacophoriques des molécules doivent correspondre avec tous ceux du modèle pharmacophoriques et le mode « fragment screening » qui autorise les correspondances partielles [163]. Trois options sont proposées pour considérer qu'une molécule décrit le modèle pharmacophorique : 1) le screening s'arrête dès qu'une première conformation correspond au modèle, 2) le screening s'arrête après avoir analysé toutes les conformations et que la meilleure conformation qui match au modèle soit sélectionnée, 3) le screening s'arrête une fois que toutes les conformations qui répondent au modèle soient trouvées [163].

Ainsi LigandScout diffère des autres programmes par sa qualité d'alignement des propriétés pharmacophoriques [164]. Il permet d'aligner des molécules entre elles et d'en générer les pharmacophores correspondants avec les approches « structure-based » et « ligand-based », d'aligner des modèles pharmacophoriques entre eux. De plus, ces modèles peuvent soit présenter tous les points pharmacophoriques présents dans un set de ligands (« merged features pharmacophores ») ou, au contraire, présenter uniquement les points pharmacophoriques en commun présents chez tous les ligands (« shared features pharmacophores »). Chaque modèle pharmacophorique peut être optimisé puis être utilisé pour réaliser des criblages virtuels contre différentes chimiothèques : là aussi LigandScout met en œuvre sa méthode d'alignement afin de trouver les hits les plus prometteurs d'une librairie (Tableau 8).

Titre	Année	Références
Pharmacophore Identification, in Silico Screening, and Virtual Library Design for Inhibitors of the Human Factor Xa	2005	[166]
Structure-Based Pharmacophore Identification of New Chemical Scaffolds as Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors	2007	[167]
Highly Specific and Sensitive Pharmacophore Model for Identifying CXCR4 Antagonists. Comparison with Docking and Shape-Matching Virtual Screening Performance	2013	[168]
Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and in Vitro Testing Reveal Haloperidol, Eprazinone, and Fenbutrazate as Neurokinin Receptors Ligands	2014	[169]

Tableau 8 : Quelques exemples de nouveaux inhibiteurs potentiels découverts par l'utilisation de LigandScout [163]

III.3 Docking

L'action d'une molécule dans une protéine est gouvernée par des principes de reconnaissance mutuelle entre la molécule et sa cible. Les caractéristiques générales des interactions ligands-protéines résident en une complémentarité stérique, hydrophobe et polaire entre les deux structures et une conformation d'énergie favorable du ligand qui privilégie une bonne affinité de liaison [170]. Les méthodes de docking ont pour but de prédire la conformation et l'orientation d'une molécule lors de sa liaison à son récepteur [171]. Elles permettent de réaliser une analyse détaillée des modes de liaison supposées, nommées « poses », adoptés par le ligand dans le site actif de la protéine. Ainsi, l'objectif de cet outil est non seulement de discriminer les « vrais » ligands des molécules qui ne sont pas capables de se lier au récepteur, mais aussi de révéler leur mode de liaison avec la protéine cible [170].

Ainsi, les méthodes de docking peuvent être classées en trois catégories selon la prise en compte de la flexibilité du ligand, les algorithmes utilisés pour rechercher les poses possibles d'un ligand et les fonctions de score permettant d'évaluer l'affinité de liaison de chacune de ces poses [172].

Ainsi, la première catégorie considère le ligand et la protéine comme étant rigides, la seconde considère le ligand comme étant flexible tout en conservant la protéine rigide et la dernière catégorie considère la protéine « semi-flexible » et le ligand flexible [170, 173].

III.3.1 Docking ligand rigide

Cette méthode reflète le principe de la clé et de la serrure (« lock and key ») énoncé par Emile Fisher en 1890 [174] où seul le ligand (représentant la clé) qui possède la bonne taille et la bonne forme peut ouvrir une serrure, la protéine (Figure 27) [120].

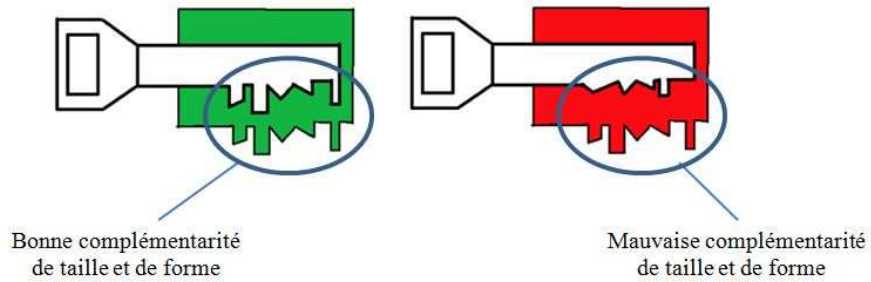


Figure 27 : Schéma illustrant le principe de « lock and key » d'Emile Fisher (adapté selon [120]).

Les premiers logiciels de docking se sont donc inspirés de ce concept et considéraient le ligand et le récepteur comme deux entités rigides. Dans cette approche, seuls les mouvements de translations et de rotations des ligands sont étudiés pour trouver les différentes poses au sein d'un site de liaison (Figure 28) [173].

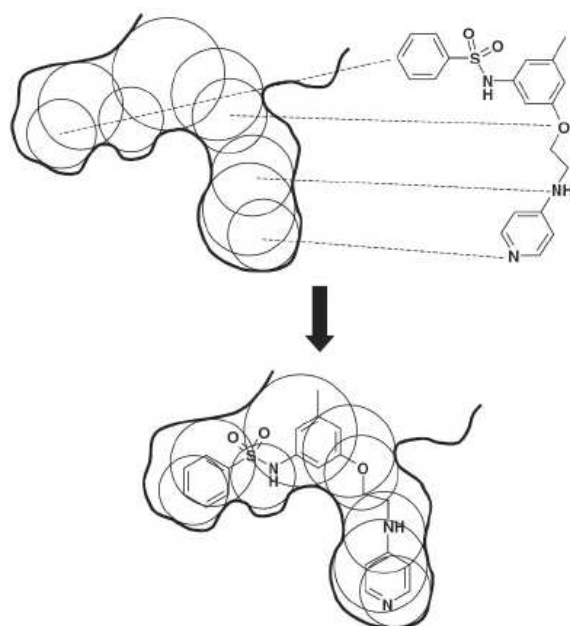


Figure 28 : Principe du docking rigide illustré par le logiciel DOCK: Le site de liaison de la protéine est distingué par l'utilisation des sphères de tailles différentes. Les correspondances entre les atomes du ligand et ces sphères sont recherchées et permettent de révéler une ou des orientations du ligand dans le site actif [172, 175].

Pour améliorer la prédiction des modes de liaison, la prise en compte de la flexibilité conformationnelle du ligand a été introduite. Ainsi, de nos jours, le docking ligand rigide est de moins en moins utilisé en faveur des méthodes de docking ligand flexible [173].

III.3.2 Docking ligand flexible

L'un des grands enjeux des méthodes de docking flexibles [170] est d'explorer l'espace conformationnel des ligands dans le but de déterminer d'une part les bonnes poses du ligand dans le site actif de la protéine et d'autre part de trouver les modes de liaison correspondant à une énergie libre de liaison basse [170].

III.3.2.1 Les algorithmes de recherche

Les algorithmes de recherche étudiant la flexibilité conformationnelle des ligands sont généralement classés en trois catégories : les algorithmes de recherche systématique ou combinatoire, les algorithmes de recherche aléatoire ou stochastique et les algorithmes de recherche déterministe ou de simulation [170, 176].

III.3.2.1.1 Les algorithmes de recherche systématique ou combinatoire

Ces algorithmes prennent en compte tous les degrés de liberté d'une molécule en explorant toutes les liaisons rotatives possibles. Ainsi, en fonction du degré de flexibilité de la molécule, le nombre de conformations générées peut rapidement s'élever et entraîner le phénomène d'explosion combinatoire [171].

Pour éviter l'explosion combinatoire, deux méthodes ont été développées : la méthode de recherche exhaustive et la méthode de fragmentation reconstruction.

La méthode de recherche exhaustive passe par une définition de limites imposées soit par le site de liaison, soit par des contraintes géométriques et/ou chimiques imposées aux conformations initiales des ligands à docker. Dans le premier cas, les mouvements de translation et de rotation systématiques des ligands sont générés dans un site de liaison putatif et prédéfini, limitant ainsi l'espace de recherche conformationnelle du ligand. Cette méthode est employée par le logiciel EUDOC (Figure 28) [173]. Une autre méthode utilisée dans le docking ligand rigide consiste à générer une bibliothèque de conformations du ligand en utilisant des programmes tel qu'OMEGA. Ensuite, chaque conformation subit des mouvements de rotation et translation dans le site actif de la protéine de telle sorte qu'à chaque mouvement, le déplacement d'atomes ne dépasse pas une valeur seuil prédéfinie. Là aussi, grâce à cette délimitation, le risque d'explosion combinatoire est réduit (Figure 29).

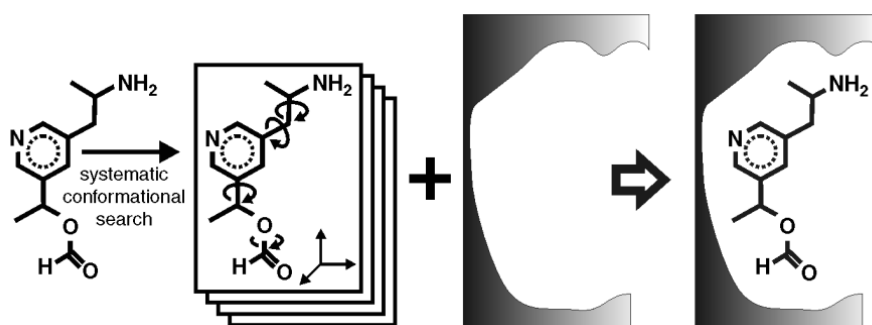


Figure 29 : Illustration de la méthode de recherche exhaustive employée par EUDOC [173]

Les méthodes de fragmentation-reconstruction consistent à diviser la molécule en fragments qui sont soit rigides soit représentés par un petit ensemble conformationnel [173]. Ensuite ces fragments peuvent être traités de deux manières : 1) placement des fragments un à un dans le site de liaison ou méthode de reconstruction incrémentale, 2) placement de tous les fragments de manière simultanée ou méthode « place and join » [173]. L'objectif est ensuite de les lier

dans une orientation favorable. Ces méthodes permettent de limiter le nombre de conformations à générer. En effet, en considérant une molécule avec 7 liaisons rotatives, si chaque liaison à 6 rotamères, le nombre de conformations à générer s'élève à 6^7 (> 250000) conformations. Alors qu'en rompant une liaison rotative pour obtenir deux fragments, cela élimine la recherche conformationnelle pour une liaison rotative et les conformations des deux fragments sont indépendantes ce qui réduit le nombre de conformations à $6^3 + 6^3 = 432$ conformations [177].

La méthode de reconstruction incrémentale est généralement constituée de 3 étapes : 1) sélection de fragments rigides, 2) placement des fragments rigides dans le site actif, 3) construction incrémentale [173]. De nombreux logiciels se basent sur cette méthode [173], notamment le logiciel Surflex-Dock [177]. Le logiciel commence par générer un « protomol », un ligand idéal qui occuperait tout l'espace du site actif de la protéine. Pour cela, 3 types de fragments (CH_4 , $\text{C}=\text{O}$, et NH) sont placés dans le site actif, optimisés pour permettre l'établissement d'interactions avec le site de liaison et scorés. Seuls les fragments ayant obtenus les meilleurs scores sont retenus pour construire le protomol (Figure 30).

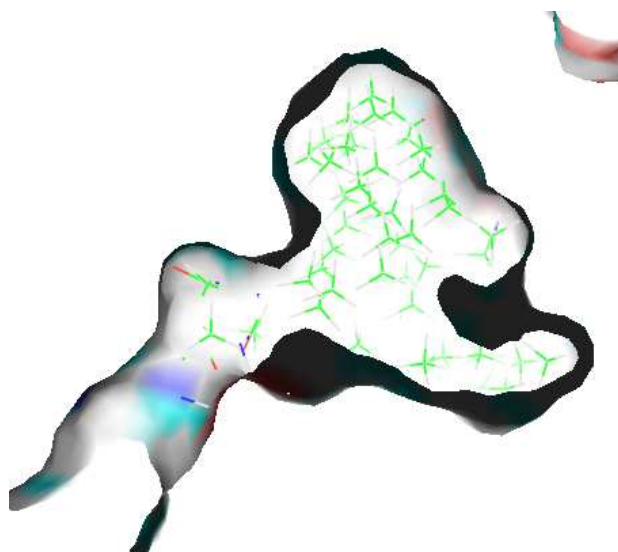


Figure 30 : Protomol généré par Surflex pour la cyclooxygénase 2 (1cx2).

Une fois le protomol généré, les molécules sont fragmentées de sorte à ne conserver que les liaisons aromatiques [177]. Puis, pour chaque fragment, un ensemble de conformations (en général 20) [177] est généré. Enfin dans l'étape de construction incrémentale, chaque fragment est aligné avec le protomol de sorte à maximiser la similarité avec le protomol

[177]. Les fragments ayant obtenus un bon score, les « heads », sont optimisés localement pour s'adapter au mieux dans le site actif. A partir de ceux-ci, les conformations du fragment suivant (« tails ») sont alignées par rapport au protomol de sorte à être liées au premier fragment (« heads ») [177]. Cet alignement tient compte des contraintes imposées par le « head » et seules les conformations respectant ces contraintes et démontrant une similarité avec le protomol sont retenues [177]. Le protocole continue jusqu'à la reconstruction totale de la molécule de départ. Enfin pour chaque pose déterminée, un score est attribué [177] (Figure 31).

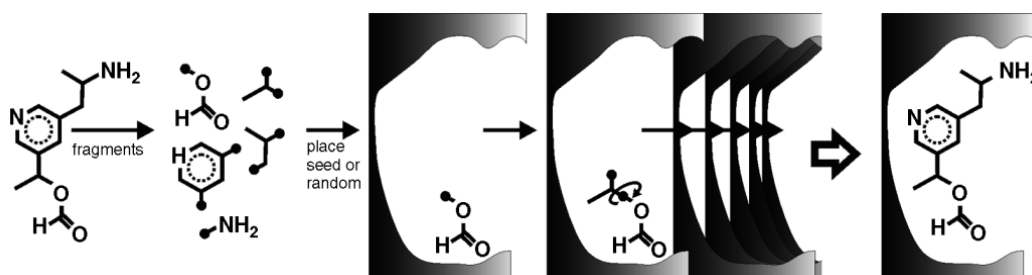


Figure 31 : Schéma illustrant la méthode de reconstruction incrémentale [173].

La méthode « place and join » décrite par DesJarlais et collaborateurs [178] consiste dans un premier temps à représenter le site de liaison par un ensemble de sphères. Ensuite les ligands sont fragmentés et dockés séparément dans le site actif. C'est à cette étape que la flexibilité des fragments est prise en compte. Puis, ils sont rassemblés de sorte à reformer le ligand initial en prenant en compte des contraintes de distances. En considérant deux fragments, il faut que les atomes de chaque fragment soient suffisamment proches pour pouvoir être joints ensemble. Cette étape détermine les différentes orientations des fragments et leur assemblage génère ainsi les différentes poses. Enfin l'énergie de chaque pose est minimisée [173, 176, 178].

III.3.2.1.2 Les algorithmes de recherche aléatoire ou stochastique

Ces algorithmes prennent en compte les mouvements de translation, rotations et torsions réalisés de manière aléatoire [171]. Les changements sont acceptés ou rejetés selon une fonction de probabilité. Les approches les plus connues sont les méthodes de Monte-Carlo, les algorithmes génétiques et la recherche tabou [171].

Les méthodes de Monte-Carlo consistent à chercher les différentes poses des ligands en explorant de manière séquentielle les mouvements de translation, rotations et torsions. Ainsi,

chaque degré de liberté est déterminé un à un et de manière aléatoire [173]. Après chaque changement, la nouvelle conformation est retenue si elle présente une énergie plus basse que la conformation précédente, sinon elle est soumise au critère de Métropolis [170, 171, 173]. Ce critère est basé sur la fonction de probabilité de Boltzmann (Equation 1).

$$P = e^{\frac{E_{new} - E_{old}}{kT}}$$

Equation 1 : Probabilité P d'acceptation d'une nouvelle conformation (avec E_{new} : énergie de la nouvelle conformation, E_{old} : énergie de l'ancienne conformation, k : constante de Boltzmann, T : température de simulation) [170]

Le processus est répété un certain nombre de fois, nombre qui définit le pas de Monte-Carlo, jusqu'à ce que le nombre de conformations désiré soit atteint [171]. De nombreux logiciels [173, 176] utilisent cette méthode tels que ICM[179] et GLIDE[180]. Ce dernier utilise dans un premier temps un algorithme de recherche systématique pour trouver les poses des ligands et les poses ayant obtenu un bon score sont dans un second temps optimisées par la méthode de Monte-Carlo [173] (Figure 32).

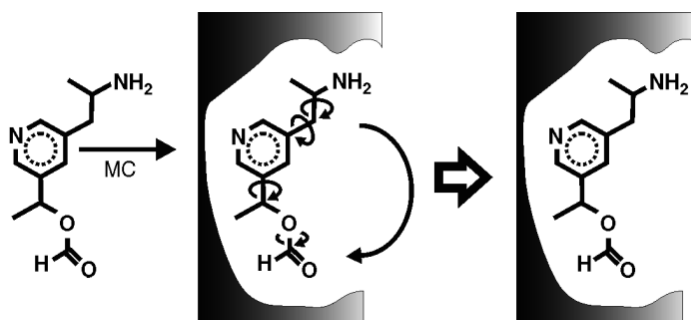


Figure 32 : Schéma illustrant la méthode de Monte-Carlo (adapté selon [173])

Les algorithmes génétiques ont pour but de mimer les principes de l'évolution naturelle afin de réduire le problème d'explosion combinatoire. Pour cela, ils utilisent des opérateurs génétiques tels que la mutation, la recombinaison et la sélection et une fonction de survie (ou « fitness function ») [181]. Les algorithmes génétiques sont constitués d'une population de conformations où chaque membre représente un chromosome. Les gènes de ces chromosomes codent pour différentes variables, c'est-à-dire pour la translation du ligand, la rotation et les angles de torsions [173]. La première génération de solutions appelée « population parent » évolue par recombinaison ou mutation en agissant respectivement sur chacun des deux

parents (recombinaison) ou sur un seul (mutation). Les résultats de ces changements génèrent la population « enfants ». Une fonction de survie est ensuite utilisée pour sélectionner les meilleures conformations qui ont le plus de chance de survivre et de passer la génération suivante. Ces conformations sélectionnées constituent alors la nouvelle population « parent » qui subira à son tour les changements des divers opérateurs génétiques [173]. Ce processus est répété jusqu'à obtenir une population finale qui répond à un seuil prédéfini par la fonction de survie [182]. De nombreux logiciels utilisent cette méthode [173, 182], l'un des plus populaires est GOLD[183] (Figure 33).

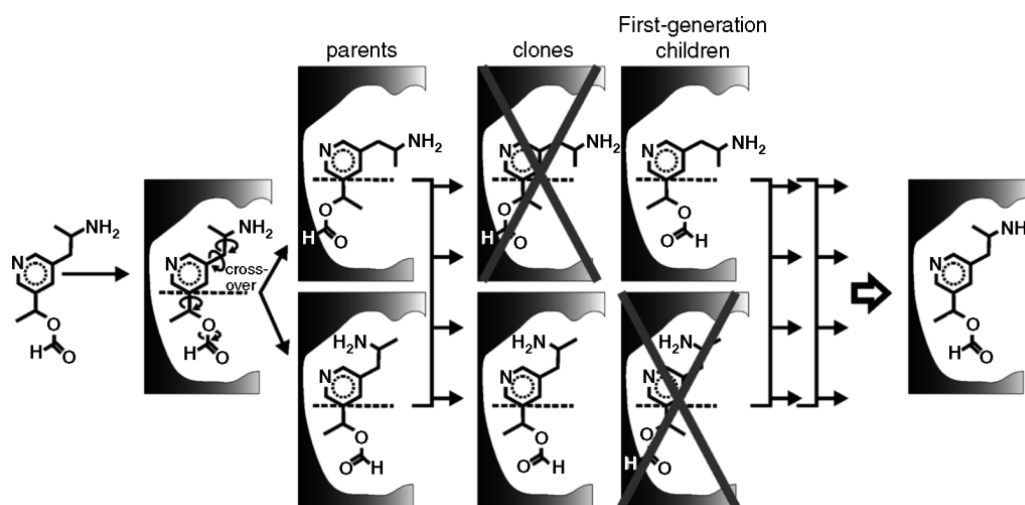


Figure 33 : Schéma illustrant la méthode utilisant les algorithmes génétiques [173]

Les algorithmes de recherche tabou s'inspirent de l'idée d'éviter de ré-évaluer un espace conformationnel déjà exploré par l'algorithme de recherche [173]. Pour cela des espaces de restrictions sont organisées sous forme de « liste tabou » constituant les conformations déjà obtenues [173, 184]. La recherche commence à partir d'une seule conformation d'un ligand puis différentes conformations sont générées grâce à une procédure similaire à la mutation qui réalise des changements de manière aléatoire. Ces conformations sont scorées et ordonnées selon une fonction d'énergie [184] : les conformations d'énergie plus basse qui ne sont pas encore contenues dans la liste tabou (« non-tabou ») sont ajoutées à cette liste, celles qui sont très similaires à la liste ne sont intégrées dans la liste que si et seulement si elles présentent une énergie plus basse [184]. Enfin, les autres conformations ne répondant pas à ces critères, sont rejetées [171, 173]. Le processus continue en commençant par la dernière conformation retenue et s'arrête jusqu'à atteindre la limite d'itérations ou jusqu'à ce qu'aucun changement

acceptable ne soit obtenu [184]. Le logiciel PRO_LEADS [185] est l'un des logiciels les plus connus utilisant cette approche (Figure 34).

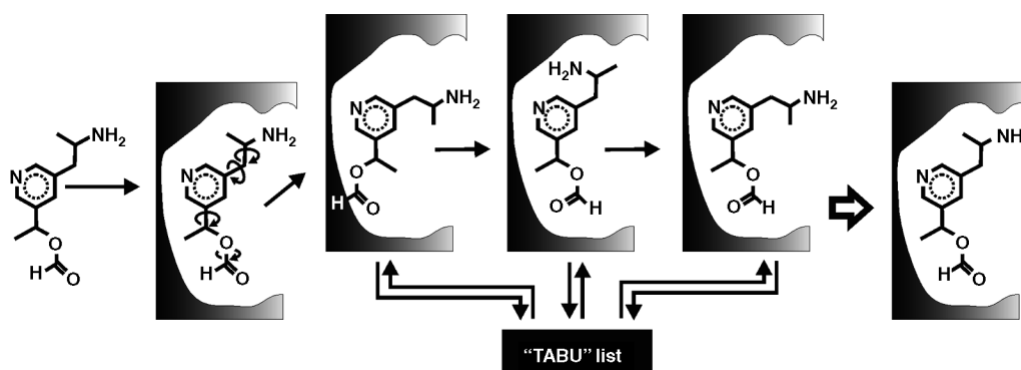


Figure 34 : Schéma illustrant la méthode de recherche tabou. [173]

III.3.2.1.3 Les algorithmes de recherche déterministe ou de simulation

Deux méthodes principales les caractérisent : les méthodes de dynamique moléculaire et les méthodes de minimisation d'énergie.

Les méthodes de dynamique moléculaire se basent sur les équations de mouvements de Newton (Equation 2) [171, 173] :

$$F_i = m_i a_i$$

Equation 2 : Equation du mouvement de Newton pour un système atomique (F : force, m : masse, a : accélération)

La force de chaque atome est déterminée à partir d'un changement dans l'énergie potentielle entre la position actuelle et une nouvelle position (Equation 3) [171] :

$$F_i = -\frac{dE}{r_i}$$

Equation 3 : Calcul de la force (F) de chaque atome (E : énergie potentiel, r : distance entre les deux positions)

Les positions atomiques sont ensuite déterminées à des intervalles de temps très courts permettant d'obtenir la trajectoire des changements des positions atomiques au cours du temps (Equation 4) [171].

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i}$$

Equation 4 : Calcul des positions atomiques à chaque intervalle de temps (d^2r_i/dt^2), avec F : force et m : masse atomique)

Les méthodes de dynamique moléculaire présentent des temps de calculs trop longs et arrivent difficilement à franchir les barrières de hautes énergies [173]. En conséquence, l'identification du minimum global d'énergie se révèle être très difficile voire quasi-impossible avec ces méthodes et les conformations des ligands obtenues sont généralement piégées dans des minimaux locaux d'énergie [171, 173, 176]. De plus, les résultats finaux dépendent grandement de la conformation initiale. Malgré tout, de nombreuses approches ont été développées pour pallier à ce problème [171, 173, 176]. Une des méthodes consiste à réaliser des simulations de différentes parties du complexe ligand-récepteur en variant la température [186] tandis que d'autres proposent de lancer la simulation de dynamique moléculaire à partir de différentes positions initiales du ligand [171] afin d'augmenter les chances de trouver un minimum local d'énergie [173, 176].

Les méthodes de minimisation d'énergie recherchent uniquement si des minimaux locaux d'énergie peuvent être atteints. Elles sont en général utilisées en complément d'autres méthodes [171].

III.3.3 Docking « semi-flexible »

En règle générale, la flexibilité des protéines est souvent négligée dans les méthodes de docking car ce concept est encore de nos jours mal défini et le temps de calcul est beaucoup trop long [173]. Or, les différentes conformations que peuvent adopter une protéine doivent être prise en compte car une conformation particulière d'une protéine lui confère une fonction spécifique [173]. En général, les protocoles de docking utilisent des complexes de protéine co-cristallisée avec un ligand. Cependant, ces complexes ne représentent qu'une petite partie

de la flexibilité de la protéine et d'autres conformations pourraient se révéler être plus intéressantes. De plus, les changements conformationnels de la protéine tiennent un rôle majeur dans l'ajustement du ligand dans son site actif et la mise en place des interactions entre le ligand et son récepteur [173].

La capacité de simuler ces changements conformationnels avec des temps de calculs raisonnables est devenu un véritable challenge [173]. De nombreuses approches [173], connues sous le nom de docking « semi-flexible », ont été développées permettant une flexibilité partielle de la protéine.

La prise en compte de la flexibilité peut alors se réaliser à différents moments du docking :

- Avant le docking

Les approches qualifiées d' « ensemble » considèrent un groupe de structures de protéine dans différentes conformations [173, 187, 188] obtenues par cristallographie aux rayons X ou RMN. Ensuite, le docking des ligands peut être réalisé dans chaque conformation séparément en ne gardant que le meilleur score pour chaque ligand, ou en utilisant quelques ou toutes les structures disponibles en un seul docking [187].

Une autre approche est d'utiliser des méthodes de dynamique moléculaire ou de Monte Carlo [171, 173, 176, 187, 188]. La dynamique moléculaire permet de capturer des images instantanées de la protéine des différentes conformations observées au cours du temps. Ces dernières peuvent être ensuite utilisées pour réaliser un docking.

- Au cours du docking

Ces approches consistent à utiliser des bibliothèques de rotamères [171, 173, 176, 182, 187]. Ces bibliothèques explorent les degrés de liberté des chaînes latérales des résidus du site actif de la protéine pour trouver la combinaison optimale entre les chaînes latérales des résidus et l'orientation du ligand. Cependant, d'autres approches constituent des bibliothèques de rotamères en se limitant aux mouvements de torsions des résidus pour trouver la complémentarité optimale du ligand au cours du docking. Enfin certaines approches combinent la flexibilité des chaînes latérales et celle du squelette des résidus de la protéine pour constituer ces bibliothèques [187].

- Après le docking

L'approche « soft-docking » permet d'induire de petits changements conformationnels dans le site actif de la protéine grâce à une fonction de score plus indulgente (« soft ») qui autorise des clashes stériques entre les atomes du ligand et les atomes de la protéine. Cette fonction donne alors une certaine estimation de la « plasticité » du récepteur [188]. L'objectif est de trouver la bonne orientation du ligand et des résidus dans le site actif de la protéine [187, 188]. L'approche soft-docking a été introduite dans de nombreux programmes de docking [182, 187] et peut être utilisée en fin de docking lors de l'attribution de scores en utilisant la fonction de score « soft ».

III.3.4 Scoring

Les fonctions de score ont pour but de prédire l'affinité de liaison entre la protéine et chaque pose générée lors du docking [170, 182]. En effet, même si les conformations sont correctement prédites, il est primordial de pouvoir différencier les poses correctes des poses incorrectes [171]. Le rôle principal des fonctions de score est donc d'évaluer et de classer les poses [170] pour identifier le « vrai » mode de liaison des composés [182] et les ligands les plus prometteurs [171].

III.3.4.1 Fonctions de score

Les fonctions de score sont divisées en trois catégories : les fonctions de scores basées sur les champs de force, les fonctions de score empiriques et les fonctions de score basées sur les connaissances [171].

Les fonctions de score basées sur les champs de force caractérisent l'énergie d'une pose par la somme de deux termes énergétiques [171]: l'une représentant l'énergie d'interaction ligand-récepteur et l'autre l'énergie interne du ligand. En général, ces fonctions de score se basent sur les champs de force de mécanique moléculaire qui permettent de calculer l'énergie potentielle du système (E_{MM}). E_{MM} est calculée par une somme de quatre termes (Equation 5) : les trois premiers termes estiment l'énergie interne du ligand en pénalisant les déviations de longueurs et d'angles de liaisons du ligand par rapport aux valeurs de références. Le quatrième terme reflète la contribution enthalpique estimée par les potentiels de Lennard-Jones et de Coulomb. Le potentiel de Lennard-Jones évalue les interactions de Van der Waals et le potentiel de Coulomb détermine les interactions électrostatiques [176](Equation 5).

$$E_{MM} = \sum_{\text{bond}} K_r (r - r_{ref})^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\vartheta - \vartheta_{ref})^2 + \sum_{\text{dihedrals}} K_\Phi [1 + \cos(n\Phi - \Phi_0)]^2 + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

Equation 5 : Calcul de l'énergie potentielle d'un système (E_{MM}) par les champs de force de mécanique moléculaire. Avec K_r , K_θ et K_Φ : facteurs de pénalité pour les liaisons, les angles et les angles dièdres ; r et r_{ref} : longueurs des liaisons mesurées et de référence ϑ et ϑ_{ref} : valeurs des angles mesurées et de référence ; Φ et Φ_{ref} : valeurs des angles dièdres mesurées et de référence ; A_{ij} et B_{ij} : constantes attractives et répulsives mesurées expérimentalement ; R_{ij} : distance entre les atomes i et j ; q_i et q_j : charges des atomes i et j ; ϵ : constante diélectrique [176]

En règle générale, les fonctions de score basées sur les champs de force simplifient l'équation E_{MM} et se concentrent uniquement sur les interactions de Van der Waals et électrostatiques (Equation 6).

$$\Delta G_{bind} = \sum_{i=1}^{\text{ligand}} \sum_{j=1}^{\text{protéine}} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

Equation 6 : Calcul de l'énergie libre de liaison (ΔG_{bind}) prenant en compte uniquement la contribution enthalpique évaluée par les potentiels de Lennard-Jones et de Coulomb

Ainsi plusieurs champs de force de mécanique moléculaire tels que AMBER, CHARMM... ont été développés et introduits dans de nombreux logiciels (GOLD, AutoDock...) [173].

L'avantage de l'utilisation des fonctions de score basées sur les champs de force réside en leur rapidité de calcul mais leur grand inconvénient est qu'elles ne prennent pas en compte les effets entropiques et de solvation [171, 176, 182] ce qui a été amélioré dans différents logiciels (GOLD, AutoDock [171, 182], HINT, [173], les versions de DOCK récentes (5 et 6) [173].

Les fonctions de score empiriques ont pour but de reproduire les données expérimentales d'énergie de liaison et utilisent une somme de plusieurs termes individuels non corrélés pondérés par des coefficients (Equation 7) [171, 173, 182]. Les coefficients des différents termes sont calculés par des analyses de régression utilisant les données expérimentales d'affinité et les données structurales de cristallographie [182].

$$\Delta G_{\text{binding}} \approx \sum \Delta G_i f_i$$

Equation 7 : Forme simplifiée d'une fonction de score empirique. (Avec $\Delta G_{\text{binding}}$: l'affinité de liaison, f_i correspond à un terme d'une interaction i entre le ligand et la protéine et ΔG_i le coefficient associé) [170]

L'avantage d'utiliser les fonctions de score empiriques est que leur forme est plus simple que celles basées sur les champs de force, leurs termes sont facilement déterminés [171] et les temps de calculs sont relativement rapides [182]. Cependant, cette méthode reste dépendante des données expérimentales [170, 171] et les valeurs des coefficients varient entre différentes fonctions de scores empiriques pour un terme donné. En conséquence, les termes provenant de différentes fonctions de scores ne peuvent pas être combinés en une seule fonction [171].

Les fonctions de scores basées sur les connaissances ou « knowledge-based » ont pour but de reproduire les données expérimentales en utilisant des structures de complexes ligand-récepteur [171, 182]. L'idée provient du fait que dans un complexe obtenu par cristallographie, les atomes du ligand sont placés de manière optimale par rapport aux atomes de la protéine. Des analyses statistiques permettent de déterminer la fréquence et la distribution des paires d'atomes entre le ligand et la protéine et ainsi de définir des potentiels d'interaction [171, 182]. En effet, il a été postulé que les interactions les plus fréquemment observées contribuent positivement au processus général de mode de liaison tandis que les interactions les moins communes sont considérées comme globalement répulsives [173].

Les avantages de ces fonctions « knowledge-based » résident sur leur simplicité et leur rapidité en temps de calcul. Cependant, leurs inconvénients, similaires aux méthodes empiriques, sont leur dépendance sur la qualité et la variété des données expérimentales [173].

De nombreuses fonctions de score basées sur la connaissance ont été développées. Les plus connues sont PMF, DrugScore, SMOG [171, 173, 182].

Les fonctions de scores sont souvent critiquées [170] puisqu'elles ne reflètent qu'une approximation de l'énergie de liaison libre du complexe ligand-protéine. De plus, ces fonctions utilisent des termes additifs, elles ont donc tendance à favoriser les molécules ayant un poids moléculaire élevé (> 250 g/mol) en leur attribuant un haut score. Des logiciels ont alors amélioré leurs fonctions de score en supprimant la corrélation entre le score et le nombre d'atomes (FLOG) [170]. De même, les fonctions de score pénalisent rarement les interactions

défavorables et des améliorations ont été apportées en prenant en compte les clashes stériques [170]. Cependant, d'autres points restent à améliorer tels que la prise en compte incomplète de l'occupation stérique du ligand dans la cavité du site actif et l'espace restant inoccupée, et la reconnaissance de ligands inactifs [170].

De nouvelles approches doivent donc être établies afin d'optimiser les fonctions de score [170]. Le « consensus scoring » ou fonction de score consensus a été développé en se basant sur l'hypothèse que la combinaison de plusieurs fonctions pourrait dominer les faiblesses individuelles de chacune des fonctions et démontrer une meilleure performance en terme de scoring [173].

Trois principales méthodes de « consensus scoring » peuvent être décrites : les méthodes « rank by vote » (attribution d'un « vote » pour une pose, pour chaque fonction de score du consensus qui la prédit dans les n premiers %), les méthodes « rank by rank » (calcul de la moyenne des rangs prédits par chaque fonction de score) et les méthodes « rank by number » (calcul de la moyenne des scores prédits par chaque fonction de score) [173].

Les fonctions de score consensus ont été utilisées dans de nombreuses études révélant des résultats intéressants [189-191]. Cependant, cette méthode présente un inconvénient majeur : utiliser différentes fonctions de score qui sont corrélées risque d'amplifier les erreurs de calculs plutôt que de les compenser [171, 182]. Il faut donc trouver de nouvelles stratégies réduisant ce problème et favoriser le développement de nouvelles fonctions de score consensus.

III.3.4.2 Autres paramètres importants à prendre en compte pour réaliser un docking

III.3.4.2.1 Importance des structures de protéines

L'un des éléments essentiels à considérer avant de réaliser un docking est la disponibilité et la qualité de la structure des protéines étudiées [173]. En général, les sources d'information de ces structures proviennent majoritairement de la cristallographie aux rayons X et de la RMN. La structure résolue par cristallographie aux rayons X est en fait un modèle construit en cherchant des correspondances entre les atomes et la densité électronique [192] (Figure 35). La qualité de la structure obtenue doit donc être évaluée à l'aide de différents paramètres. La résolution mesure la précision avec laquelle le modèle cristallographique reproduit les

données expérimentales. En général, une structure cristallographique présentant une résolution inférieure à 2Å est considérée comme une source de donnée fiable [173]. Un autre paramètre intéressant est le facteur R ou R_{free} qui détermine le pourcentage de différence entre le cristal et le modèle. Enfin le facteur de température ou « B-factor » mesure le déplacement des atomes [193], et donne des indications sur la mobilité locale de la structure de protéine [192] et de la fiabilité du modèle [193]. Les limites de la RMN résident dans la taille de la protéine (80-100 kDa) et les problèmes de solubilité limitent cette technique.

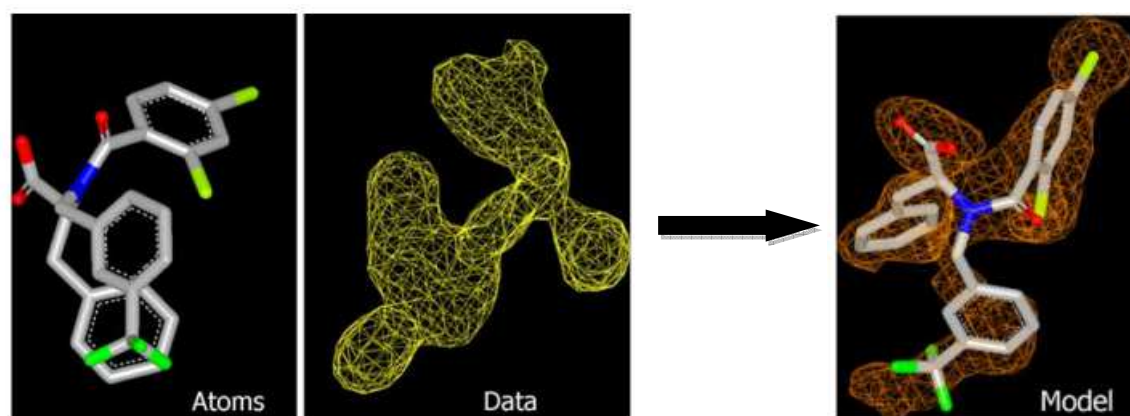


Figure 35 : Processus de correspondance entre les atomes et la densité électronique pour produire un modèle cristallographique. [192]

D'autres critères sont à prendre en compte concernant l'évaluation de la qualité des structures de protéines, notamment la position des hydrogènes, les états tautomériques et d'ionisation des résidus de la protéine (en particulier du site actif) et du ligand [173].

III.3.4.2.2 Importance du solvant

L'eau joue un rôle essentiel dans les interactions ligand-protéine [173]. Les molécules d'eau peuvent notamment servir de pont entre la protéine et le ligand permettant de stabiliser le complexe. La disposition des molécules d'eau dans le site actif peut aussi permettre à la protéine d'adopter une conformation permettant d'accueillir le ligand. Beaucoup de logiciels de docking prennent en compte l'eau de manière implicite, par les effets de solvation [170] mais il existe un réel besoin d'explicitement l'eau. De nombreuses approches ont été développées dans ce but (Consolv du logiciel SLIDE [194], FlexX [195]). Leur objectif est de déterminer quelles molécules d'eau sont nécessaires à l'établissement des interactions ligand-protéine et devraient être retenues et lesquelles devraient être déplacées.

Les méthodes de docking, tout comme les modèles pharmacophoriques, sont très utilisées pour guider les scientifiques dans le développement de nouveaux médicaments. Le docking tente de distinguer « les vrais » ligands des ligands alternatifs grâce à une prédiction du mode de liaison. Cette prédiction se veut être la plus précise possible en reflétant au maximum les données expérimentales. Ainsi les algorithmes de recherche et les fonctions de score qui constituent les programmes de docking ne cessent d'être améliorés : introduction des molécules d'eau, qualité des modèles cristallographiques, prise en compte de la flexibilité de la protéine, fonction de score consensus...faisant de ces méthodes un outil remarquable, capable d'identifier des molécules intéressantes.

**Quatrième partie : Développement de
nouveaux inhibiteurs sélectifs de la
cyclooxygénase-2 – Résultats et
discussion**

IV.1 Introduction

Les deux derniers chapitres présentent les travaux réalisés à l'interface de deux domaines : la chimie médicinale et la bioinformatique.

Dans un premier temps, compte tenu des antécédents de cette étude (criblage *in silico* et évaluations biologiques), nous nous sommes intéressés au développement d'une nouvelle série de dérivés du cyclocoumarol à visée anti-inflammatoire. L'objectif était de proposer différents types de pharmacomodulation suivant une approche de chimie thérapeutique relativement classique. Les différentes étapes de synthèses réalisées au laboratoire pour préparer les analogues de cyclocoumarol désirés seront présentées.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des outils bioinformatiques permettant d'étudier le site actif de la COX-2 et de mieux comprendre les différents modes de liaisons pouvant s'y établir. Nous nous sommes ensuite consacrés à générer des modèles pharmacophoriques (LigandScout) et à estimer l'affinité des molécules par une visualisation directe de la structure (SeeSar). Les conclusions de cette étude doivent permettre d'orienter la recherche de nouvelles molécules inhibitrices et sélectives de la COX-2, tout en conservant le squelette de base du cyclocoumarol.

IV.2 Choix du cyclocoumarol

IV.2.1 Antécédents de l'étude

Des études récentes de prédiction de l'activité biologique par validation d'un algorithme de criblage virtuel en utilisant le logiciel TOMOCOMD-CARDD (TOpological MOlecular COMputational Design Computer-Aided-Rational-Drug Design) [196] ont montré que le cyclocoumarol, médicament utilisé en thérapeutique, en tant qu'anticoagulant, possède des propriétés anti-inflammatoires. Ces travaux de recherche ont été réalisés par le groupe de Drug Design dirigé par le Pr Yovani Marrero à l'Université centrale de las Villas, Santa Clara, Cuba [12].

Les modèles de prédiction QSAR ont été générés à partir d'une base de données très diverse comportant des molécules connues comme ayant des propriétés anti-inflammatoires et des molécules dont l'activité anti-inflammatoire n'a pas encore été démontrée et donc supposées

non anti-inflammatoires. La diversité de cette base de données permettait une large représentativité de molécules avec des structures chimiques variées et une diversité de mécanismes d'action anti-inflammatoire. Cette étude de prédiction a concerné une base de 1213 molécules dont 587 sont des molécules connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires (glucocorticoïdes, AINS et inhibiteurs sélectifs de COX-2), et les 626 restantes présentant une activité biologique complètement différente (antiviraux, sédatifs, hypnotiques, diurétiques, anticonvulsants, hémostatiques, hypoglycémiant oraux, antihypertenseurs, antihistaminiques et anticancéreux). Les molécules décrivant l'activité anti-inflammatoire ont été définies comme « actives », tandis que celles possédant une activité non anti-inflammatoire ont été définies comme « inactives ». Cette série de composés a été analysée par une analyse « k-MAC cluster » en vue de créer un groupe d'entraînement « training set » (919 composés) et un groupe de prédiction, « test set » (294 composés). Chaque groupe étant constitué de composés actifs et inactifs : le « training set » contient 443 composés actifs et 476 composés inactifs, et le « test set » 144 molécules actives et 150 molécules inactives (Schéma 8). Des indices quadratiques et linéaires (stochastiques et non stochastiques) ont été utilisés pour développer les modèles de prédiction de relations structure activité anti-inflammatoire. Les descripteurs moléculaires utilisés ont pour but de décrire la géométrie, et la topographie des molécules, mais également de distinguer chaque atome (masse atomique, polarisabilité, électronégativité...etc) et chaque liaison (simple, double...) caractérisant la structure d'une molécule donnée. Treize modèles avec une prédiction supérieure à 86% pour le « training group » ont été obtenus. La robustesse de ces modèles a été démontrée à l'aide d'un test de validation qui a présenté des classifications supérieures à 85%. Selon les résultats de précision, de sensibilité et de spécificité (taux de succès et taux de faux positifs), ces modèles de prédiction ont été validés. Selon ces modèles, 200 composés se sont révélés potentiellement anti-inflammatoires. Parmi ceux-ci, 8 ont été choisis en fonction de la diversité structurale et de l'activité décrite, pour le criblage *in vivo* utilisant le poisson zebrafish en tant que modèle biologique. Ces résultats ont confirmé le potentiel prédictif du TOMOCOMD-CARDD. Parmi ces composés, le cyclocoumarol, a montré une activité anti-inflammatoire prometteuse [196].

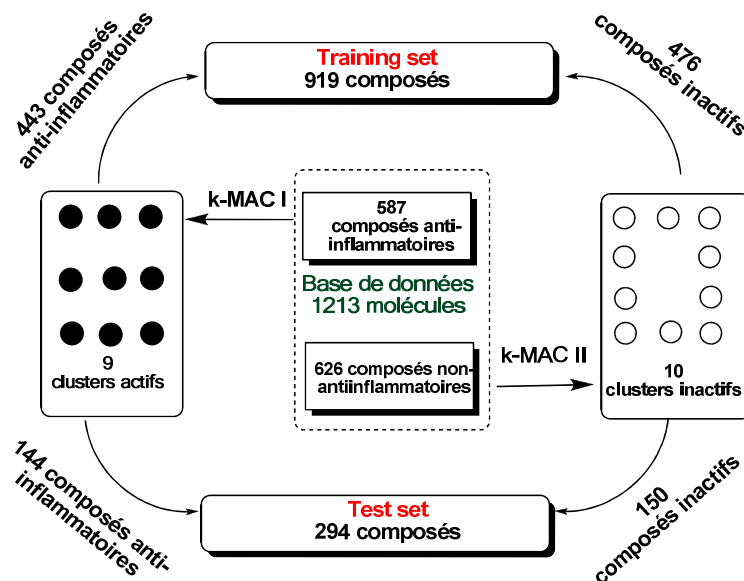


Schéma 8 : Algorithme général utilisé pour avec le logiciel TOMOCOMD-CARDD pour dessiner les « training sets » et les « test sets » via l'analyse de clusters (k-MAC) (adapté selon [196])

Le cyclocoumarol est connu en thérapeutique pour ses propriétés anticoagulantes [197, 198]. Il est prescrit dès 1954 pour le traitement de l'infarctus du myocarde [199] et d'un point de vue structural, c'est un composé hétérocyclique comportant un noyau coumarin.

Cette caractéristique chimique est d'autant plus intéressante car les molécules contenant un noyau coumarin sont décrits dans la littérature comme des molécules possédant un large spectre d'activités biologiques : anti-fongique [200-202], anti-bactérienne [203-205], antioxydante [206-208], anticoagulante [209-211], anti-malarique [212], antituberculeuse [208, 213-215], anti-neurodégénérative [210, 216], anti-virale [213, 217], anti-cancéreuse [203, 208, 214, 218-220], anti-inflammatoire [15, 221-224].

Compte tenu de notre intérêt à développer des analogues du cyclocoumarol, nous nous sommes intéressés aux coumarines issues de la famille des α -benzopyrones (**1**) (Figure 35). Ces coumarines sont classées en quatre sous-familles : les coumarines simples (ex : la 7-hydroxycoumarine (**2**)), les furanocoumarines (ex : le psoralène (**3**), et l'angélicine (**4**)), les pyranocoumarines (la séséline (**5**), le xanthyletine (**6**) et le cyclocoumarol (**7a**)), et les coumarines substituées par une pyrone (la warfarine, **8a**) [219] (Figure 36).

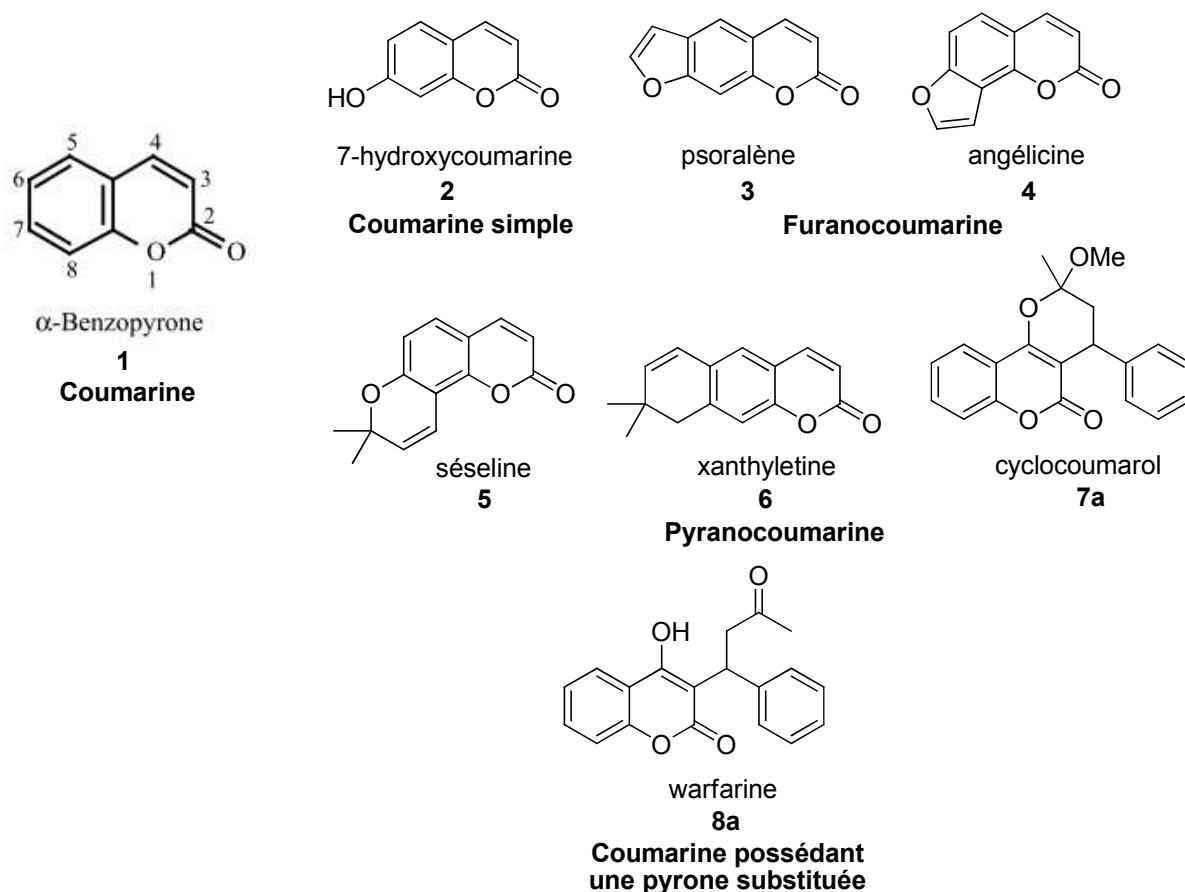
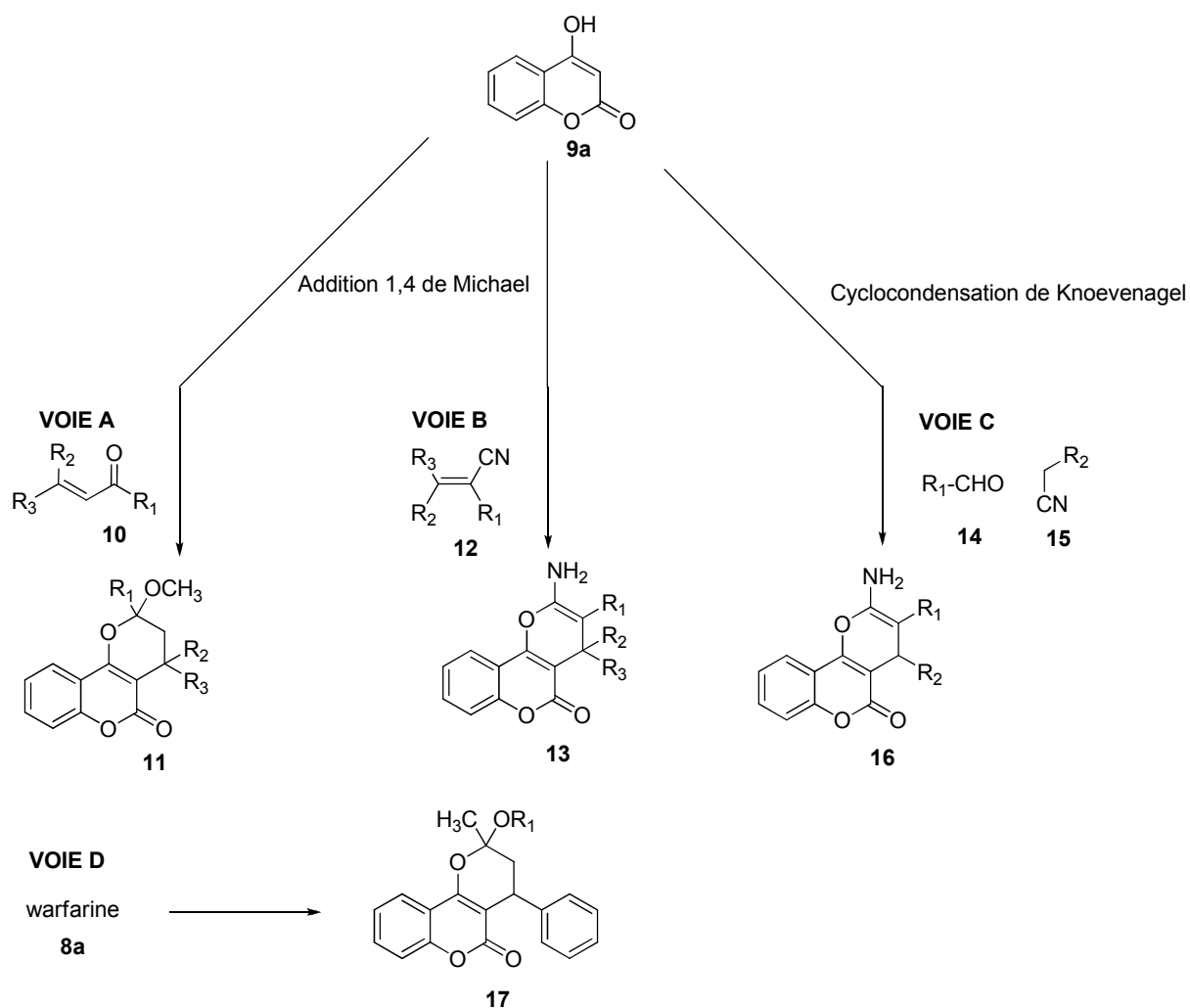


Figure 36 : Structure chimique et numérotation IUPAC de la coumarine (α -benzopyrone) et les quatre sous-familles de la coumarine [219]

La famille des pyranocoumarines dont fait partie le cyclocoumarol est très diverse. Ces composés peuvent être obtenus à partir de la 4-hydroxycoumarine (**9a**) par réaction d'addition de Michael [209, 225, 226], par réaction de cyclocondensation de Knoevenagel [227] ou par cyclisation de la warfarine [228].

La voie A conduit à la formation de dérivés pyranocoumariniques (**11**) à partir d'une cétone α , β insaturée (**10**) en utilisant l'eau comme solvant suivie d'une cyclisation en milieu acide [209]. La voie B propose l'utilisation de cinnamionitrile (**12**) en milieu basique permettant d'accéder aux dérivés amino-pyranocoumarins correspondants (**13**) [229-231]. Outre la réaction de Michael, la cyclocondensation de Knoevenagel, médiée par des dérivés aldéhydes (**14**) et cyano (**15**) [227] permet également d'obtenir diverses aminopyranocoumarines (**16**) par une réaction « one-pot » (voie C). Une autre méthode, illustrée par la voie D concerne l'utilisation la warfarine (**8a**) en milieu acide, pour obtenir les pyranocoumarines correspondantes (**17**) [228] (Schéma 9).



VOIE A :

H₂O puis MeOH/HCl R₁, R₂, R₃ = CH₃, aromatiques, H rdt (**11**): 13-83%

VOIE B :

morpholine/EtOH R₁ = CN, NO₂, ester
 ou Et₃N/EtOH R₂ = alkyle, aromatiques
 ou NaOMe/MeOH R₃ = H, Me rdt (**13**): 52-85%

VOIE C :

morpholine/EtOH R₁ = alkyle, alcènes
 R₂ = CN rdt (**16**): 87-92%

VOIE D :

R₁OH/HCl R₁ = alkyle, alcène, ester,
 halogénure d'alcane... rdt (**17**): 12-95%

Schéma 9 : Quelques exemples de synthèses de dérivés pyranocoumarins [209, 225]

Tous ces analogues se sont montrés efficaces contre des problèmes de coagulation, cardiovasculaires et neurodégénératifs. Ils peuvent également être utilisés en tant

qu'insecticides ou sont décrits comme des intermédiaires de synthèse de produits naturels bioactifs ou de molécules à visée thérapeutique. [225, 232].

L'intérêt thérapeutique de ces molécules justifierait l'étude de nouvelles structures pyranocoumariniques dans le but d'explorer de nouvelles activités biologiques. Au cours de la thèse, nos efforts se sont portés sur la synthèse des analogues du cyclocoumarol. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes pour synthétiser des pyranocoumarines [209, 225] peu de voies de synthèse ont été décrites pour préparer le cyclocoumarol. A notre connaissance, il n'y a pas d'étude qui se soit intéressée aux propriétés du cyclocoumarol (et de ses dérivés) en tant qu'inhibiteur de la COX-2. Ainsi, il nous a paru intéressant d'explorer cette structure afin d'orienter son activité vers une inhibition sélective de la COX-2.

IV.2.2 Pharmacomodulation du cyclocoumarol

Avec l'objectif de préparer des analogues du cyclocoumarol potentiellement anti-inflammatoires, nous avons envisagé plusieurs modifications structurales. Ces modifications sont illustrées dans le Schéma 10. La fonctionnalisation des noyaux aromatiques par différents groupements permet l'introduction de divers substituants donneurs ou accepteurs pour créer des liaisons hydrogène ou des liaisons hydrophobes. Le remplacement du groupement méthoxy du motif acétal par un hydroxyle ou un éthoxy apporterait une diversité supplémentaire intéressante (Schéma 10).

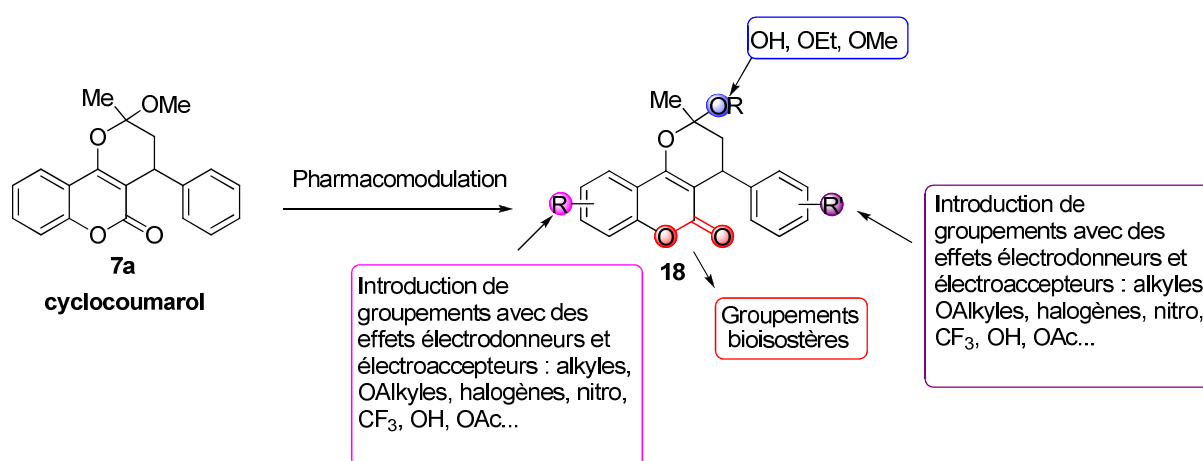


Schéma 10 : Optimisation structurale du cyclocoumarol

Au début du projet de thèse, nous avons défini deux stratégies pour synthétiser de nouveaux analogues du cyclocoumarol (Schéma 11 et Schéma 12). La première stratégie proposée passe

par la fonctionnalisation du groupement phényle (pharmacomodulation 1) et la deuxième stratégie concerne la fonctionnalisation du noyau coumarin.

La rétrosynthèse de la fonctionnalisation du groupement phényle est décrite sur le schéma 9. Le cyclocoumarol fonctionnalisé (**7**) proviendrait d'une addition de Michael conjuguée entre la 4-hydroxycoumarine (**9a**) et la cétone α, β insaturée (**19**) qui pourrait elle-même être synthétisée à partir des aldéhydes correspondants par réaction de Claisen-Schmidt [233-237] (Schéma 11).

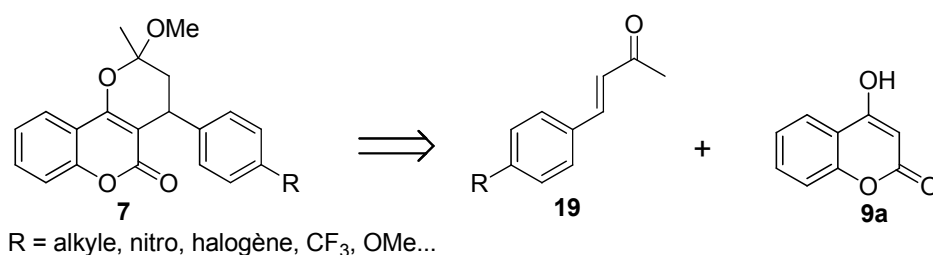


Schéma 11 : Première stratégie de synthèse envisagée

La deuxième série de molécules fonctionnalisées au niveau du noyau de la coumarine (**20**) pourrait être obtenue par une addition conjuguée de Michael à partir de la 4-hydroxycoumarine fonctionnalisée (**9**). Cette dernière pourrait être obtenue à partir du dérivé 1-(2-hydroxyphényl)éthanone (**21**) correspondant préparé par un réarrangement de Fries à partir de l'acétate de phényle (**22**) [221, 238-241] (Schéma 12).

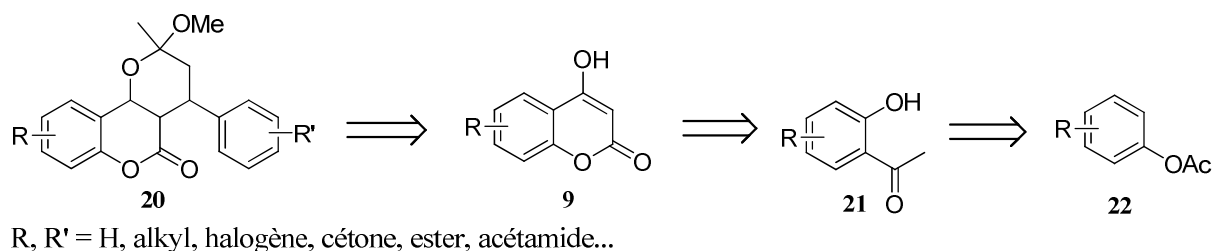


Schéma 12 : Deuxième stratégie de synthèse envisagée

Au cours de cette thèse, nos efforts se sont particulièrement concentrés sur la première pharmacomodulation. Les résultats sont détaillés ci-après.

IV.3 Résultats et discussion

IV.3.1 Synthèse

La synthèse des dérivés du cyclocoumarol nécessite 3 étapes : la synthèse de benzalacétones fonctionnalisées, la préparation des warfarines correspondantes et la synthèse des analogues du cyclocoumarol. Pour chaque étape de synthèse, un rappel de la littérature sera évoqué puis les résultats expérimentaux seront présentés et analysés (Schéma 13).

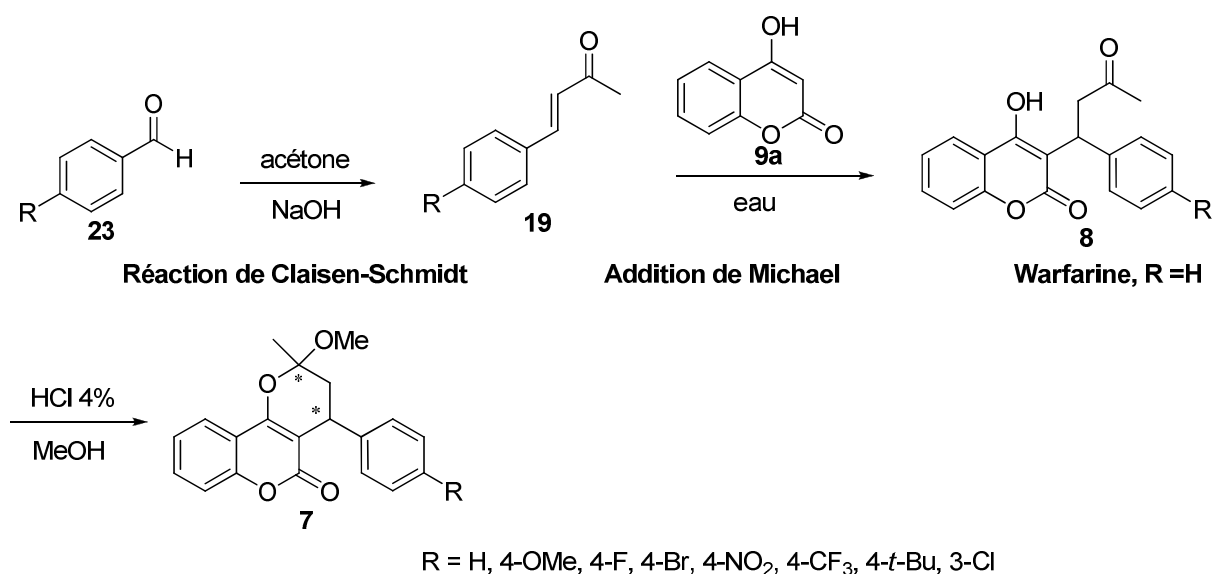


Schéma 13 : Synthèse des dérivés du cyclocoumarol

IV.3.1.1 Synthèse de benzalacétones

IV.3.1.1.1 Littérature

Les benzalacétones sont des composés intéressants en chimie organique. Elles sont caractérisées par une fonction cétone α , β -insaturée. Leur réactivité se distingue par ce système conjugué qui en font des intermédiaires réactionnels bien connus, notamment pour la synthèse de molécules bioactives [209-211]. Ainsi les benzalacétones sont utilisées dans les synthèses de la warfarine (**8a**), une molécule commercialisée sous le nom de Coumadine®, et de l'acénocoumarol (**24**), un médicament connu sous le nom de Sintrom®. Ces deux molécules possèdent des propriétés anticoagulantes [209, 210] (Figure 37).

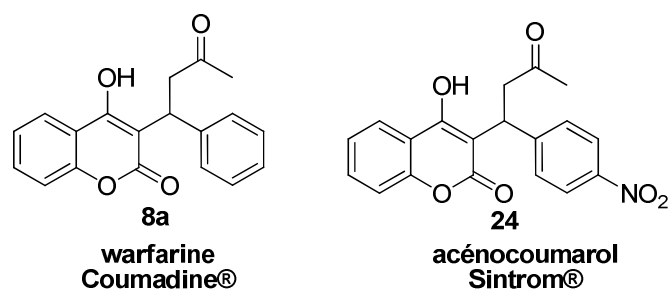


Figure 37 : Structure de la warfarine (8a) et de l'acénocoumarol (24)

En général, la majorité des réactions développées pour préparer les benzalacétones concernent la réaction d'aldolisation. Cependant, d'autres méthodes utilisant en particulier des couplages pallado-catalysés, permettent d'obtenir des benzalacétones. Par la suite, quelques publications illustreront la synthèse de ces composés. Tout d'abord une méthode décrivant la réaction de Heck sera présentée puis des synthèses traduisant la réaction d'aldolisation seront décrites. Les synthèses qui seront présentées utilisent des catalyseurs particuliers, notamment des catalyseurs acides tels que les zéolites béta ou des acides aminés naturels comme la proline. Enfin, la réaction de Claisen-Schmidt sera présentée.

Nishiwaki et collaborateurs [242] proposent en 2014, de former des benzalacétones par réaction de Heck. La méthode développée utilise du palladium (Pd) immobilisé sur une glace en verre. La réaction se fait en présence d'iodobenzène et de méthylvinyl cétone pendant 12 h à 120 °C. La benzalacétone (27) est obtenue avec 75% de rendement. Le cycle catalytique concerne l'addition oxydante de l'iodobenzène (Ph-I) (25) au Pd⁰ immobilisé sur le support de glace en verre, suivie par une réaction d'insertion de l'alcène (26) et une β élimination. Enfin une élimination réductrice médiée par la triéthylamine permet de régénérer le catalyseur. Cette méthode est également utilisée pour obtenir des nitriles conjugués [242] (Schéma 14). Ainsi à travers cette nouvelle méthode, la formation de sous-produits non désirés n'est pas observée contrairement à un chauffage classique. D'autre part, le catalyseur peut être réutilisé de nombreuses fois et les avantages d'immobiliser le Pd sur une glace en verre permettent d'assurer une stabilité du catalyseur vis-à-vis de l'air, un traitement de la réaction plus aisé et le prix peu coûteux de la glace de verre.

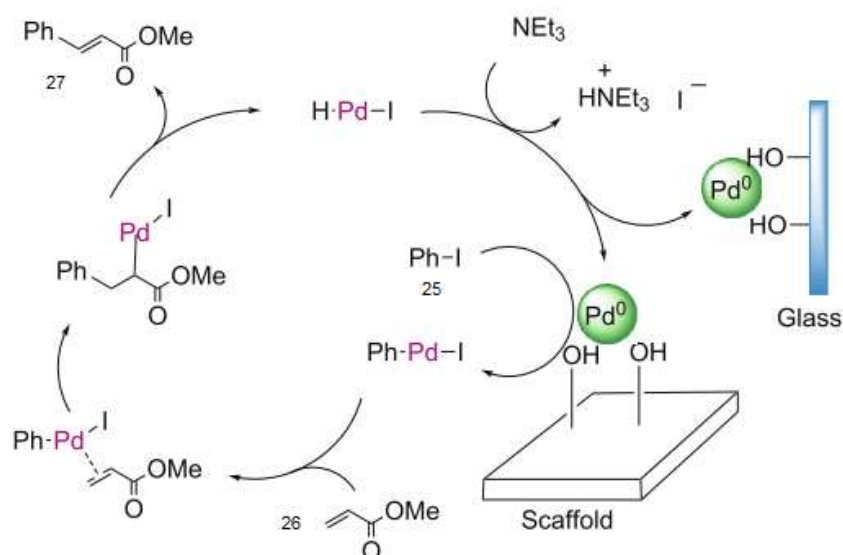


Schéma 14 : Réaction de Heck utilisant du palladium supporté sur une glace en verre [242]

Lewis et collaborateurs [243] décrivent en 2015 la réaction d'aldolisation croisée entre l'acétone et différents aldéhydes aromatiques. Ils mettent au point une méthode catalytique de couplage carbone-carbone (C-C). Pour cela, ils utilisent des zéolites béta, des acides de Lewis, contenant dans leurs structures un métal (Hf, Sn ou Zr). La particularité de cette méthode est d'utiliser ces zéolites en tant que catalyseurs pour former la liaison C-C lors de la réaction d'aldolisation croisée. Ainsi, grâce à cette méthode, ils obtiennent les benzalacétone souhaitées avec des rendements variant de 19% à 94% selon l'acide de Lewis et l'aldéhyde de départ utilisés, en 5 h et avec une température de 90 °C. Le mécanisme supposé de la réaction est décrit dans le schéma suivant. Le métal (M) polarise le groupe carbonyle de l'acétone (**28**) rendant plus acide le proton situé en α . L'oxygène contenu dans la structure de la zéolite et qui est lié directement au métal capture l'hydrogène acide situé en α de l'acétone générant un énolate de cétone (**29**) qui réagit ensuite avec le benzaldéhyde (**23a**) pour former la liaison C-C. L'hydrogène du groupe silanol (**30**) formé dans l'étape précédente est capturé par l'intermédiaire réactionnel et l'oxygène du silanolate se lie au métal permettant ainsi de régénérer le catalyseur acide et de libérer la β -hydroxycétone (**31**) qui après déshydratation forme la benzalacétone (**19a**) souhaitée (Schéma 15).

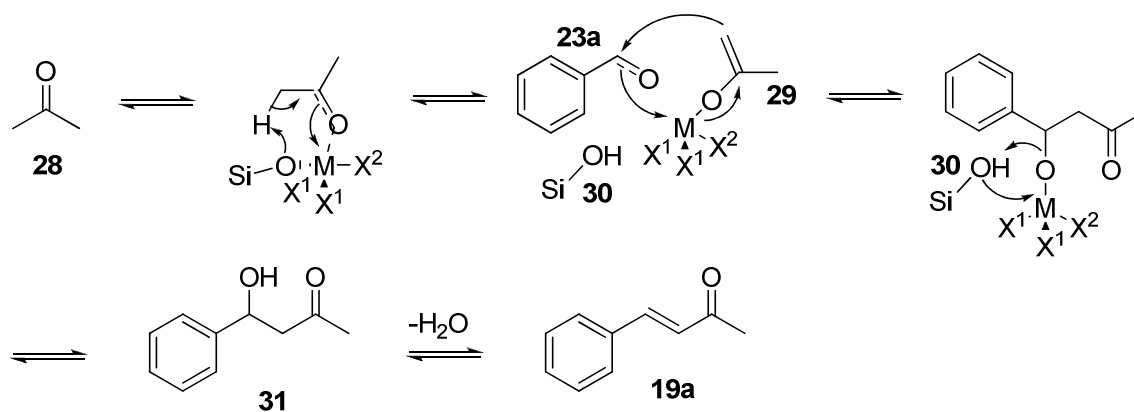


Schéma 15 : Synthèse de benzalacétone utilisant des zéolites en tant qu'acides de Lewis [243]

Zhang et collaborateurs [244] décrivent aussi en 2015 la réaction d'aldolisation entre l'acétone et le benzaldéhyde pour préparer des benzalacétone en utilisant la *L*-proline (**32**) en tant qu'organocatalyseur supporté par de l'oxyde de graphène. La réaction est réalisée à 40 °C pendant 12 h et le produit souhaité est obtenu avec 92%. Le mécanisme de la réaction est expliqué par le caractère nucléophile de l'amine secondaire de l'acide aminé mais également par sa fonction acide qui joue le rôle d'acide/base dans la réaction (Schéma 13). La fonction amine de la proline réagit dans un premier temps avec l'acétone (**28**) pour former l'aminoalcool correspondant (**33**). La déshydratation de ce composé entraîne la formation de l'iminium (**34**) qui est par la suite déprotoné pour former l'énamine (**35**). Cette énamine réagit avec le benzaldéhyde (**23a**) pour conduire à la formation de l'iminium **37**). L'état de transition **36** montre une stabilisation de l'intermédiaire réactionnel grâce à l'hydrogène de la fonction acide carboxylique. L'hydratation du composé **37** mène au produit **38** qui subit une hydrolyse de l'aminol conduisant à la cétone β hydroxylée asymétrique (**31**). Enfin, une déshydratation de ce dernier composé permet d'obtenir la benzalacétone finale (**19a**) (Schéma 16).

Malgré les avantages de la réaction d'aldolisation concernant la réutilisation du catalyseur, cette réaction requiert des temps de réaction longs (12 h). Cette réaction compte plusieurs aspects négatifs comme la préparation fastidieuse des catalyseurs (c'est le cas des acides de Lewis de type zéolites qui nécessitent 10 h [243]), l'utilisation de catalyseurs onéreux tel que l'amberlyst-15 [245].

Ainsi, dans le but d'obtenir des benzalacétones d'une manière efficace, de nouvelles méthodes ne cessent d'être développées autour de la réaction de condensation aldolique. La réaction de Claisen-Schmidt (Schéma 17) décrite pour la première fois en 1881 en est un exemple [246]. Cette réaction concerne la condensation d'un aldéhyde aromatique (**23a**) avec un aldéhyde aliphatique ou une cétone en présence d'un milieu acide ou basique pour conduire à des cétones ou aldéhydes α, β -insaturées (**42**) [246] (Schéma 17).

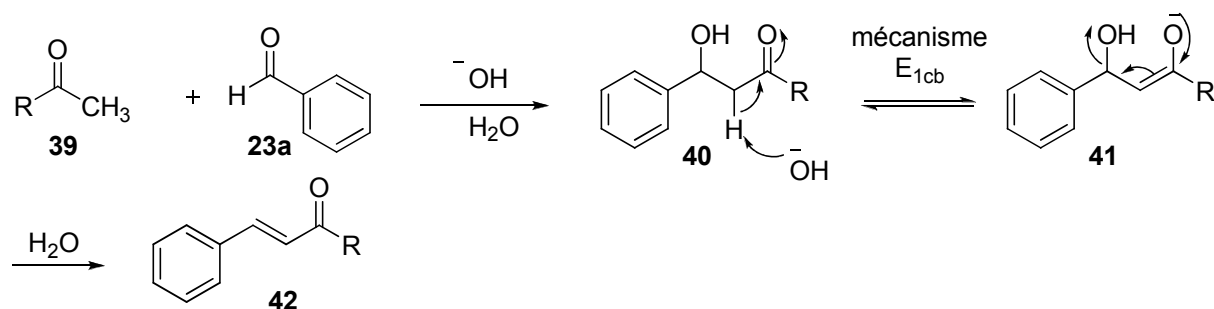


Schéma 17 : Mécanisme de la réaction de Claisen-Schmidt en milieu basique [246]

Cette réaction assure une grande sélectivité [246] (Schéma 17) et permet d'obtenir des molécules présentant une double liaison de configuration *trans*. Dans le cas de cétones dissymétriques, en milieu basique, c'est l'énolate le moins substitué qui va réagir sur l'aldéhyde aromatique, alors qu'en milieu acide c'est l'énol le plus substitué qui réagit. Cependant, cette réaction présente des inconvénients notamment la formation de sous-produits due à la *bis*-condensation [247], à la dimérisation des aldéhydes aliphatiques [247], ou à la réaction de Cannizaro des aldéhydes aromatiques [246].

Pour contourner ces problèmes, la réaction de condensation de Claisen-Schmidt a été développée sous activation par micro-ondes [248] dans le but d'augmenter le rendement de la réaction, éviter la formation de sous-produits et diminuer les temps de réaction [246] qui dans certaines conditions, dépassent les 10 h [242] [244, 249]. Certaines études sous micro-ondes décrivent l'utilisation d'acides de Lewis (tel que $AlCl_3$, $TiCl_4$...) sans solvant [250], tandis que

d'autres utilisent la combinaison soude dans l'éthanol [248]. Kad et collaborateurs [251] ont proposé l'utilisation d'une solution aqueuse de NaOH pour réaliser la condensation de Claisen-Schmidt sous micro-ondes (150W, 10-15 min). Ils obtiennent les cétones α , β -insaturées correspondantes avec des rendements variant entre 50-95% après recristallisation.

Par ailleurs, des réactions de Claisen Schmidt ont été réalisées avec la technique de « grinding » : en écrasant au mortier des pastilles de NaOH en présence d'aldéhydes et de cétones pendant 5-10 min. Les cétones α , β -insaturées correspondantes sont obtenues avec un rendement de 75-85% après recristallisation [252] ou 96-98% après purification par chromatographie sur colonne [253].

Les méthodes de synthèse décrites dans la littérature pour préparer les benzalacétones nécessitent une étape de purification qui s'avère souvent fastidieuse à cause des sous-produits formés.

IV.3.1.1.2 Expériences réalisées

Dans le but de diminuer ces inconvénients, une nouvelle méthode a été développée au laboratoire [254]. Cette méthode s'est révélée plus avantageuse par rapport au chauffage conventionnel car le temps de réaction a été réduit, aucune étape de purification n'a été nécessaire et la formation de sous-produits issus de la bis-condensation n'est pas observée (Schéma 18).

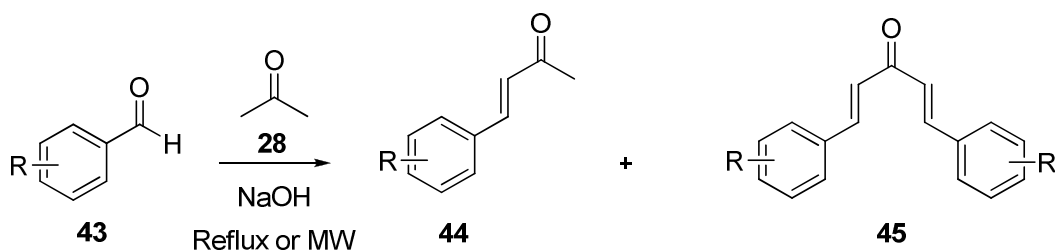


Schéma 18 : Réaction de formation de benzalacétones (44) et de dibenzalacétones (45)

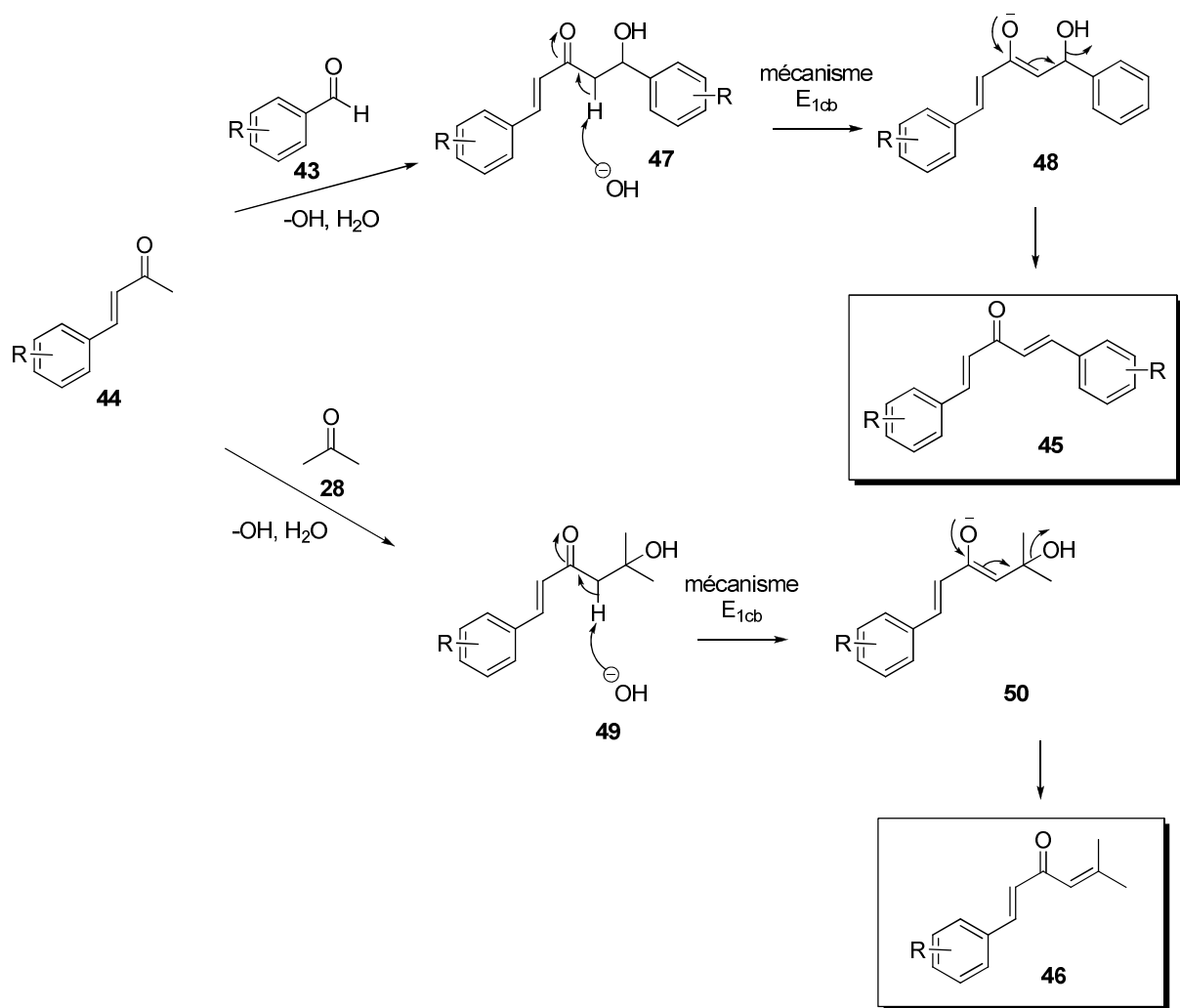
Dans un premier temps, inspirés par les travaux de Drake et collaborateurs [237], nous nous sommes intéressés à la synthèse de benzalacétones à température ambiante ou par activation thermique (40°C). Ces auteurs font réagir 1 équiv. de benzaldéhyde avec 2,75 équiv. d'acétone dans un milieu basique (NaOH 10%, 0,25 équiv.) pendant 2 h 15 min à température ambiante. Après distillation, ils obtiennent les benzalacétones souhaitées avec des rendements variant de 65-78%. Nous avons réalisé ce même protocole en divisant par 84 la quantité des

réactifs de départ (5 g au lieu de 420 g) et nous avons obtenu après plusieurs purifications sur colonne chromatographique le produit désiré avec un rendement évalué par RMN ^1H de 45%. La différence de rendement avec celui décrit dans la littérature peut s'expliquer par la perte de produit au cours des différentes purifications.

Dans un deuxième temps, inspirés par les travaux de Wurtz [255], nous avons fait réagir à température ambiante 1 équiv. de benzalacétone avec 13,6 équiv. d'acétone en milieu basique (NaOH, 60%, 1,5 équiv.). Le protocole propose de partir d'un dérivé de benzalacétone (1 équiv.) dissout dans de l'acétone. Après 3 h 30 min de réaction et après plusieurs purifications sur colonne chromatographique, la benzalacétone attendue est obtenue avec 25% de rendement. La purification a été difficile du fait de la présence de la dibenzalacétone.

En parallèle, nous avons étendu la réaction à d'autres aldéhydes aromatiques (4-Me-benzaldéhyde, 4-*t*-Bu-benzaldéhyde, 4-OMe-benzaldéhyde, 4-F-benzaldéhyde, 4-Br-benzaldéhyde). Les réactions ont duré entre 35 min et 2 h et la purification sur colonne chromatographique a toujours été nécessaire. Les benzalacétones correspondantes sont obtenues avec des rendements compris entre 61% et 96% comportant toujours la présence de la dibenzalacétone à hauteur de 4% à 39%. De plus, lorsque ces réactions sont réalisées à l'échelle de 1g, les rendements varient de 25-73%, avec la formation de sous-produits.

Malheureusement cette méthode a montré des inconvénients majeurs tels que la formation des produits secondaires issus de la condensation de la benzalacétone formée avec l'aldéhyde de départ (composé **45**) ou la réaction de la benzalacétone formée avec l'acétone (composé **46**). La formation de ces sous-produits rend la purification fastidieuse. Les mécanismes de formation de ces composés sont illustrés sur le Schéma 19.



R = halogènes, alkyles, NO_2 , CF_3 ...etc

Schéma 19 : Mécanismes de formation des sous-produits 45 et 46

Dans le but d'améliorer le temps et les rendements de réaction, d'éviter la formation de produits secondaires et les étapes de purification fastidieuses, nous nous sommes intéressés à développer cette réaction par activation sous micro-ondes, le laboratoire disposant d'une grande expérience dans l'utilisation de cette méthode d'activation.

Dans un premier temps, la réaction a été réalisée à 300 W, 10 min à 40 °C sur une échelle de 50 mg pour le réactif de départ, le benzaldéhyde. La température a été choisie selon les tests réalisés par chauffage classique et la puissance selon la littérature [251]. Pour optimiser les conditions sous micro-ondes, un suivi par CCM et GC a été réalisé chaque 10 min pendant 1h. Une analyse du spectre RMN ^1H du produit brut obtenu après un simple work-up, (détaillé dans le publication ci-après) nous a permis de confirmer la présence et la pureté du produit final.

Dans un deuxième temps, nous avons testé des conditions opératoires à différentes valeurs de puissance (5W, 10W, 50W). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 5W pendant 15 min à 40°C. L'utilisation d'une puissance relativement faible donne de l'originalité à cette méthode car les études similaires d'aldolisation décrites dans la littérature, utilisent bien souvent des puissances très élevées de l'ordre de 150-300W [251].

Afin d'éviter la présence récurrente de sous-produits, un suivi plus fin du temps de réaction a été effectué. Le meilleur compromis entre la transformation du produit de départ et la minimisation des sous-produits a été obtenu avec 5W et 10 min à 40°C.

Nous nous sommes intéressés à l'influence de la température sur le temps de réaction et sur la pureté du produit final. Pour cela, nous avons réalisé un nouvel essai à 50°C, pendant 5 min à 5W. Les résultats montrent la formation de la benzalacétone désirée avec quelques traces de benzaldéhyde de départ. Un dernier essai a été réalisé à 50°C pendant 10 min. La GC, la CCM et la RMN ¹H confirment la formation du produit désiré avec un rendement quantitatif.

Ainsi, les conditions optimisées sous activation par micro-ondes utilisant le benzaldéhyde comme référence, sont : 5 W, 50 °C, 10 min. (Tableau 9 et Tableau 10). Les résultats détaillés sont illustrés dans le texte de la publication (voir p 189) [254]).

La réaction a été étendue à divers aldéhydes en tenant compte de ces conditions optimisées et la pureté et le rendement des produits ont été déterminés par RMN ¹H.

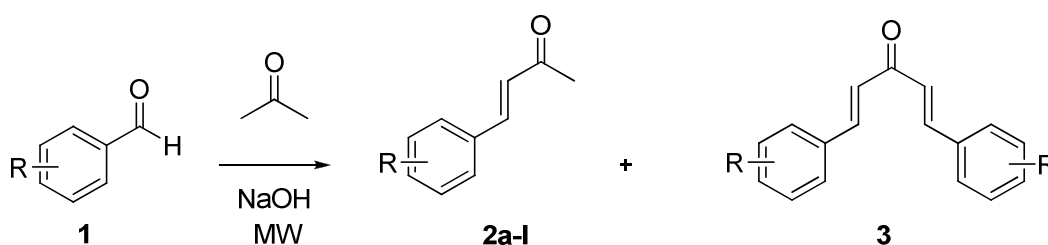
La numérotation des dérivés de benzalacétones qui suivent reprend la numérotation de la publication SpringerPlus, 2015, 4 : 221, 1-5

Ainsi, les dérivés alkylés tels que la 4-Me, la 4-*tert*-butyl benzalacétones (**2b** et **2c**) sont obtenus avec des rendements quantitatifs. Néanmoins, pour le composé 4-*tert*-butylé, 15 min de réaction sont nécessaires pour obtenir ce rendement quantitatif. Par ailleurs, les dérivés halogénés sont également obtenus quantitativement (ex : 3-Cl-benzalacétone, **2g**). Cependant pour les dérivés fluorés et bromés (**2d** et **2e**) il a été nécessaire de réduire la température à 40 °C pour obtenir les produits bruts correspondants sans produits secondaires. Les dérivés fonctionnalisés avec 4-OMe (**2f**) et 3,4-di-OMe (**2j**) sont aussi formés quantitativement en utilisant les conditions optimisées. Néanmoins, pour le dérivé 3,4-di-OMe benzalacétone sa formation nécessite 25 min. Le dérivé aromatique naphthalénique (**2l**) est également obtenu de manière quantitative en 20 min. Les benzalacétones nitrées (**2h**) et trifluorométhylées (**2i**) sont

obtenues avec 70% et 80% de rendement respectivement. La réaction avec le benzaldéhyde nitré nécessite une puissance de 10W, aucune réaction n'étant observée avec une puissance de 5W. La diminution du rendement s'explique par la formation de la dibenzalacétone correspondante. En effet, le caractère électroattracteur de ces substituants positionnés en para rend le carbonyle de l'aldéhyde plus électrophile et favorise la formation de la dibenzalacétone. Ce sous-produit secondaire non souhaité est présent à hauteur de 30% et de 20% pour le dérivé nitré et trifluorométhylé respectivement. Enfin, pour le dérivé 2-NO₂, 5-Cl (**2k**), le produit est obtenu au bout de 25 min de réaction avec un rendement de 88% dont 12% de produit de départ qui n'a pas réagi. Aucune formation de produit secondaire n'a été observée.

La réaction a été réalisée à une échelle de 500 mg pour le benzaldéhyde et ses analogues méthylé, bromé et méthoxy. Dans tous les cas, les benzalacétone correspondantes sont obtenues de manière quantitative.

La méthode sous activation micro-ondes mise en place permet d'obtenir les benzalacétone fonctionnalisées avec des temps de réaction courts variant entre 10-15 min. Aucune étape de purification n'est requise car seul un work-up classique est nécessaire. Les benzalacétone sont obtenues quantitativement sans produit secondaire sauf pour les aldéhydes fonctionnalisés avec des groupements électroattracteurs (CF₃ et NO₂). Enfin le procédé a pu être étendu à des échelles 10 fois plus importantes avec des résultats prometteurs. (Tableau 9 et Tableau 10,).



Entrée	(aldéhyde 1) R	Chauffage classique		Ratio (%) ^b		Produit ^c (Rdt %)	Entrée	Conditions MW		Produit ^c (Rdt %)	
		(Temp/°C, Temps/h)		2	3			(Puissance,Temp/°C, Temps/min)	Ratio (%) ^b		2
1	(1a) 4-H	20 °C, 1 h		92	8	2a (85)	9	5 W, 50 °C, 10 min	100	0	2a (100)
2		40 °C, 0.35 h		90	10	2a (82)	10	5 W, 50 °C, 15 min ^d	100	0	2a (100)
3	(1b) 4-Me	20 °C, 2 h		93	7	2b (73)	11	5 W, 50 °C, 10 min	100	0	2b (96)
4		40 °C, 1.5 h		95	5	2b (77)	12	5 W, 50 °C, 15 min ^d	100	0	2b (98)
5	(1c) 4- <i>t</i> -Bu	40 °C, 1.1 h		85	5	2c (70)	13	5 W, 50 °C, 15 min	100	0	2c (100)
6	(1d) 4-F	40 °C, 1.5 h		82	18	2d (42)	14	5 W, 40 °C, 10 min	100	0	2d (80)
7	(1e) 4-Br	40 °C, 2 h		61	39	2e (12)	15	5 W, 40 °C, 10 min	100	0	2e (79)
							16	5 W, 40 °C, 15 min ^d	100	0	2e (85)
8	(1f) 4-OMe	40 °C, 1.5 h		96	4	2f (43)	17	5 W, 50 °C, 15 min	100	0	2f (100)
							18	5 W, 50 °C, 35 min ^d	100	0	2f (100)

^a Réactions réalisées avec une échelle 50 mg, ^b Ratio déterminé par ¹H RMN, ^c Rendement isolé après le work-up. La pureté a été contrôlée par ¹H RMN, ^d Réactions réalisées avec une échelle 500 mg

Tableau 9 : Résultats de la réaction de Claisen-Schmidt dans la synthèse de benzalacétones fonctionnalisées sous chauffage conventionnel et sous activation micro-ondes [254]

Entrée	(aldéhyde 1) R	Conditions MW		Ratio (%) ^b		Produit ^c (Yield %)
		(Puissance/W,Temp/°C, Temps/min)		2	3	
1	(1g) 3-Cl	5 W, 50 °C, 10 min		100	0	2g (85)
2	(1h) 4-NO ₂	10 W, 50 °C, 10 min		70	30	2h (46)
3	(1i) 4-CF ₃	5 W, 50 °C, 10 min		80	20	2i (77)
4	(1j) 3,4-di-OMe	50 W, 50 °C, 25 min		100	0	2j (98)
5	(1k) 2-NO ₂ , 5-Cl	5W, 50 °C, 25 min		88 ^d	0	2k (90)
6	(1l) phenyl	5W, 50 °C, 20 min		100	0	2l (100)

^a Réactions réalisées avec une échelle 50 mg, ^b Ratio déterminé par ¹H RMN, ^c Rendement isolé après le work-up. La pureté a été contrôlée par ¹H RMN, ^d 12% d'aldéhyde de départ n'a pas réagi

Tableau 10 : Extension de la réaction de Claisen-Schmidt sous micro-ondes à d'autres benzaldéhydes [254]

RESEARCH

Open Access

An efficient and selective microwave-assisted Claisen-Schmidt reaction for the synthesis of functionalized benzalacetones

Anita Rayar, Maité Sylla-Iyarreta Veitia* and Clotilde Ferroud

Abstract

A simple and direct method for the Claisen-Schmidt reaction to prepare functionalized α,β -unsaturated ketones has been developed. Microwave irradiation of aldehydes with acetone produces benzalacetones selectively without self-condensation product in very short reaction times and good yields.

Keywords: Green chemistry; Benzalacetones; Claisen-Schmidt reaction; Microwaves-assisted synthesis; Carbonyl compounds

Introduction

As part of our studies on the synthesis of anti-inflammatory compounds structurally related with coumarin skeleton, we have recently focused our attention on the synthesis of α,β -unsaturated ketones known as benzalacetones, which possess interesting properties for organic synthesis. Due to their conjugated system, benzalacetone and derivatives have been described as radical scavengers with potential antioxidant properties (Handayani & Arty 2008). Various methods of synthesis of this type of compounds have been described in the literature. The Claisen-Schmidt is one of the simplest condensation methods. The resulting β -hydroxycarbonyl compounds undergo a dehydration reaction, to afford the corresponding arylidene compounds. This reaction is typically catalyzed by acids (AlCl_3 or HCl) and more often by base with or without solvent at room temperature or under conventional heating. However, in all these conditions, side reactions start decreasing the yield of the desired product and entail further purification steps (Drake & Allen 1923; Rahman et al. 2012; Jayapal et al. 2010).

In order to increase the yield and to avoid the formation of by-products, several protocols relative to a Claisen-Schmidt condensation have been reported using different catalysts: solid NaOH (Rahman et al. 2012),

$\text{Ba}(\text{OH})_2$ (Aguilera et al. 1987), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (Narender & Papi Reddy 2007), NH_4Cl (Pal 2013), BiCl_3 (Kumar & Sandhu 2010), InCl_3 (Deng & Ren 2003), $\text{TiCl}_3(\text{SO}_3\text{CF}_3)$ (Iranpoor et al. 1999), $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (Wang et al. 2004), FeCl_3 (Zhang et al. 2003), molecular iodine (Sashidhara et al. 2009) or $\text{Co}(\text{II})$ -bipyridyl (Irie & Watanabe 1981). Sonochemical or microwaves irradiation methods have been reported using basic or acidic alumina (Esmaeili et al. 2005), Na_2CO_3 -TBAB (PTC conditions) (Bogdal & Loupy 2008) and *bis*(*p*-methoxyphenyl)telluroxide (Zheng et al. 1997) as catalysts. These methods give good yields but suffer from long reaction times (e.g. 10 h with $\text{Cp}_2\text{ZrH}_2/\text{NiCl}_2$) (Nakano et al. 1987), the use of expensive Lewis acids (e.g. amberlyst-15 and $\text{B}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$) (Pal et al. 2012), the use of hazardous catalyst or toxic solvents, variable reactions times and the formation of other by-products (Gladkowski et al. 2013). Consequently, the development of an efficient and versatile method for the preparation of α,β -unsaturated ketones is of interest and there is a scope for further improvements towards mild reaction conditions and improved yields.

In pursuit of our investigations towards developing efficient methods for the synthesis of coumarin scaffolds, we were particularly interested in an efficient preparation of benzalacetones from acetone and aromatic substituted aldehydes. In this article, we report the microwave-assisted synthesis of functionalized benzalacetones in basic conditions. The advantages associated with the present protocol include the prevention of

* Correspondence: maitesylla@cnam.fr

Laboratoire Chimie Moléculaire, génie des procédés chimiques et énergétiques (CMGPCE), EA 7341 - Conservatoire National des Arts et Métiers, 2 rue Conté, 75003 Paris, France

self-condensation product thus limiting the need for further purifications and ensuring short reaction times.

Results and discussion

We decided to investigate a microwave-assisted synthesis of benzalacetones to increase reaction yields, to enhance the rate of reaction, thereby reducing time and decreasing by-products formation. Microwave activation for the synthesis of benzalacetones has not been widely described in the literature. Kappe et al. reported the aldol condensation of *p*-methoxybenzaldehyde with acetone using microwave activation but could not prevent self-condensation (Viviano et al. 2011).

Since a wide variety of aryl aldehydes are commercially available, Microwave activation would offer a higher degree of flexibility with regard to functional groups that can be introduced in the benzalacetone skeleton. For comparison, we'll also present the results obtained using conventional heating conditions. The results are shown in Additional file 1: Table S1.

The conditions (temperature, NaOH and acetone equivalents) were optimized for the reaction of benzaldehyde as a model substrate with acetone used also as solvent. The conversion to the corresponding benzalacetone **2a** was optimal when by using 1.5 equiv of NaOH in acetone (13.6 equiv) at 40°C for 35 min. We consistently observed the presence of a byproduct, the dibenzalacetone **3** (ratio **2** vs **3**, 90:10, entry 2, Additional file 1: Table S1). We noticed that an excess of acetone (more than 10 equiv) was important to avoid the formation of a self-condensation product. The reactions carried out at room temperature were slightly slower than those performed at 40°C (generally 1 or 2 hours), and the results show no significant variation in the relative yields of **2a** versus **3a** (entries 1 and 2; Additional file 1: Table S1).

The Claisen-Schmidt conditions were successfully extended to the synthesis of several benzalacetones from various aldehydes. Reactions were monitored by GC-MS and conversions were determined by ¹H NMR. The coupling constant between the olefinic protons in the ¹H NMR spectrum (*J* = 16.2 Hz) confirmed the *E* configuration of the double bond C3-C4. The results obtained in conventional conditions are described in Additional file 1: Table S1. Despite the satisfactory yields obtained with conventional heating, the formation of dibenzalacetone **3** as byproduct was observed for all substrates (4-39%). It must be noted that benzalacetones **2** are unstable at room temperature and need to be store in cold conditions to further use. It should also be noted that longer reaction times result in the formation of other non-identified products.

Considering the results obtained under conventional heating and following our interest in establishing an efficient, rapid and selective access to benzalacetones,

the Claisen-Schmidt condensations were undertaken under controlled microwave activation. In order to screen the microwave-assisted solvent-free conditions of benzalacetone synthesis, reactions were performed on the same aldehydes with 1.5 equiv of NaOH, in a Discover™ microwave synthesizer. The compounds were mixed in a sealed microwave reaction tube and irradiated for 10 to 30 minutes (5 W) with stirring at 50°C. When reactions were performed on a large scale, a flask equipped with a condenser was used. After irradiation, reactions were controlled by GC-MS analysis, and the purity of the desired products was evaluated by NMR spectroscopy.

Most of the microwave-assisted condensation reactions were performed at temperature of 40-50°C. In a preliminary study, we examined the temperature effect and we observed that condensation of the corresponding aldehydes with acetone occurred as soon as the temperature reached 50°C (in less than 5 minutes). In the case of 4-halogenated aldehydes (compounds **1d** and **1e**) reactions were carried out at 40°C to avoid the degradation of the reaction mixture. Decreasing the temperature caused no significant change in relative product yields and dibenzalacetone formation was never observed (entries 14 and 15, Additional file 1: Table S1).

The use of microwave activation resulted in a dramatic decrease of reaction times. The reactions were generally achieved within 10-15 min. The desired compounds were isolated with excellent yields (typically higher than 79% and often quantitative) and clean enough to be further used (based on ¹H NMR analysis).

Additional file 1: Table S1 also shows the extension of these conditions to the synthesis of various benzalacetones. These microwave-assisted condensation reactions could be "directly scalable". Identical yields were obtained on a 50 mg and 500 mg scale (compounds **2a**, **2b**, **2e** and **2f**, entries 10, 12, 16 and 18 respectively).

Taking into account these results we extended our study to other aldehydes (Additional file 2: Table S2). Good results were obtained with 3-chlorobenzaldehyde **1g**. The reaction proceeded cleanly and the expected product **2g** was selectively formed with a yield of 85%. However less satisfactory results were obtained with electron-withdrawing substituted aldehydes (compounds **1h** and **1i**) for which dibenzalacetone formation was observed (Additional file 2: Table S2, entries 2 and 3). The lower yields obtained with electron-withdrawing substituted aldehydes, and particularly with 4-nitrobenzaldehyde (46%), can be attributed to product loss during work-up due to the emulsion formation. Additionally a further purification by chromatography was necessary to afford the desired compound **2h** with a high purity confirmed by RMN analysis. The lower selectivities could be explained by the influence of nitro or trifluoromethyl

groups on reactivity of aldehydes **1 h** and **1 i**. These electron-withdrawing groups increase the reactivity of the carbonyl function. The formed benzalacetone reacts faster with such activated aldehyde than with acetone leading to the formation of self-condensation product (compounds **3 h** and **3 i**).

In the case of 3,4-dimethoxybenzaldehyde **1 j**, the reaction proceeded in about 25 min and an irradiation of 50 W was required (entry 4, Additional file 2: Table S2). In the case of 5-chloro-2-nitro-aldehyde **1 k**, the reaction was easily performed at 5 W in 25 min with 90% yield. A quantitative reaction occurred when naphthaldehyde **1 l** was used (entry 6, Additional file 2: Table S2) without any formation of self-condensation byproduct.

In conclusion, an efficient and selective general method has been developed for the synthesis of benzalacetones via a Claisen-Schmidt reaction using microwaves activation. In comparison with conventional heating methods, the desired compounds were obtained in shorter times and with excellent yields (in almost all cases, quantitative yields) and no further purification was required. Using microwaves activation, the formation of dibenzalacetone was never observed but in the case of electron-withdrawing substituted aldehydes. Further investigations concerning the use of functionalized benzalacetones as key intermediates in the synthesis of coumarin scaffolds assisted by microwave activation are currently underway.

Experimental

Chemicals were used as received without special purification. All reactions were controlled by GC-MS analysis. Flash column chromatography was carried out when necessary using silica gel 60 (particle size 0.040-0.063 mm, Merck). ^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired at room temperature on 400 MHz NMR spectrometer (100 MHz for ^{13}C NMR). Chemical shifts are reported in δ units, parts per million (ppm). Coupling constants (J) are measured in hertz (Hz). Infrared spectra were recorded over the 400–4000 cm^{-1} range with an FTIR/ATR/ZnSe spectrometer. Microwaves experiments were performed using a single mode microwave reactor equipped with a 300 W power source and on-board infrared temperature sensor Additional file 3.

General procedure for the microwave-assisted syntheses

In a capped 10 mL MW-vessel, the aldehyde (50 mg, 1 equiv) and acetone (13.6 equiv) were mixed and then an aqueous solution of NaOH (0.6 g/cm^3 of water) was added. The tube was positioned in the irradiation cavity and the mixture was stirred and heated at the temperature 40/50°C (measured with an IR temperature sensor), in the monomode microwave oven (5 W) for 10/15 min. After completion, upon cooling to ambient temperature, the conversion was directly controlled by

GC-MS analysis. A simple consecutive work up (concentration of the reaction mixture and addition of 25 cm^3 of water) affords the crude as an oil. The product was extracted with AcOEt ($3 \times 25 \text{ cm}^3$). The organic layers were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding benzalacetone. The purity of the final products was controlled by NMR. For the assignments of the NMR signals, we use the convention presented in Figure 1.

General procedure for conventional heating syntheses

To a mixture of appropriate aldehyde (50 mg, 1 equiv) and acetone (13.6 equiv) was added an aqueous solution of NaOH (0.6 g/cm^3 of water). The mixture was stirred at 40°C and controlled by TLC and GC-MS. The same work up described above was used to afford the expected benzalacetones. When necessary the crude was purified by flash chromatography on silica gel. The purity of the final products was controlled by NMR. Additional file 4 and Additional file 5.

(E)-4-phenylbut-3-en-2-one (**2a**, $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$) CAS : 1896-62-4 To a solution of benzaldehyde (1 equiv, 0.47 mmol), in acetone (13.6 equiv, 6.4 mmol) was added an aqueous solution of NaOH (28.2 $\text{mg}/47 \text{ mm}^3$ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the *(E)*-4-phenylbut-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Quantitative yield : 69 mg. $R_f = 0.40$ SiO_2 (CH_2Cl_2). Spectroscopic data in accordance with literature reports (McConville et al. 2009).

(E)-4-*p*-tolylbut-3-en-2-one (**2b**, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}$) CAS : 4023-84-1. To a solution of 4-methylbenzaldehyde (1 equiv,

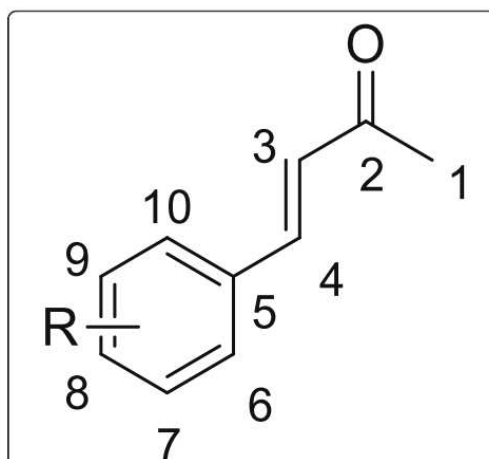


Figure 1 Convention adopted to assign signals of ^1H and ^{13}C -NMR spectra.

0.42 mmol), in acetone (13.6 equiv, 5.8 mmol) was added an aqueous solution of NaOH (25.2 mg/42 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-*p*-tolylbut-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Yield : 64 mg (96%), R_f = 0.31 SiO₂ (CH₂Cl₂). *Spectroscopic data in accordance with literature reports* (McConville et al. 2009).

(*E*)-4-(4-*tert*-butylphenyl)but-3-en-2-one (**2c**, C₁₄H₁₈O) CAS: 55047-62-6 To a solution of 4-*tert*-butylbenzaldehyde (1 equiv, 0.31 mmol), in acetone (13.6 equiv, 4.2 mmol) was added an aqueous solution of NaOH (18.6 mg/31 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-(4-*tert*-butylphenyl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Quantitative yield: 63 mg, R_f = 0.33 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 9/1). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) = 1.33 (s, 9H, H₁₀), 2.37 (s, 3H, H₁), 6.70 (d, 1H, J₃₋₄ = 16.3 Hz, H₃), 7.42 (d, 2H, J_{ortho} = 8.6 Hz, H₆, H₆), 7.48 (d, 2H, J_{ortho} = 8.3 Hz, H₇, H₇), 7.50 (d, 1H, J₄₋₃ = 16.7 Hz, H₄). ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) = 27.4 (C₁), 31.6 (C₁₀), 34.9 (C₉), 125.9 (C₆, C₆), 126.4 (C₃), 128.1 (C₇, C₇), 131.6 (C₅), 143.5 (C₄), 154.2 (C₈), 198.6 (C = O). GC/MS : method 80; t_R = 10.28 min, m/z: [M]⁺ (202), 187 [M-CH₃]⁺, 159 [M-COCH₃]⁺. IR (ATR): = 3031 (ν_{Csp2-H}), 2961 (ν_{Csp3-H}), 1666 (ν_{C=O}), 1604 (ν_{C=C}), 815 (δ_{Csp2-H, p-disubstitution}).

(*E*)-4-(4-fluorophenyl)but-3-en-2-one (**2d**, C₁₀H₉FO) CAS : 65300-29-0 To a solution of 4-fluorobenzaldehyde (1 equiv, 0.40 mmol), in acetone (13.6 equiv, 5.4 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 24 mg/40 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-(4-fluorophenyl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Yield : 52.5 mg (80%) R_f = 0.13 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 9/1). *Spectroscopic data in accordance with literature reports* (McConville et al. 2009).

(*E*)-4-(4-bromophenyl)but-3-en-2-one (**2e**, C₁₀H₉BrO) CAS : 3815-31-4 To a solution of 4-bromobenzaldehyde (1 equiv, 0.27 mmol), in acetone (13.6 equiv, 3.7 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 16.2 mg/27 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-(4-bromophenyl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Yield: 48.3 mg (79%) R_f = 0.22 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 9/1). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) = 2.38 (s, 3H, H₁), 6.69 (d, 1H, J₃₋₄ = 16.2 Hz, H₃), 7.40 (d, 2H, J_{ortho} = 8.7 Hz, H₆, H₆), 7.43 (d, 1H, J₄₋₃ = 16.5 Hz, H₄), 7.54 (d, 2H, J_{ortho} = 8.7 Hz, H₇, H₇). ¹H NMR data are in agreement with those previously reported (Du et al. 2013).

(*E*)-4-(4-methoxyphenyl)but-3-en-2-one (**2f**, C₁₁H₁₂O₂) CAS : 3815-30-3 To a solution of 4-methoxybenzaldehyde (1 equiv, 0.37 mmol), in acetone (13.6 equiv, 5.0 mmol) was added an aqueous solution of NaOH (22.2 mg/37 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-(4-methoxyphenyl)but-3-

en-2-one was isolated as a yellow oil. Quantitative Yield : 65 mg. R_f = 0.53 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 9/1) *Spectroscopic data in accordance with literature reports* (McConville et al. 2009).

(*E*)-4-(3-chlorophenyl)but-3-en-2-one (**2 g**, C₁₀H₉ClO) CAS 30626-02-9 To a solution of 3-chlorobenzaldehyde (1 equiv, 0.36 mmol), in acetone (13.6 equiv, 4.8 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 21.3 mg/36 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-(3-chlorophenyl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Yield : 56.1 mg (85%), R_f = 0.49 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 8/2). *NMR data are in agreement with those previously reported* (He et al. 2013).

(*E*)-4-(4-nitrophenyl)but-3-en-2-one (**2 h**, C₁₀H₉NO₃) CAS : 30625-98-0 To a solution of 4-nitrobenzaldehyde (1 equiv, 0.33 mmol), in acetone (13.6 equiv, 4.5 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 19.8 mg/33 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the residue was purified by chromatography column (cyclohexane/EtOAc : 7/3) and the (*E*)-4-(4-nitrophenyl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Yield : 29 mg (46%), R_f = 0.33 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 9/1). ¹H NMR data are in agreement with those previously reported (Du et al. 2013).

(*E*)-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)but-3-en-2-one (**2i**, C₁₁H₉F₃O) CAS : 115665-92-4 To a solution of 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde (1 equiv, 0.29 mmol), in acetone (13.6 equiv, 3.9 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 17.4 mg/29 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Yield : 47.8 mg (77%) R_f = 0.49 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 9/1). ¹H NMR data are in agreement with those previously reported (Du et al. 2013).

(*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-2-one (**2j**, C₁₂H₁₄O₃) CAS 60234-90-4 To a solution of 3,4-dimethoxybenzaldehyde (1 equiv, 0.30 mmol), in acetone (13.6 equiv, 4.1 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 18 mg/30 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Yield : 61 mg (98%) R_f = 0.19 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 8/2). *NMR data are in agreement with those previously reported* (He et al. 2013).

(*E*)-4-(5-chloro-2-nitrophenyl)but-3-en-2-one (**2 k**, C₁₀H₈ClNO₃) CAS 959058-78-7 To a solution of 5-chloro-2-nitrobenzaldehyde (1 equiv, 0.27 mmol), in acetone (13.6 equiv, 3.7 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 16.2 mg/27 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, (*E*)-4-(5-chloro-2-nitrophenyl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Yield : 54.8 mg (90%) R_f = 0.19 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 8/2). *NMR data are in agreement with those previously reported* (Okuro et al. 2011).

(*E*)-4-(naphthalen-1-yl)but-3-en-2-one (**2 I**, C₁₄H₁₂O) To a solution of 1-naphthaldehyde (1 equiv, 0.32 mmol), in acetone (13.6 equiv, 4.4 mmol) was added an aqueous solution of NaOH 19.2 mg/32 mm³ of water). The mixture was stirred under microwave irradiation. After work-up, the (*E*)-4-(naphthalen-1-yl)but-3-en-2-one was isolated as a yellow oil. Quantitative yield : 63 mg. R_f = 0.55 SiO₂ (cyclohexane/EtOAc : 8/2). ¹H NMR data are in agreement with those previously reported (Du et al. 2013).

Additional files

Additional file 1: Table S1. Preparation of benzalacetones using conventional heating and microwaves conditions^a.

Additional file 2: Table S2. Preparation of benzalacetones using microwaves conditions^a.

Additional file 3: Full materials and methods.

Additional file 4: Full spectral data of synthesized compounds.

Additional file 5: Proton NMR spectra of compounds 2a-2l.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

All authors contributed extensively to the work presented in this paper. AR carried out the synthesis of benzalacetones and participates in the drafting of the experimental section. MS-IV supervised the experimental work, interpreted the data and wrote the paper. CF are responsible of the data analysis and the revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

MENRT is gratefully acknowledged for the graduate fellowship awarded to Anita Rayar. Authors thank Mr. Josselin Noirel for the grammatical English corrections.

Received: 23 February 2015 Accepted: 17 April 2015

Published online: 14 May 2015

References

- Aguilera A, Alcantara AR, Marinas JM, Sinisterra JV (1987) Ba(OH)₂ as the catalyst in organic reactions. Part XIV. Mechanism of Claisen-Schmidt condensation in solid-liquid conditions. *J Chem* 65:1165–1171
- Bogdal D, Loupy A (2008) Application of Microwave Irradiation to Phase-Transfer Catalyzed Reaction. *Org Process Res Dev* 12:710–722
- Deng G, Ren T (2003) Indium Trichloride Catalyzes Aldol-Condensations of Aldehydes and Ketones. *Synth Commun* 33:2995–3001
- Drake NL, Allen P (1923) Benzalacetone. *J Org Synth* 3:17, doi: 10.15227/orgsyn.003.0017
- Du Z-X, Zhang X-YF, WF-CW, Da CS (2013) Highly enantioselective biomimetic intramolecular dehydration: kinetic resolution of β-hydroxy ketones catalyzed by β-turn tetrapeptides. *Tetrahedron Lett* 54:2828–2832
- Esmaili AA, Tabas MS, Nasseri MA, Kazemi F (2005) Solvent-Free Crossed Aldol Condensation of Cyclic Ketones with Aromatic Aldehydes Assisted by Microwave Irradiation. *Monatsh Chem* 136:571–576
- Gładkowski W, Skrobiszewski A, Mazur M, Slepka M, Pawlak A, Obminska-Mrukowicz B, Bialonska A, Poradowski D, Drynda A, Urbaniak M (2013) Synthesis and anticancer activity of novel halolactones with β-aryl substituents from simple aromatic aldehydes. *Tetrahedron* 69:10414–10423
- Handayani S, Arty IS (2008) Synthesis of Hydroxyl Radical Scavengers from Benzalacetone and its Derivatives. *J Phys Sci* 19:61–68
- He Y, Shen N, Fan X, Zhang X (2013) Synthesis of β-fluoroenones and their reductive rearrangement in aqueous media. *Tetrahedron* 69:8818–8823
- Iranpoor N, Zeynizadeh B, Aghapour A (1999) Aldol Condensation of Cycloalkanones with Aromatic Aldehydes Catalysed with TiCl₃(SO₂CF₃). *J Chem Res(S)*:554–555

- Irie K, Watanabe K-I (1981) Catalysis of metal (II) acetate-2,2'-bipyridine complexes in the aldol condensations. *Bull Chem Soc Jpn* 54:1195–1198
- Jayapal MR, Prasad KS, Sreedhar NY (2010) Synthesis and Characterization of 2,6-Dihydroxy Substituted Chalcones Using PEG-400 as a Recyclable Solvent. *J Pharm Sci Res* 2:450–458
- Kumar DS, Sandhu JS (2010) An efficient green protocol for the synthesis of chalcones by a Claisen-Schmidt reaction using bismuth(III)chloride as a catalyst under solvent-free condition. *Green Chem Lett Rev* 3:283–286
- McConville M, Saidi O, Blacker J, Xiao J (2009) Regioselective Heck Vinylation of Electron-Rich Olefins with Vinyl Halides: Is the Neutral Pathway in Operation? *J Org Chem* 74:2692–2698
- Nakano T, Irifune S, Umano S, Inada A, Ishii Y, Ogawa M (1987) Cross-Condensation Reactions of Cycloalkanones with Aldehydes and Primary Alcohols under the Influence of Zirconocene Complexes. *J Org Chem* 52:2239–2244
- Narendar T, Papi Reddy K (2007) A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate. *Tetrahedron Lett* 48:3177–3180
- Okuro K, Gurnham J, Alper H (2011) Ionic diamine rhodium complex catalyzed reductive N-heterocyclization of 2-nitrovinylarenes. *J Org Chem* 76:4715–4720
- Pal R (2013) Ammonium chloride catalyzed microwave-assisted Claisen-Schmidt reaction between ketones and aldehydes under solvent-free conditions. *IOSR J App Chem (IOSR-JAC)* 3:74–80
- Pal R, Sarkar T, Khasnabis S (2012) Amberlyst-15 in organic synthesis. *Arkivoc* 1:570–609
- Rahman AFMM, Ali R, Jahng Y, Kadi AA (2012) A Facile Solvent Free Claisen-Schmidt Reaction: Synthesis of α, α'-bis-(Substituted-benzylidene) cycloalkanones and α, α'-bis-(Substituted-alkylidene)cyclo alkanones. *Molecules* 17:571–583
- Sashidhara KV, Rosaiah JN, Kumar A (2009) Iodine catalyzed mild and efficient method for the synthesis of chalcones. *Synth Commun* 39:2288–2296
- Viviano M, Glasnov TN, Reichart B, Tekautz G, Kappe CO (2011) A Scalable Two-Step Continuous Flow Synthesis of Nabumetone and Related 4-Aryl-2-butanones. *Org Process Res Dev* 15:858–870
- Wang L, Sheng J, Tian H, Han J, Fan Z, Qian C (2004) A convenient synthesis of α, α'-bis (substituted benzylidene) cycloalkanones catalyzed by Yb (OTf)₃ under solvent-free conditions. *Synthesis* 2004:3060–3064
- Zhang X, Fan X, Niu H, Wang J (2003) An ionic liquid as a recyclable medium for the green preparation of α, α'-bis (substituted benzylidene)cycloalkanones catalyzed by FeCl₃·6H₂O. *Green Chem* 5:267–269
- Zheng M, Wang L, Shao J, Zhong Q (1997) A Facile Synthesis of α, α'-bis(Substituted Benzylidene)cycloalkanones Catalyzed by bis(p-ethoxyphenyl)telluroxide(bmpto) Under Microwave Irradiation. *Synth Commun* 27:351–354

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

IV.3.1.2 Synthèse de la warfarine et de ses dérivés

IV.3.1.2.1 Littérature

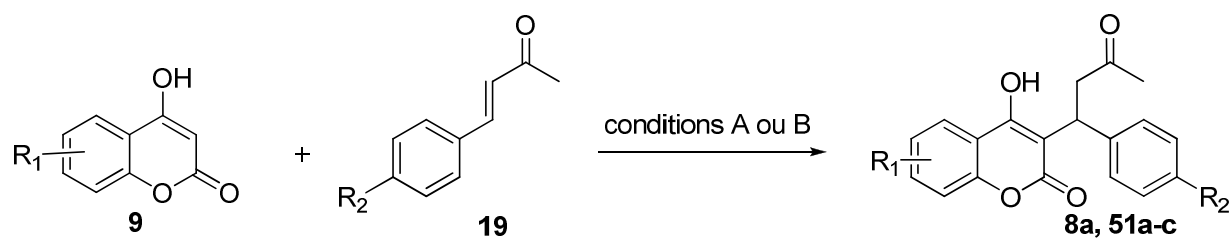
Utilisée depuis les années 1950 pour ses propriétés anticoagulantes [256], la warfarine (Coumadine®) reste la molécule la plus prescrite à travers le monde [257, 258]. La warfarine est caractérisée par une fonction delta hydroxyle cétone et présente deux énantiomères majoritaires [257, 259]. La (*S*)-warfarine possède une activité anticoagulante 5 fois plus importante que son énantiomère *R* [259]. Le mécanisme de l'activité anticoagulante s'explique par l'inhibition de la vitamine K époxyde réductase, une enzyme importante dans le processus d'activation des facteurs de coagulation [257, 259].

Addition 1,4 de Michael

La synthèse de la warfarine passant par la réaction d'addition 1,4 de Michael est la méthode la plus décrite dans la littérature. Plusieurs méthodes ont été développées utilisant des conditions acides, basiques ou des réactifs chiraux. Ces méthodes préconisent la préparation de warfarines en utilisant l'eau comme solvant. La première synthèse a été décrite par Ikawa en 1944 [235] : celui-ci propose une réaction de condensation de type 1,4 Michael entre la 4-hydroxycoumarine et des cétones α , β insaturées (**19**). Ces réactifs sont chauffés au reflux dans l'eau pendant 12 h. Après recristallisation, la warfarine (**8a**) est obtenue, avec un rendement de 48% (conditions A, Schéma 20). Plus récemment, Manolov et collaborateurs [260] décrivent la synthèse de la 4-chloro warfarine à partir de la 4-hydroxycoumarine et la 4-chloro benzalacétone à reflux dans l'eau. Au bout de 14 h, la 4-chloro warfarine (**51a**) est obtenue, après recristallisation, avec un rendement de 75% [260] (conditions A, Schéma 20). En 2003, ces auteurs améliorent leur protocole [261], en utilisant du chlorure de benzyltriéthylammonium comme agent de transfert de phase. Ces nouvelles conditions opératoires permettent de diminuer le temps de réaction à 6 h avec des rendements nettement améliorés de 93%.

D'autres synthèses via l'addition 1,4 de Michael ont été décrites en utilisant des bases en quantité catalytique tels que la triéthylamine [262, 263]. Ainsi, Barker et collaborateurs ont développé en 1971, une synthèse de dérivés de la warfarine à partir de di-hydroxycoumarines (**9**) et benzalacétone (**19**). La réaction est maintenue au reflux dans l'eau avec 5 % mole de triéthylamine pendant 8h. La 5-hydroxywarfarine (**51b**) est obtenue après recristallisation avec un rendement de 70% [262]. La 6-benzyloxywarfarine (**51c**) a été obtenue avec 80% de

rendement, après deux jours de réaction, en utilisant 50% mole de triéthylamine [262] (conditions B, Schéma 20).



Condition A:

eau **8a** : R₁ = R₂ = H rdt = 48%
51a : R₁ = H, R₂ = Cl rdt = 75%

Condition B:

eau, Et₃N **51b** : R₁ = OH, R₂ = H avec OH en position 5 rdt = 70%
51c : R₁ = OBn, R₂ = H avec OBn en position 6 rdt = 80%

Schéma 20 : Synthèses proposées pour préparer la warfarine. Conditions A : Groupes d'Ikawa et de Manolov [235, 260, 261]. Conditions B : Groupe de Barker [262]

La synthèse énantiosélective de la warfarine a été également décrite en utilisant des amines chirales ou des acides aminés naturels en tant qu'organocatalyseurs asymétriques [263]. La réaction d'addition de Michael a lieu via un intermédiaire de type énamine préparé à partir des catalyseurs et de la 4-hydroxycoumarine. Dans une première procédure, les 4-éminocoumarines chirales correspondantes (**52**) et la benzalacétone (**19a**) sont mises en réaction, en présence d'une quantité catalytique d'acide *para* toluène sulfonique (APTS) à température ambiante pendant 14 h. Les warfarines énantiomériquement enrichies (**8a**) sont obtenues avec des rendements variant de 22% à 31%. Une seconde méthode concerne l'utilisation de conditions basiques. Les 4-éminocoumarines (**52**) sont traitées avec du LDA, à -78°C pendant 40 min puis sont ajoutées à une solution de benzalacétone activée avec un acide de Lewis (TMSCl, ZnCl₂, MgCl₂, ou LiCl). Après 4 h de réaction et après purification, les warfarines correspondantes (**8a**) sont obtenues avec des rendements variant de 58% à 71% et des excès énantiomérique (*R* ou *S*) compris entre 51 et 68% (Schéma 21).

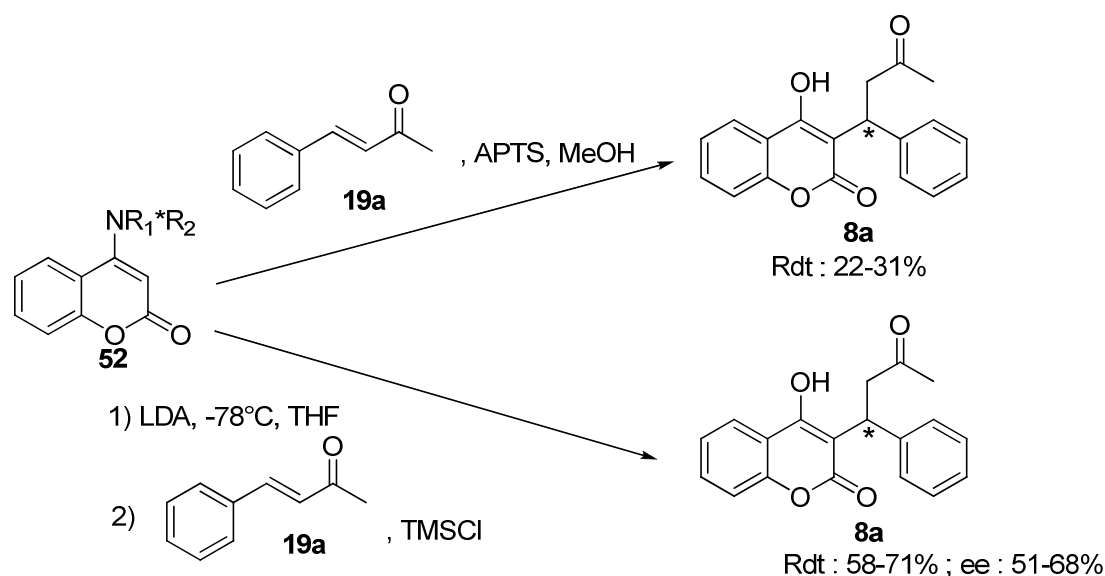


Schéma 21 : Voies de synthèses pour l'obtention de la warfarine proposées par le groupe de Demir [263]

En 2012, Dong et collaborateurs [258] ont décrit une réaction de Michael entre la 4-hydroxycoumarine (**9a**) et une cétones α,β insaturée (**53**) en présence de l'acide 4-méthyl benzoïque (20% mole) et d'un catalyseur de type phosphinamide (20% mole, (*S,S*)-**54**). La réaction est réalisée dans le toluène, à température ambiante, pendant 72 h. Plusieurs dérivés de la warfarine (**55**) ont été obtenus avec des rendements variant de 12% à 99% et des excès énantiomériques entre 83% à 96% [258] (Schéma 22).

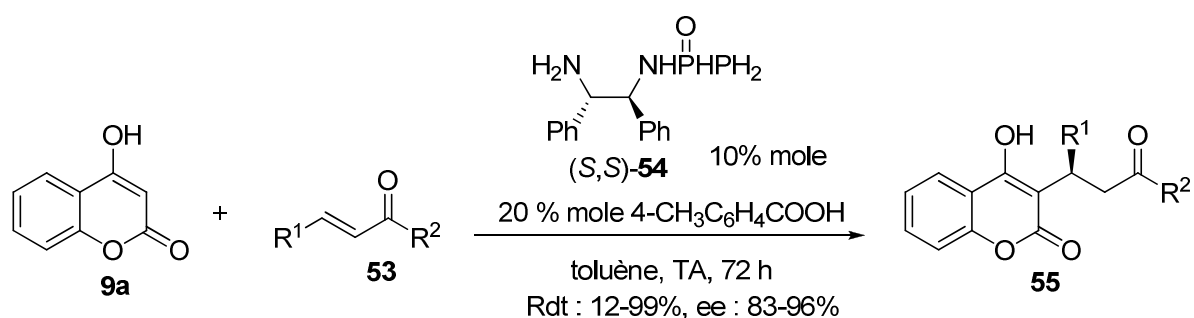


Schéma 22 : Méthode de synthèse énantiosélective de la warfarine et de ses dérivés selon Dong et collaborateurs [258]

Kim et collaborateurs [264] ont développé une autre méthode de synthèse utilisant également des catalyseurs chiraux pour obtenir la (*R*)-warfarine. Par rapport à la méthode précédente, plusieurs différences sont à noter, notamment l'utilisation de diamines chirales (10% mole, **56**) comme catalyseurs et 10 équiv. d'acide acétique. La réaction est réalisée dans le THF, à

température ambiante, pendant 24 h. Ainsi, dans ces conditions, la (*R*)-warfarine ((*R*)-**8a**) est isolée après purification par chromatographie sur colonne chirale, avec un rendement de 99% et un excès énantiomérique de 92% (Schéma 23) [264].

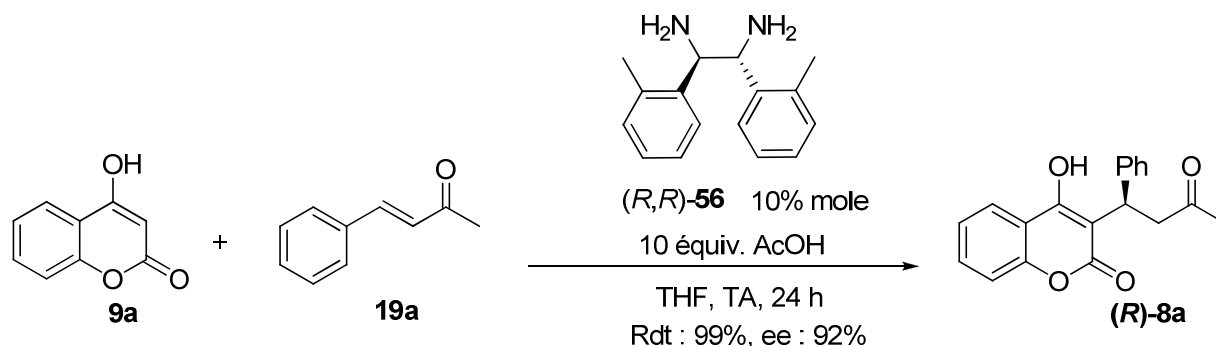


Schéma 23 : Méthode de synthèse de la warfarine utilisant des diamines chirales proposée par Kim et collaborateurs [264]

Le groupe de Halland [265], propose une autre synthèse énantiosélective de la warfarine en utilisant des imidazolines en tant que catalyseurs. La réaction est réalisée avec 10% de catalyseur, dans le dichlorométhane, à température ambiante. Au bout de 6 jours de réaction et en utilisant le catalyseur **57** (Schéma 21), la (*R*)-warfarine ((*R*)-**8a**) est obtenue, après purification par chromatographie sur colonne chirale, avec un rendement de 96% et un excès énantiomérique de 82% [265]. Les mêmes auteurs ont utilisé la (*S*)-proline, en tant que catalyseur (50 % mole) dans le DMSO. Après 15 h de réaction, la warfarine est obtenue avec 85% de rendement avec une perte totale de l'énantiosélectivité [265] (Schéma 24).

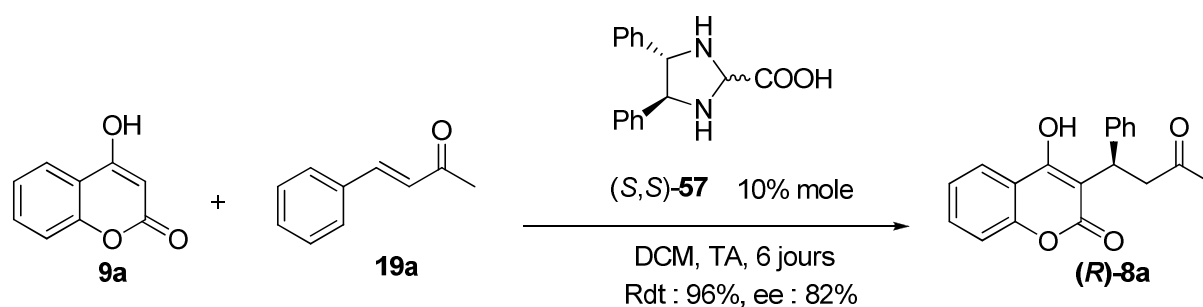


Schéma 24 : Méthode de synthèse de la warfarine utilisant des imidazolines chirales (**57**) proposée par Halland et collaborateurs [265]

Autres méthodes

Hormis l'addition 1,4 de Michael largement préconisée pour la synthèse de la warfarine, il existe aussi d'autres réactions permettant d'accéder à cette molécule. La synthèse de la warfarine et de ses analogues a notamment été décrite en utilisant des catalyseurs non asymétriques tel que $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ [266]. Kischel et collaborateurs ont développé une méthode permettant de réaliser la réaction d'alkylation des composés 1,3 dicarboxylés, catalysée par $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (**58**). La 4-hydroxycoumarine (**9a**) et la benzalacétone (**19a**) sont mises en réaction en présence de 5% mole de catalyseur dans le 1,2 dichloroéthane à 80°C. Après 20 h, la warfarine (**8a**) est obtenue avec 42% de rendement. Cette nouvelle méthode se révèle être particulièrement avantageuse du fait de l'utilisation d'un catalyseur peu coûteux et respectueux de l'environnement, des conditions douces (chauffage léger) et l'obtention de bons rendements [266] (Schéma 25).

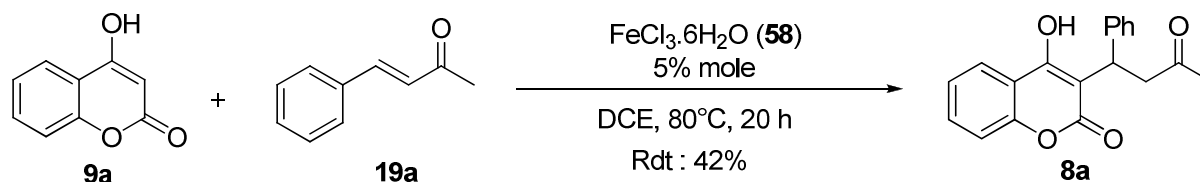


Schéma 25 : Voie de synthèse de la warfarine proposée par Kischel et collaborateurs [266]

Cravotto et collaborateurs [267] ont décrit la réaction de Knoevenagel-hétéro-Diels-Alder pour la synthèse énantiosélective de warfarines. Le protocole concerne deux étapes : la réaction de cycloaddition et l'étape d'hydrolyse. La première étape caractérise la réaction one-pot de trois composés impliquant la réaction de Knoevenagel entre la 4-hydroxycoumarine (**9a**) et un dérivé de benzaldéhyde (H, 4-Cl, ou 4- NO_2). Puis le composé formé *in situ* réagit avec un diénophile substitué par un auxiliaire chiral (tel que le groupement menthyle) via la réaction d'hétéro-Diels-Alder. La seconde étape concerne l'hydrolyse en milieu acide de l'auxiliaire chiral qui mène à la formation énantiosélective de la warfarine et de ses analogues chloré et nitré avec 61, 56 et 59% de rendements respectivement et des excès énantiomériques supérieurs à 93% [267] (Schéma 26).

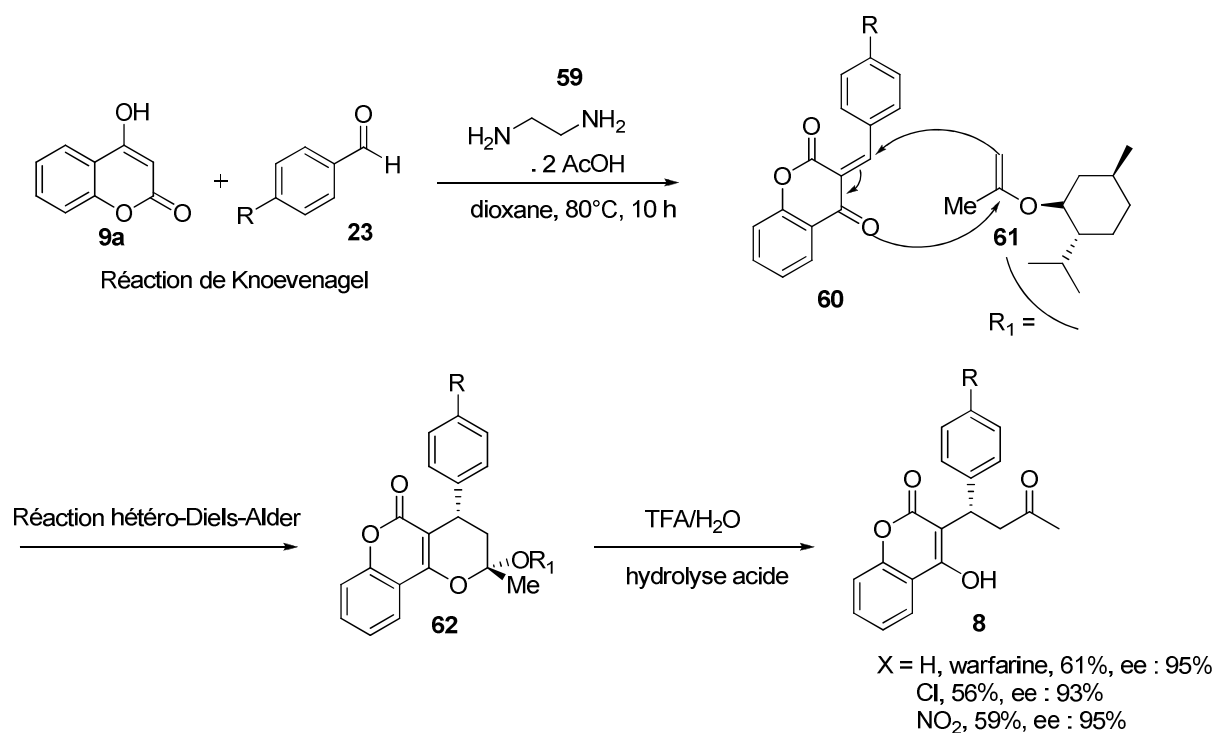


Schéma 26 : Réaction tandem de Knoevenagel-hétéro-Diels-Alder proposé par Cravotto et collaborateurs [267] pour obtenir la warfarine et ses dérivés

Il existe donc une grande diversité de méthodes pour la synthèse de la warfarine et de ses analogues. Certaines de ces méthodes ont servi d'inspiration pour nos travaux de recherche, dans la synthèse de warfarines fonctionnalisées.

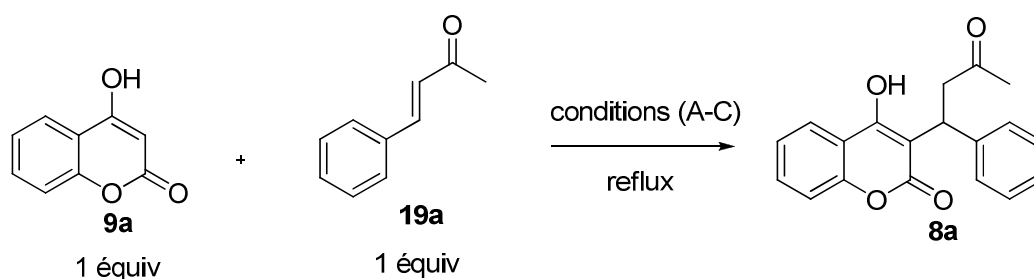
IV.3.1.2.2 Expériences réalisées

Pour synthétiser la warfarine et ses analogues, nous avons particulièrement privilégié les méthodes préconisant l'addition 1,4 de Michael à partir de la 4-hydroxycoumarine (**9a**) et des benzalacétones correspondants. Nos efforts se sont d'avantage concentrés dans la synthèse de la warfarine racémique en utilisant des conditions acides, basiques ou neutres et dans certains cas en utilisant des énamines en tant qu'intermédiaires de synthèse.

Les premières tentatives ont impliqué des conditions acides. La 4-hydroxycoumarine étant insoluble dans de nombreux solvants organiques, nous avons utilisé le THF, le DMF ou l'eau comme solvants afin d'assurer un milieu réactionnel homogène.

Inspirés par le protocole d'Ikawa et collaborateurs [235] nous avons mis en réaction un mélange équimolaire de 4-hydroxycoumarine (**9a**) et de benzalacétone (**19a**) en présence d'1,1 équiv. de HCl 4% au reflux dans le THF, pendant 7 jours. Après traitement, on observe

la dégradation des produits (conditions A, Schéma 27). Un autre essai a été réalisé en utilisant le DMF comme solvant. Après 7 jours de réaction, on observe la dégradation du milieu réactionnel. (conditions B, Schéma 27). Une nouvelle tentative a été réalisée basée sur la méthode Kim et collaborateurs [264]. Nous avons utilisé 10 équiv. d'acide acétique dans un mélange équimolaire de réactifs de départ dans le THF, à reflux. Après 11 jours de réaction on observe la présence de la benzalacétone de départ (conditions C, Schéma 27). Les conditions en milieu acide n'ont pas permis d'accéder à la warfarine souhaitée. Compte tenu de ces résultats, nous avons réalisé des essais dans des conditions basiques.

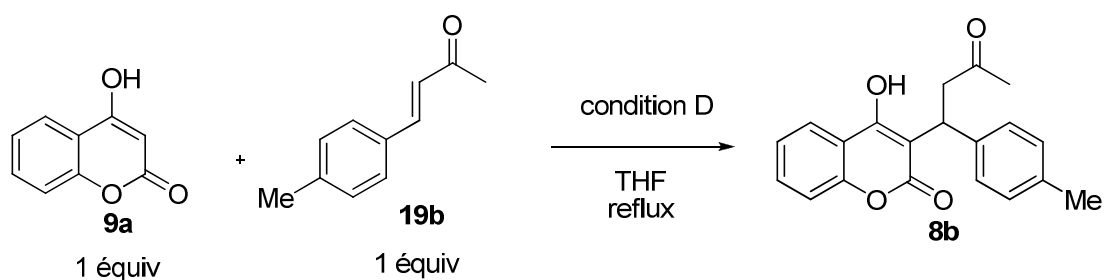


Conditions acides

A : HCl 4% (1,1 équiv) ,	THF,	7 jours	dégradation de produits
B : HCl 4% (1,1 équiv) ,	DMF,	7 jours	dégradation de produits
C : AcOH (10 équiv) ,	THF,	11 jours	benzalacéone de départ

Schéma 27 : Synthèses de la warfarine en conditions acides

Inspirés par les travaux de Demir et collaborateurs [263], nous avons utilisé 1,2 équiv. de LDA et la 4-Me-benzalacétone (**19b**) pour tester sa réactivité vis-à-vis de la benzalacétone nue. La réaction est réalisée à -78 °C dans le THF anhydre pendant 1 h, puis 2h à température ambiante. L'analyse par RMN ¹H du produit brut indique la présence des deux réactifs de départ (conditions D, Schéma 28).



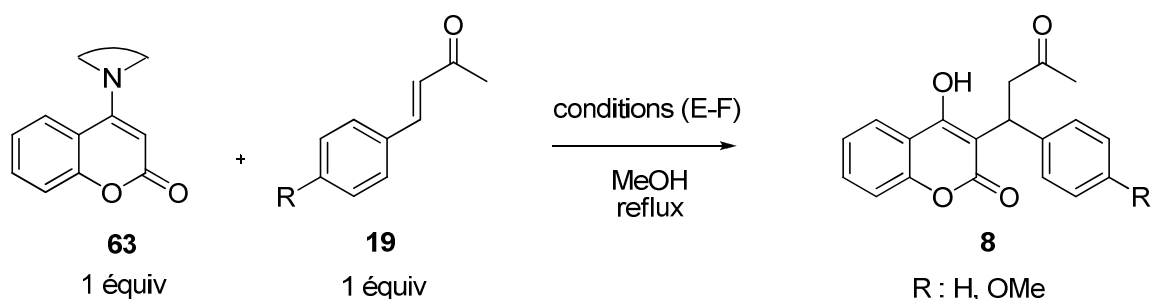
Conditions basiques

D : LDA (1,2 équiv), 3h produits de départ

Schéma 28 : Synthèses de la warfarine en conditions basiques

Un autre essai impliquant un intermédiaire de type énamine a été testé en se basant sur les protocoles de Demir et collaborateurs [263], et Chavan et collaborateurs [268]. En adaptant les conditions décrites par Chavan et collaborateurs [268], la synthèse des énamines à partir de la 4-hydroxycoumarine et des amines (morpholine et pipéridine) a été réalisée par activation sous micro-ondes (300W, 120°C, 10 min). Les énamines correspondantes (**63a**, **63b**) sont obtenues avec 63% et 21% de rendement respectivement.

Une fois les énamines de la 4-hydroxycoumarine synthétisées, nous avons ajouté 1 équiv. de benzalacétone en présence de 10% mole d'APTS. La réaction est réalisée à température ambiante, dans le méthanol. Après 5 jours de réaction, on observe la présence des réactifs de départ (conditions E, Schéma 29). Le même résultat est obtenu avec l'énamine issue de la pipéridine en présence de ZnCl₂ dans le méthanol (conditions F, Schéma 29).

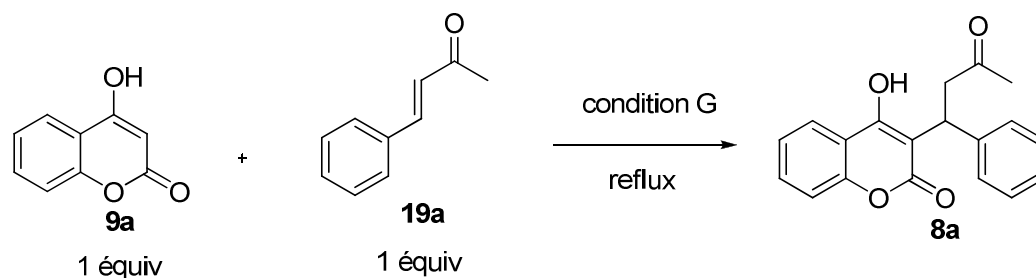


Conditions

E : R = H, 63a : morpholino-énamine ,	APTS (10 % mole),	5 jours	produits de départ
F : R = OMe, 63b : pipéridino-énamine,	ZnCl ₂ (10 % mole),	2 jours	produits de départ

Schéma 29 : Synthèses de la warfarine à partir de 4-énaminocoumarines

Au vue de ces résultats et en s'appuyant sur les travaux d'Ikawa [235] et Manolov [260], la 4-hydroxycoumarine (**9a**) et la benzalacétone (**19a**) sont mises en réaction au reflux dans l'eau pendant de 2 jours. Après purification, la warfarine (**8a**) est obtenue en mélange avec sa forme cyclisée avec un rendement de 3% (conditions G, Schéma 30). Ce faible rendement peut s'expliquer par des étapes de purifications fastidieuses.

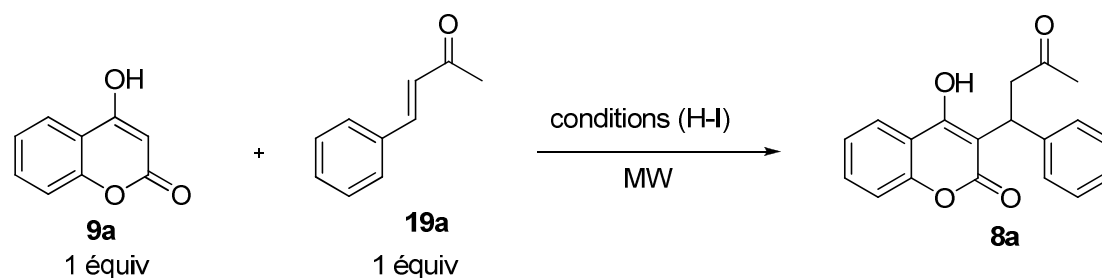


Conditions neutres

G : eau, 2 jours rdt : 3 %

Schéma 30 : Synthèses de la warfarine en conditions neutres

Etant donné que pour bon nombre de réactions décrites précédemment, des dégradations de produits étaient observées, quelques réactions ont été reprises et réalisées sous micro-ondes. Les essais réalisés sous micro-ondes ont été suivis par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS). Malheureusement, les différentes tentatives réalisées par activation sous micro-ondes n'ont pas permis d'observer la formation du produit désiré. Deux exemples sont décrits dans le schéma suivant (Schéma 31).

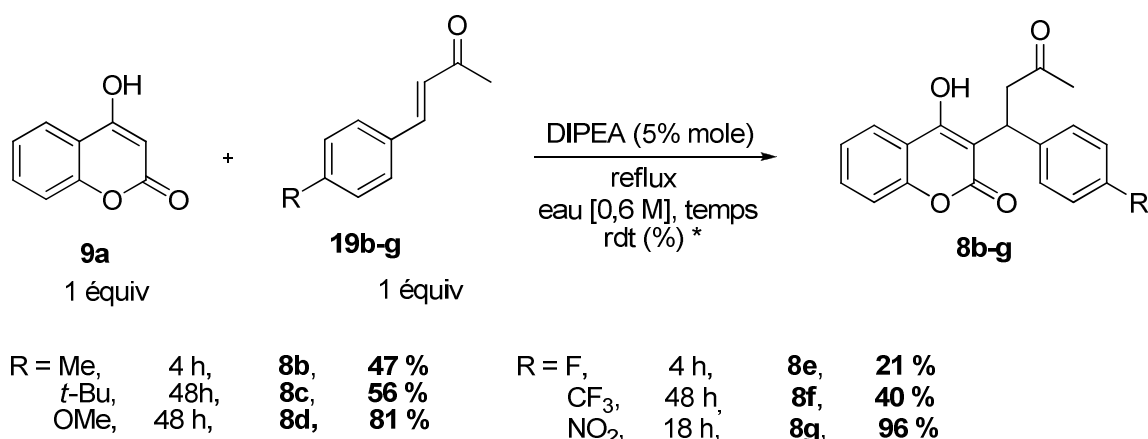


Conditions :

H : 300W, 60°C, 55 min, HCl 4 % (5 équiv.), THF produits de départ
 I : 5W, 60°C, 50 min, HCl 4 % (10 équiv.), sans solvant produits de départ

Schéma 31 : Tentatives de synthèse de warfarine réalisées sous activation micro-ondes

Nous avons décidé de reprendre la synthèse décrite par Ikawa concernant la synthèse de la warfarine dans l'eau [235]. Pour ce faire, un mélange équimolaire de la 4-hydroxycoumarine (**9a**) et de la benzalacétone (**19a**) est chauffé à reflux dans l'eau (0,4 M). Le mélange est agité pendant 12 h jusqu'à l'apparition d'une gomme puis est refroidi à 0 °C. Après purification, le produit (**8a**) est obtenu avec 33% de rendement. (conditions J, Schéma 32). La réaction a été réalisée à plus grande échelle (x 10). Dans ce cas, le produit désiré (**8a**) est obtenu avec un rendement RMN ¹H de 63% (conditions K, Schéma 32). Nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration du milieu réactionnel sur le rendement de la réaction. Un essai avec une concentration plus élevée de 0,6 M a été réalisé. La warfarine est obtenue avec un rendement déterminé par RMN ¹H de 61% (conditions L, Schéma 32). La différence de rendement étant quasiment négligeable, nous avons par la suite décidé de poursuivre la réaction avec une concentration de 0,6 M pour des commodités de manipulation. En effet, avec un milieu réactionnel plus concentrée, la gomme formée est plus compacte permettant par la suite une étape d'extraction plus aisée. En s'appuyant sur les travaux de Barker et collaborateurs [262], qui préconisent l'utilisation de la triéthylamine en quantité catalytique (5% ou 50% mole) pour obtenir plusieurs dérivés de la warfarine, nous avons décidé d'ajouter la *N, N* diisopropyléthylamine (DIPEA, pKa = 11,4) légèrement plus encombrée que la triéthylamine (pKa = 10,7). Ainsi, un nouvel essai a été réalisé avec 0,05 équiv. de DIPEA. Au bout de 2 jours de réaction, et après purification, la warfarine est obtenue avec un rendement de 94% (conditions M, Schéma 32). Ainsi, cette méthode est d'autant plus valorisante puisque à notre connaissance aucune étude dans la littérature ne relate l'utilisation de la DIPEA (5% mole) pour préparer les analogues de la warfarine dans l'eau via l'addition de Michael (Schéma 33).



* rendements calculés par RMN ¹H

Schéma 34 : Synthèse des dérivés de la warfarine (8b-g) utilisant la 4-hydroxycoumarine (9a) et les benzalacétones correspondantes (19b-g)

Les dérivés de warfarines ont été synthétisés en partant de la 4-hydroxycoumarine et des benzalacétones fonctionnalisées préalablement obtenues (Schéma 34). En ce qui concerne les benzalacétones substituées par des groupements alkyles, la warfarine (**8b**) substituée par un groupement méthyle est obtenue au bout de 4 h de réaction avec un rendement de 47%. L'analogie alkylé de la *t*-Bu warfarine (**8c**) est obtenu avec un rendement de 56% au bout de 48 h de réaction. En introduisant un atome de fluor, la warfarine correspondante est obtenue avec un rendement de 21%. Ces conditions n'ont pas été optimisées et il aurait pu être intéressant d'allonger le temps de réaction de 24 h à 48 h. La 4-OMe warfarine (**8d**) est obtenue avec un rendement de 81% au bout de 48 h de réaction. Ici, le caractère électrodonneur du groupement méthoxy ne semble pas être un obstacle à l'addition 1,4 de Michael. La synthèse de warfarine contenant des groupements électroattracteurs est aussi intéressante. Ces groupements positionnés en para du phényle de l'accepteur de Michael favorisent l'addition 1,4 en augmentant l'électrophilie de la position β de la cétone α, β insaturée. La 4-NO₂ warfarine (**8g**) est obtenue avec un très bon rendement de 96% au bout de 18 h de réaction, tandis que le dérivé trifluorométhylé (**8f**) est obtenu avec un rendement de 40% au bout de 48 h de réaction. Cette différence pourrait s'expliquer par la perte de produit pendant l'étape d'extraction. Cette étape s'est avérée très fastidieuse car une grande partie du produit attendu reste en phase aqueuse.

Ainsi l'addition 1,4 de Michael entre la 4-hydroxycoumarine et diverses benzalacétones ont permis d'obtenir des warfarines fonctionnalisées, intermédiaires clés pour préparer les cyclocoumarols correspondants.

IV.3.1.3 Synthèse des dérivés du cyclocoumarol

IV.3.1.3.1 Littérature

La synthèse du cyclocoumarol n'est pas très décrite dans la littérature. Il existe principalement deux grandes méthodes pour préparer ce composé : une stratégie « one-pot » via des réactions d'addition 1,4 de Michael ou d'hétéro-Diels-Alder, ou la cyclisation en milieu acide de la warfarine correspondante. Par la suite quelques méthodes vont être détaillées.

Différents travaux décrivent l'obtention du cyclocoumarol [225, 267], par une méthode « one-pot » sans isoler la warfarine intermédiaire. Parmi celles-ci, Obach et collaborateurs [233] proposent la synthèse du cyclocoumarol et de ses analogues à partir d'1.6 équiv. de 4-hydroxycoumarine (**9a**) et d'1 équiv. de benzalacétone (**19a**) au reflux du méthanol. Les temps de réaction s'échelonnent de 18 h à 3 jours avec des rendements variant de 40% à 71% [233].

Cravotto et collaborateurs [269] ont développé en 2001 une approche péricyclique énantiosélective permettant d'accéder à une chimiothèque de composés de type pyranocoumarine utilisant la réaction hétéro-Diels-Alder [269]. La réaction est développée à partir de la 4-hydroxycoumarine (**9a**), des aldéhydes aromatiques (**43**) et des alcènes riches (**68**) en électrons dans le dioxane à 90°C en utilisant le diacétate d'éthylènediammonium (**59**) en tant que catalyseur. Les pyranocoumarines (**69**) sont obtenues avec des rendements variant de 30% à 83% selon les substituants de départ choisis. Le cyclocoumarol est obtenu, après purification, avec un rendement de 83% et est en équilibre avec la warfarine. Les autres analogues formés correspondent aux dérivés du cyclocoumarol (Schéma 35).

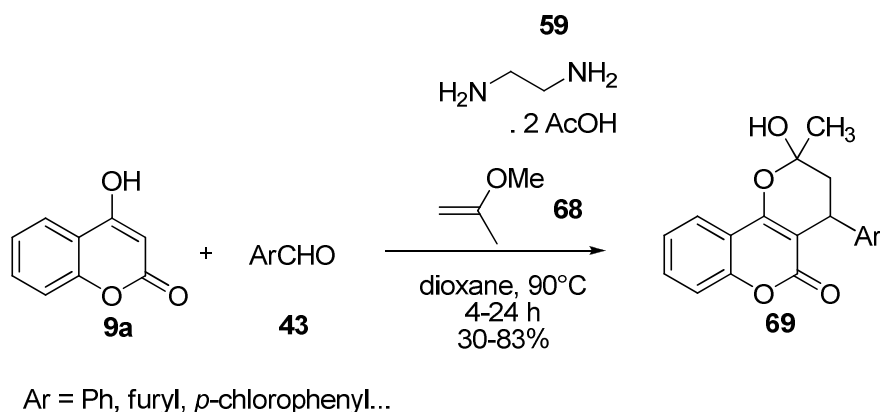
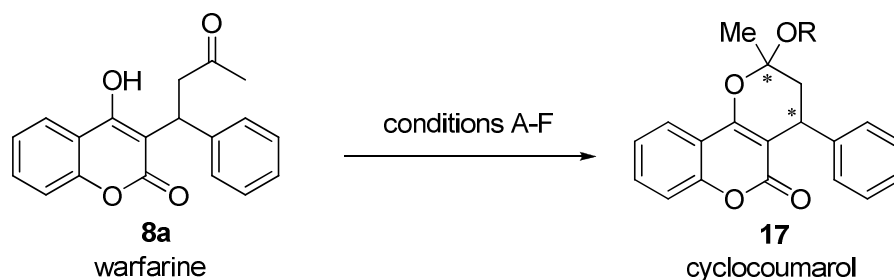


Schéma 35 : Synthèse « one-pot » permettant d'obtenir le cyclocoumarol en passant par la réaction hétéro-Diels-Alder

La plupart des méthodes de synthèse du cyclocoumarol concerne la cyclisation de la warfarine [209].

Ikawa et collaborateurs [235] décrivent en 1944 la cyclisation de la warfarine (**8a**) en présence d'une quantité catalytique d'HCl 4% au reflux du méthanol. Après 15 min de réaction, le produit recristallisé est obtenu avec 83% de rendement (Conditions A, Schéma 36) [235].

Trois ans plus tard, Stahmann en collaboration avec Ikawa et Link, démontrent l'efficacité de cette méthode en synthétisant une librairie de composés 3,4 dihydropyranocoumarines [236]. En 1950, Link et collaborateurs [270] propose d'obtenir la forme acétylée du cyclocoumarol en traitant la warfarine avec un mélange d'anhydride acétique et de l'acide perchlorique en tant que catalyseur acide. Le composé désiré est obtenu avec un rendement faible de 16% [270] (Conditions B, Schéma 36).



Conditions : Chauffage au reflux

A : R = OMe,	HCl 4%, MeOH,	15 min,	rdt = 83%
B : R = OAc,	Ac ₂ O/HClO ₄ , eau,	>1h,	rdt = 16 %
C : R = OMe,	HCl/MeOH,	17-22h,	rdt = 73-90%
D : R = OMe,	MeOH anhydre,	3h,	rdt = quantitatif

Conditions : MW

E1 : R = OMe,	montmorillonite K-10,	MeOH,	900W,	65°C,	2 min	rdt = 90%
E2 : R = OEt,	montmorillonite K-10,	MeOH,	900W,	80°C,	2 min	rdt = 67%
F : R = OMe,	montmorillonite KSF,	MeOH,	560W,	65°C,	5 min	rdt = 92%

Schéma 36 : Synthèse de pyranocoumarines par chauffage au reflux ou irradiation sous MW

Obach et collaborateurs [233] proposent aussi la synthèse de la warfarine (**8a**) à partir d'une solution méthanolique d'acide chlorhydrique (HCl / MeOH) au reflux. Au bout de 17 h - 22 h, les dérivés de cyclocoumarol (**17**) sont obtenus avec des rendements compris entre 73% à 90% [233] (Conditions C, Schéma 36).

En 2006, Shahzadi et collaborateurs [271] décrivent l'obtention du cyclocoumarol à partir de la warfarine dans du méthanol anhydre. Après 3 h de réaction, le cyclocoumarol est obtenu quantitativement sous forme de cristaux (Conditions D, Schéma 36).

Ainsi, pour obtenir le cyclocoumarol, les méthodes utilisant la warfarine en tant qu'intermédiaire préconisent l'utilisation d'un catalyseur acide dans le méthanol. Néanmoins la plupart des réactions sont longues. Aussi l'idée d'utiliser l'activation sous micro-ondes pour réduire le temps de réaction a été explorée.

C'est ainsi que l'équipe de Krstic propose en 2002, de former le cyclocoumarol sous activation micro-ondes en utilisant la montmorillonite K-10 en tant que catalyseur acide. En effet, ce réactif offre de nombreux avantages : il a des propriétés non-corrosives, c'est un acide fort, peu coûteux et non toxique. Il est également utilisé dans des conditions de réactions douces, sans précautions particulières pour l'introduire dans le milieu réactionnel. Le work-up

consistant d'une simple filtration permet de récupérer le catalyseur et de le réutiliser. La cyclisation de la warfarine est réalisée dans le méthanol en utilisant les conditions micro-ondes suivantes : 900 W, 65°C, 2 min. Le cyclocoumarol est obtenu, après cristallisation, avec un rendement de 90% (Conditions E1, Schéma 36). Par ailleurs, en utilisant l'éthanol comme solvant, le dérivé éthoxy du cyclocoumarol est obtenu avec 67% de rendement [272] (Conditions E2, Schéma 36).

En 2007, Singh et collaborateurs [273] développent aussi une méthode sous activation micro-ondes utilisant la montmorillonite KSF en tant que catalyseur acide dans le méthanol. Ce réactif présente des avantages similaires à la montmorillonite K-10. Les conditions opératoires mises au point par les auteurs permettent d'obtenir le cyclocoumarol avec des temps d'irradiation relativement courts (560 W, 65°C, 5 min). Après cristallisation, le cyclocoumarol est obtenu avec 92% de rendement (Conditions F, Schéma 36).

L'ensemble des méthodes décrites dans ce paragraphe a été résumé dans le schéma suivant (Schéma 37) :

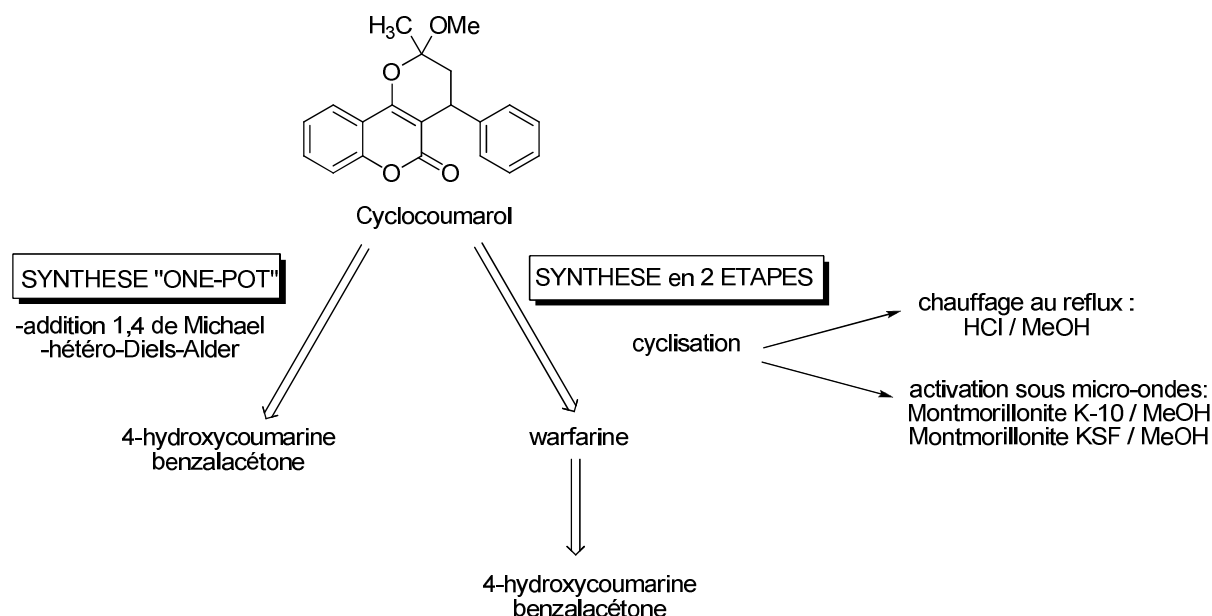
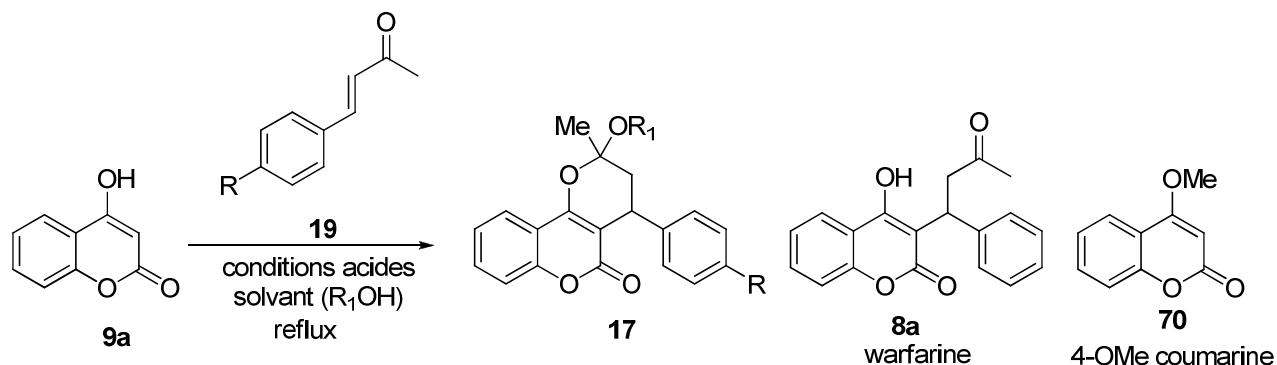


Schéma 37 : Les 2 principales voies de synthèses permettant d'accéder au cyclocoumarol

Après avoir décrit quelques méthodes issues de la littérature, permettant de synthétiser le cyclocoumarol, nous détaillerons ensuite, les expériences réalisées au laboratoire et discuterons des résultats obtenus.

IV.3.1.3.2 Expériences réalisées

Dans le cadre de ma thèse, nous avons réalisé, dans un premier temps, les méthodes de synthèse « one-pot » afin de nous affranchir de l'isolement de la warfarine. Les principales conditions opératoires sont résumées dans le Tableau 11 :



Conditions	9a nb équiv.	R	R ₁	Solvant	Acide	durée	Rdt 17	Rdt 8a	Rdt 70	Rdt 9a
A	1,6	H	OMe	MeOH	HCl 3N 0,6 équiv.	6 j	0	-	Mélange 22 : 78	
B	"	"	"	"	"	3 j	0	-	49	45
C	"	"	"	"	HCl 4% 4 équiv.	9 j	18	-	prés	-
D	1	"	"	"	HCl 4% 1,6 équiv.	20 j	16	-	-	-
E	1,3	"	"	"	HCl 4% 30 équiv.	9 j	17	-	prés	-
F	"	"	"	"	HCl 4% 20 équiv.	27 h	39	3	-	-
G	1,6	Me	OMe	MeOH	HCl 4% 1 équiv.	17 j	31	-	-	-
H	"	F	OMe	MeOH	"	10 j	15	-	-	-
I	1	Me	OEt	EtOH	"	17 j	15	traces	-	-

Tableau 11 : Conditions opératoires utilisées pour la synthèse « one-pot » du cyclocoumarol (**17**) en présence d'1 équiv. de benzalacétone (**19**). (- : non observé, Rdt : rendement déterminé par RMN ¹H, prés = présence)

Le mécanisme de formation du cyclocoumarol est proposé ci-dessous (Schéma 38) :

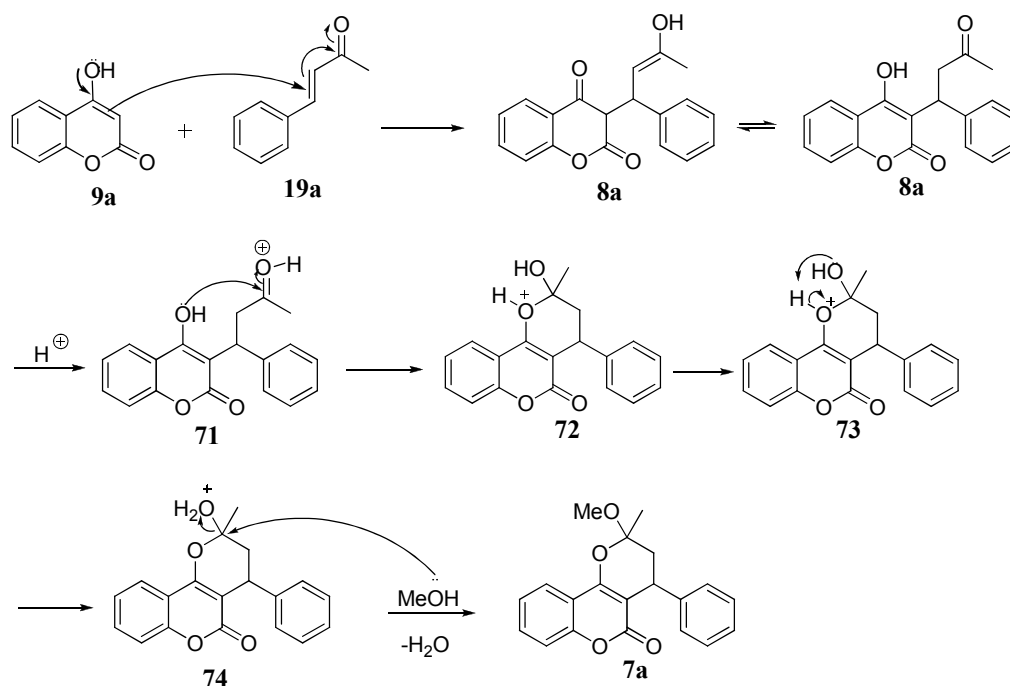


Schéma 38 : Mécanisme de l'addition 1,4 de Michael permettant de former le cyclocoumarol « one-pot »

Pour les premiers essais nous nous sommes inspirés sur le protocole d'Obach et collaborateurs [233] en partant d'1,6 équiv. de 4-hydroxycoumarine (**9a**) et d'1 équiv. de benzalacétone (**19a**) au reflux d'une solution d'acide chlorhydrique 3 N dans le méthanol (0,6 équiv, 16 mL). Au bout de 6 jours de réaction et après purification sur colonne chromatographique, nous obtenons un mélange de 4-hydroxycoumarine (**9a**) et de 4-OMe coumarine (**70**), 78 : 22 (conditions A, Tableau 11). La formation de la 4-OMe coumarine pourrait s'expliquer par une réaction d'addition du méthanol sur la forme cétonique de la 4-hydroxycoumarine (**75**) conduisant à un hémicétal intermédiaire (**76**) (Schéma 39).

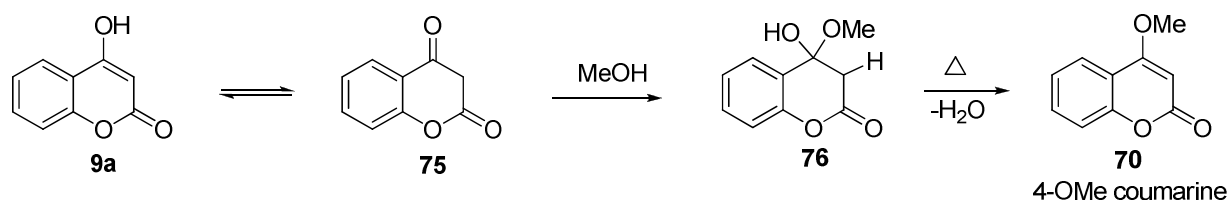


Schéma 39 : Mécanisme proposé pour la formation de la 4-OMe coumarine

La formation de ce produit secondaire non souhaité diminue la quantité de la 4-hydroxycoumarine qui réagit avec la benzalacétone. Pour éviter sa formation, nous avons

diminué le temps de réaction dans un nouvel essai. Au bout de 3 jours de réaction, le produit purifié est un mélange contenant 45% de la 4-hydroxycoumarine, 4% de benzalacétone et 49% de 4-OMe coumarine (conditions B, Tableau 11). D'après ces résultats, le facteur temps n'empêche pas la formation de ce produit secondaire.

Aussi, nous avons décidé de réaliser la réaction en utilisant de l'acide chlorhydrique 4% selon les conditions d'Ikawa et collaborateurs [235] : 1,6 équiv. de 4-hydroxycoumarine (**9a**) et 1 équiv. de benzalacétone (**19a**) en présence d'HCl 4% sont chauffés au reflux du méthanol. Nous avons ajouté 1 équiv d'HCl 4 % au début de la réaction, puis après suivi GC et CCM indiquant la présence des réactifs de départ, nous avons ajouté 3 équiv. d'acide. Au bout de 9 jours de réaction, et après purification, nous obtenons le cyclocoumarol en mélange avec la 4-OMe coumarine. Le rendement total de la réaction est de 18% (conditions C, Tableau 11).

A partir de ces premiers résultats encourageants, nous avons étudié l'influence du nombre d'équivalents de la 4-hydroxycoumarine (**9a**). En effet, en diminuant la quantité de 4-hydroxycoumarine, nous nous attendions à réduire la formation de 4-OMe coumarine. En partant d'un mélange équimolaire de réactifs de départ et en présence d'HCl 4%, la réaction est réalisée au reflux du méthanol. Au bout de 20 jours de réaction et après ajout total de 1,6 équiv de l'acide, nous obtenons le cyclocoumarol en mélange avec la benzalacétone. Le rendement total de la réaction est de 16% (conditions D, Tableau 11).

Ce dernier résultat nous indique qu'une quantité de benzalacétone n'a pas réagi. Aussi, nous avons réitéré la réaction en partant d'un léger excès de 4-hydroxycoumarine (1,3 équiv.), au reflux du méthanol. Cette fois-ci, en s'accordant au résultat de l'essai antérieur, 2 équiv d'HCl 4% sont ajoutés dès le début de la réaction. Puis, en fonction des résultats du suivi CCM et GC, de l'acide est rajouté au fur et à mesure jusqu'à la consommation des produits. Au bout de 9 jours de réaction et après ajout total de 30 équiv d'acide, le produit brut est récupéré et purifié par colonne chromatographique. Nous obtenons le cyclocoumarol en mélange avec la benzalacétone et la 4-hydroxycoumarine. Le rendement total de la réaction est de 17% (conditions E, Tableau 11).

Au vu de ce résultat, nous avons réalisé un dernier essai à partir de 1,3 équiv. de 4-hydroxycoumarine (**9a**) et d'1 équiv. de benzalacétone (**19a**) en présence de 20 équiv d'HCl 4%. Au bout de 27 h de reflux dans le méthanol, et après purification, nous obtenons un

mélange de cyclocoumarol et de benzalacétone et nous avons pu isoler la warfarine (3%). Le rendement de la réaction est de 39% pour le cyclocoumarol (conditions F, Tableau 11).

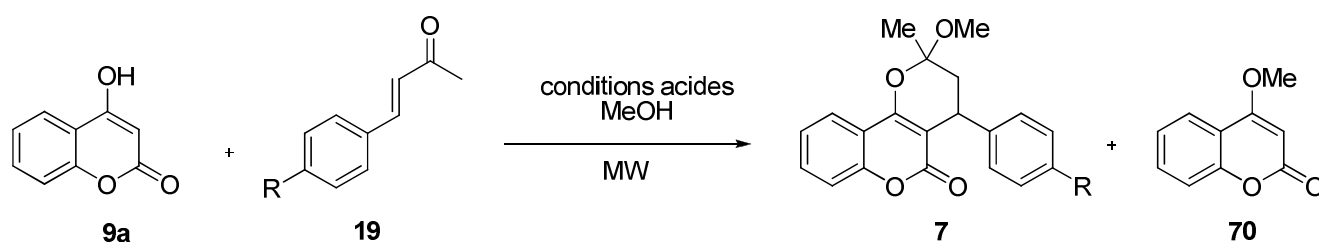
Compte tenu de ces résultats, nous comprenons que la réaction n'est pas totale malgré la quantité d'acide ajoutée progressivement. Le problème majeur réside dans les purifications qui sont fastidieuses car bien que le produit final soit bien formé, son isolement reste difficile.

Dans la suite de l'optimisation nous nous sommes intéressés à la préparation des dérivés du cyclocoumarol contenant un groupe méthylé, fluoré et groupement éthoxy. Pour cela, nous nous sommes basés sur les protocoles d'Obach [233], d'Ikawa [235]. 1 équiv. de 4-Me benzalacétone et 1, 6 équiv. de 4-hydroxycoumarine ont été mis en réaction en présence d'1 équiv. d'HCl 4%, au reflux du méthanol. Au bout de 17 jours de réaction, et après purification, nous obtenons un mélange avec 4-Me benzalacétone (31%) (conditions G, Tableau 11).

A son tour, le dérivé fluoré est obtenu avec un rendement de 15% après 10 jours de réaction. (conditions H, Tableau 11). Pour le dérivé éthoxylé, en adaptant le protocole d'Ikawa [235], la réaction d'un mélange équimolaire de benzalacétone (**9a**) et de 4-hydroxycoumarine (**19a**) a été réalisée en présence d'1 équiv. d'HCl 4 %, au reflux de l'éthanol. Le produit désiré est obtenu après 17 jours de réaction, en mélange avec la benzalacétone de départ. Le rendement de la réaction est de 15 % (conditions I, Tableau 11).

Les essais réalisés au reflux ne sont pas concluants. De plus, les temps de réaction sont longs et peuvent atteindre les 20 jours. Pour contourner cet inconvénient, quelques essais sous activation micro-ondes ont été réalisés.

Différentes conditions opératoires ont été testées et sont illustrées dans le Tableau 12. Nous sommes parvenus à isoler le cyclocoumarol méthylé avec 36% de rendement au bout de 3 h 30 min sous activation micro-ondes (200W, 60°C, 200°C, conditions E, Tableau 12).



Conditions	9a nb équiv.	R	MW	Acide	durée	Rdt 7	Rdt 70
A	1,6	H	150W, 60°C	HCl 4% 4 équiv.	1 h05 min	0	prés
B	"	"	300W, 60°C	HCl 4% 40 équiv.	2 h35 min	0	prés
C	1	"	300W à 200W 100°C à 60°C	HCl 4% 1 équiv. et Montmorillonite K10 1 équiv.	2 h	9	-
D	"	"	150W à 300W 115°C à 170°C	HCl 4% 1 équiv.	4 h35 min	9	-
E	1,6	Me	200W 60°C à 200°C	HCl 4% 1 équiv.	3 h30 min	36	-
F	1,6	F	60W, 60°C	HCl 4% 2 équiv.	2 h20 min	traces	-

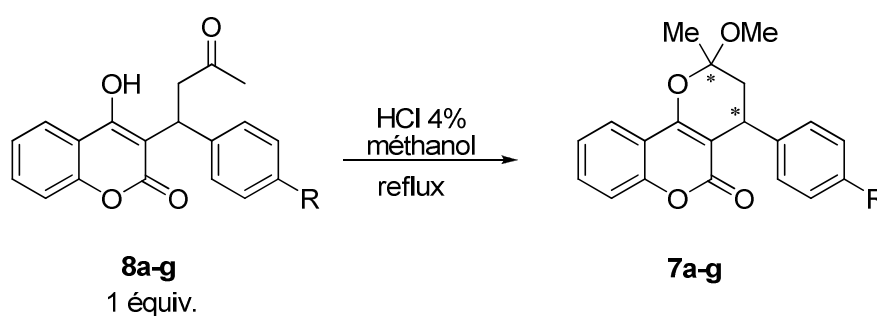
Tableau 12 : Conditions opératoires utilisées pour la synthèse « one-pot » du cyclocoumarol par irradiation sous micro-ondes (7) en présence d'1 équiv. de benzalacétone (19). (- : non observé, Rdt : rendement déterminé par RMN ¹H, prés = présence)

Les méthodes précédemment décrites pour obtenir le cyclocoumarol par des synthèses « one-pot » se sont révélées inefficaces. Nous avons décidé de réaliser la synthèse du cyclocoumarol et de ses analogues à partir des warfarines correspondantes. Inspirés par les travaux d'Ikawa [235], nous avons effectué un premier essai à partir de 21 mg de réactif de départ en présence de 0.38 g d'HCl 4% dans le méthanol. Au bout d'1 h de réaction au reflux, le cyclocoumarol est obtenu avec un rendement déterminé par RMN ¹H de 74% et ce résultat est en accord avec ceux reportés dans la littérature [235].

Au vue de ces résultats très encourageants, nous avons étendu ces conditions à la synthèse d'analogues du cyclocoumarol (Schéma 40). Il faut noter qu'au cours de la cyclisation un centre stéréogène supplémentaire se forme. Quatre stéréoisomères possibles sont donc envisageables. Selon l'analyse RMN ¹H, nous observons 2 diastéréoisomères. Cependant, à ce stade, il n'est pas possible de les quantifier par RMN, le cyclocoumarol étant en équilibre avec sa forme ouverte en solution. Par la suite, les diastéréoisomères ont été purifiés par chromatographie flash et caractérisés séparément par RMN ¹H. Leurs analyses RMN et leurs caractérisations par rayons X seront décrits dans le chapitre suivant. Par la suite, nous nommerons le diastéréoisomère majoritaire, **dia 1** et le diastéréoisomère minoritaire, **dia 2**.

La synthèse du cyclocoumarol a été reproduite en partant de 100 mg de warfarine. Le cyclocoumarol est formé au bout de 23 h de réaction. Après purification sur colonne chromatographique, nous isolons 53% du **dia 1** et 9% du **dia 2**. Pour les dérivés alkylés, le 4-Me cyclocoumarol est obtenu, après 31 h de réaction, avec un rendement de 46% pour le dia 1

et 13% pour le **dia 2**. Pour le dérivé 4-*t*-Bu cyclocoumarol, le temps de réaction est de 52 h. Néanmoins, le cyclocoumarol correspondant est isolé avec un rendement de 57% pour le **dia 1** et 16% pour le **dia 2**. Le cyclocoumarol méthoxylé est obtenu au bout de 66 h avec un rendement de 63%. Les diastéréoisomères n'ont pas pu être séparés. Le cyclocoumarol fluoré est obtenu en 31 h de réaction avec un rapport **dia 1** : **dia 2** de 44 : 19. Enfin pour les dérivés comportant des groupements électroattracteurs (NO₂ et CF₃), les temps de réactions sont quasi-similaires, 22 h et 23 h respectivement. Ainsi, le dérivé nitré est isolé avec 64% de rendement pour le **dia 1** et avec 12% de rendement pour le **dia 2**. Alors que le dérivé trifluorométhylé est obtenu avec 38% de rendement pour le **dia 1** et avec 8% de rendement pour le **dia 2**. Pour ce dernier, la purification a été fastidieuse justifiant ainsi les faibles rendements obtenus (Schéma 40).



Composés (8)	R	Temps (h)	*Rendement 7 (%)	
			Dia 1	Dia 2
a	H	23	53	9
b	Me	31	46	13
c	<i>t</i> -Bu	52	57	16
d	OMe	66	63	
e	F	31	44	19
f	CF ₃	23	38	8
g	NO ₂	22	64	12

(* rendements calculés par RMN ¹H).

Schéma 40 : Synthèse des dérivés du cyclocoumarol (7 a-g) à partir des warfarines correspondantes (8 a-g, 1 équiv., 100mg)

Les résultats obtenus par cyclisation au reflux ne font pas ressortir de modification significative de réactivité ou sélectivité en fonction du substituant R présent sur le noyau phényle.

Au vu des temps de réaction longs pour obtenir les dérivés de cyclocoumarol, un dernier essai a été réalisé sous micro-ondes en nous inspirant du protocole de Krstic et collaborateurs [272]. La réaction a été effectuée en présence de montmorillonite K-10, à 300 W, 65°C, pendant 5 min. L'analyse du suivi CCM a montré qu'au bout de 30 min de réaction, la conversion de la warfarine en cyclocoumarol est quasi-totale. Ici, pour des raisons de temps, la réaction n'a pas été traitée ni purifiée. En perspective, il serait intéressant, de mettre au point les conditions sous activation micro-ondes pour réaliser la synthèse des dérivés de cyclocoumarol à partir des wafarines correspondantes.

IV.3.1.3.3 Analyses RMN ^1H et caractérisations par rayons X

Le cyclocoumarol peut exister sous deux formes diastéréoisomériques (12*S*,14*S*)/(12*R*,14*R*) et (12*S*,14*R*)/(12*R*,14*S*). Valente et collaborateurs soulignent qu'en solution le cyclocoumarol peut exister en équilibre dynamique avec sa forme ouverte, la warfarine. Valente et collaborateurs [274] (Schéma 41).

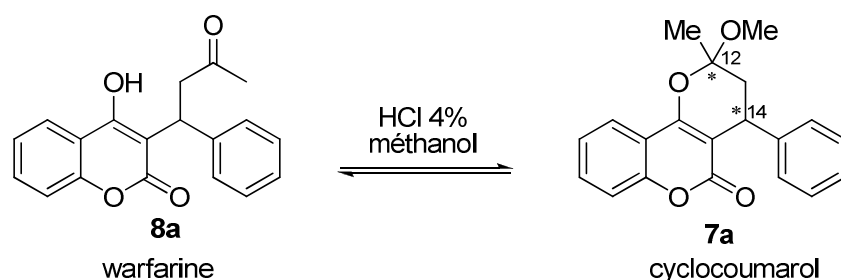


Schéma 41 : Les différentes formes tautomériques de la warfarine (forme ouverte et 2 diastéréoisomères cycliques)

Nous avons effectué une analyse par rayons X (Figure 38). Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature [274]. Dans le cas du diastéréoisomère minoritaire (**dia 2**), la forme diastéréoisomérique sous forme d'un couple d'énantiomères observée est : (12*S*,14*R*)/(12*R*,14*S*). A l'état solide le **dia 2** possède une conformation préférentielle sous forme de demi-chaîne dans laquelle les groupements phényle et méthoxy sont disposés en pseudoaxial et axial respectivement.

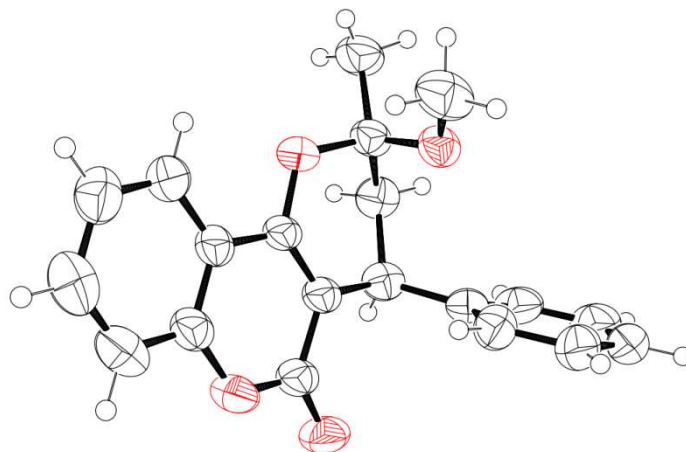


Figure 38 : Structure rayons X du diastéréoisomère minoritaire (H_{14eq}) du cyclocoumarol

L'existence de cette forme minoritaire peut s'expliquer par une stabilité relative d'un arrangement spatial inhabituel entre l'oxygène du groupement OMe de la fonction acétalique et le carbone 15 (2,923 Å). Ceci est le résultat d'interactions dipolaires entre les deux atomes d'oxygène lié au carbone 12, interactions que l'on peut comparer à l'effet anomérique présent dans la chimie des sucres (Figure 39) [274, 275].

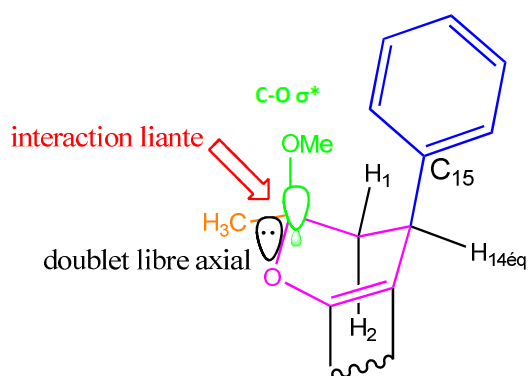


Figure 39 : Influence des oxygènes de la fonction acétal sur l'arrangement spatial du **dia 2** (adapté selon Clayden et collaborateurs [275])

Dans le cas du diastéréoisomère majoritaire (**dia 1**), nous observons les énantiomères (12*S*,14*S*)/(12*R*,14*R*). Parmi les conformations demi-chaises possibles, seule la structure dans laquelle les groupements phényle et méthyle sont positionnés en pseudoéquatorial et équatorial respectivement est cohérente avec la valeur des constantes de couplage calculées par RMN. A la différence du **dia 2**, aucune interaction particulière entre l'oxygène du groupement OMe de la fonction acétalique et le carbone 15 n'est observée. Cette conformation de demi-chaise s'explique en considérant les effets stériques et dipolaires.

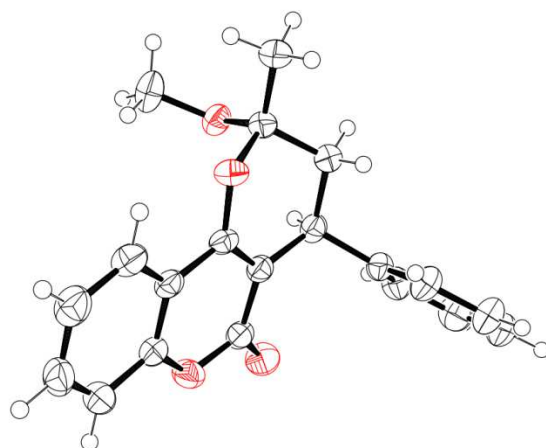
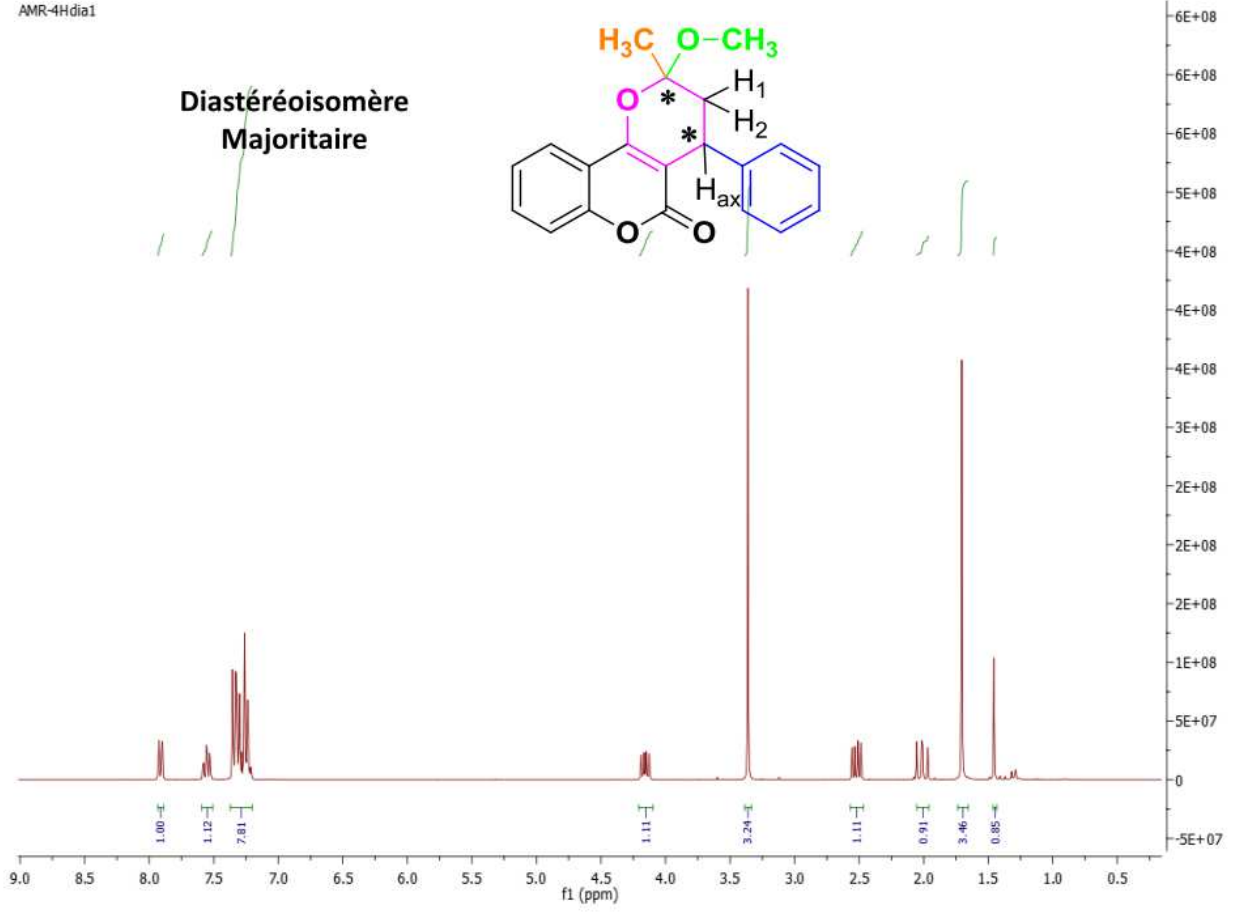
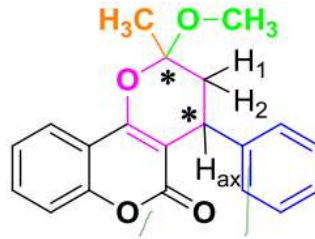


Figure 40 : Structure de rayons X du diastéréoisomère majoritaire (H_{14ax}) du cyclocoumarol

Le spectre RMN 1H de chacun de ces deux diastéréoisomères montre des déplacements chimiques caractéristiques, permettant de distinguer aisément la configuration de la forme majoritaire de celle minoritaire. Pour le diastéréoisomère majoritaire, l'analyse RMN du système ABX montre que les protons diastéréotopes H1 et H2 en position 13 couplent entre eux et chacun de ces protons couplent avec le proton benzylique en position 14 (H_{14ax} sera noté Hax). Chaque signal est donc représenté par un doublet de doublet. Avec un spectromètre de 350 MHz, le signal de H2 est caractérisé à 2,01 ppm . Ce proton couple avec H1 avec une constante de couplage de $J_{H2-H1} = 14,0$ Hz, et avec Hax avec une constante de couplage de $J_{H2-Hax} = 11,8$ Hz. Le proton H1 signalé à 2,52 ppm présente un couplage avec Hax ($J_{H1-Hax} = 6,9$ Hz.). Le proton benzylique présente un déplacement chimique de 4,16 ppm et couple avec les deux protons diastéréotopiques H1 et H2 ($J_{Hax-H1} = 6,9$ et $J_{Hax-H2} = 11,8$ Hz) (Schéma 42).

AMR-4Hdia1

Diastéréoisomère
Majoritaire



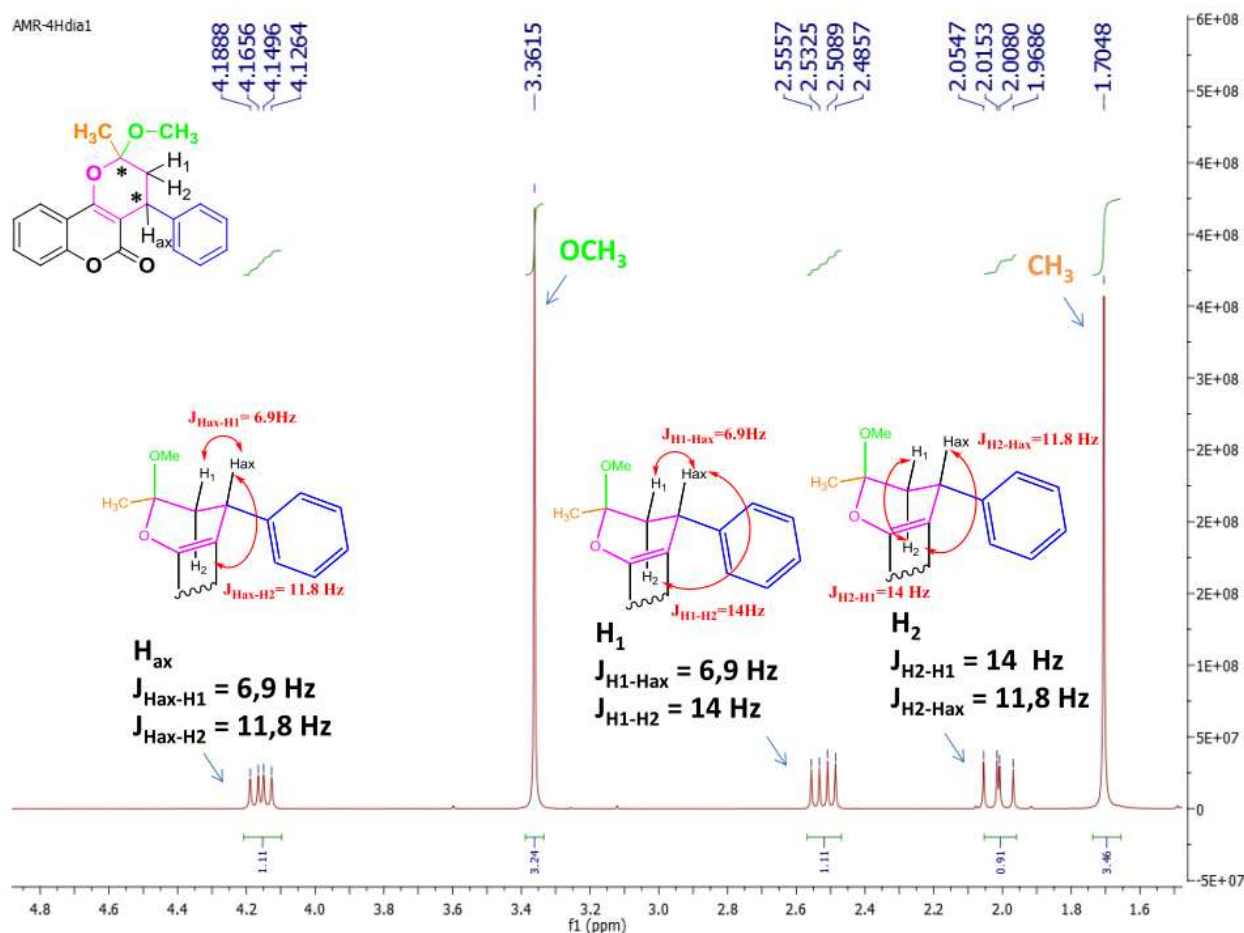
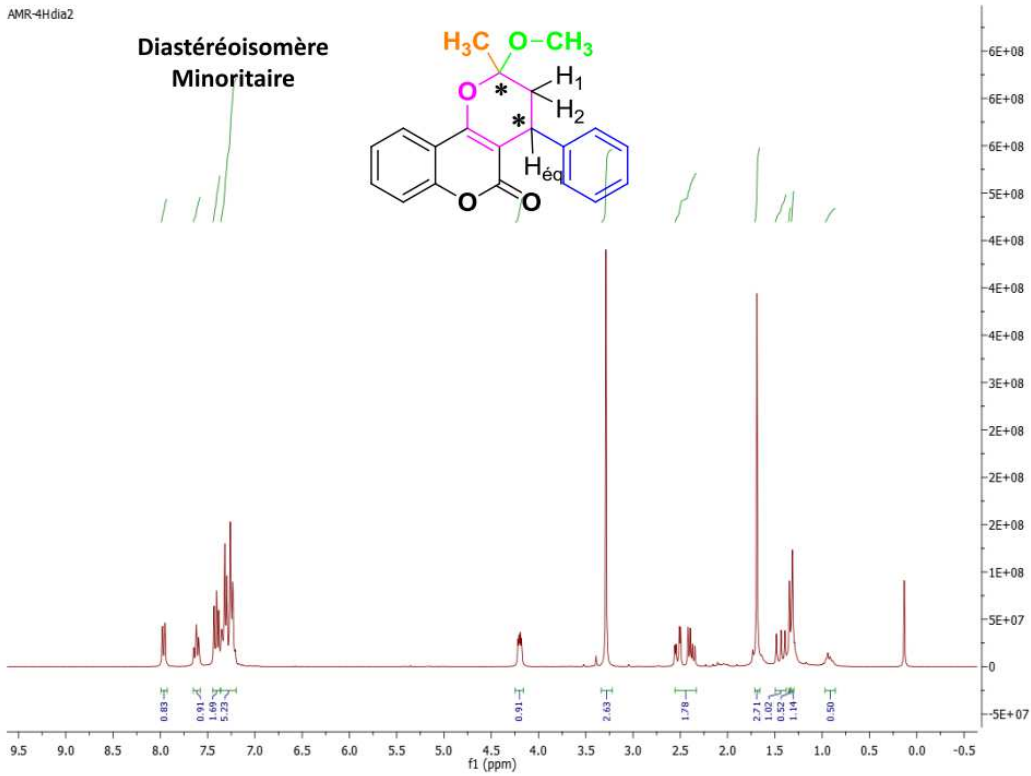


Schéma 42 : Spectre RMN ^1H du diastéréoisomère majoritaire du cyclocoumarol

Pour le diastéréoisomère minoritaire, les mêmes couplages sont retrouvés en considérant le proton benzylique en position équatoriale ($H_{1_{4eq}}$ sera noté H_{eq}). Le proton H_2 à 2,38 ppm couple avec H_1 avec une constante de couplage de $J_{H_2-H_1} = 14.0 \text{ Hz}$, et avec proton benzylique en équatorial avec une constante de couplage de $J_{H_2-H_{eq}} = 7.4 \text{ Hz}$. Le proton H_1 est signalé à 2,52 ppm présente un couplage avec H_{eq} ($J_{H_1-H_{eq}} = 3.8 \text{ Hz}$). Enfin, à 4,19 ppm, se trouve le signal du proton H_{eq} . Ce dernier couple avec les deux protons diastérotopes H_1 et H_2 ($J_{H_{eq}-H_1} = 3.7$ et $J_{H_{eq}-H_2} = 7.2 \text{ Hz}$) (Schéma 43).

AMR-4Hdia2

Diastéréoisomère
Minoritaire



AMR-4Hdia2

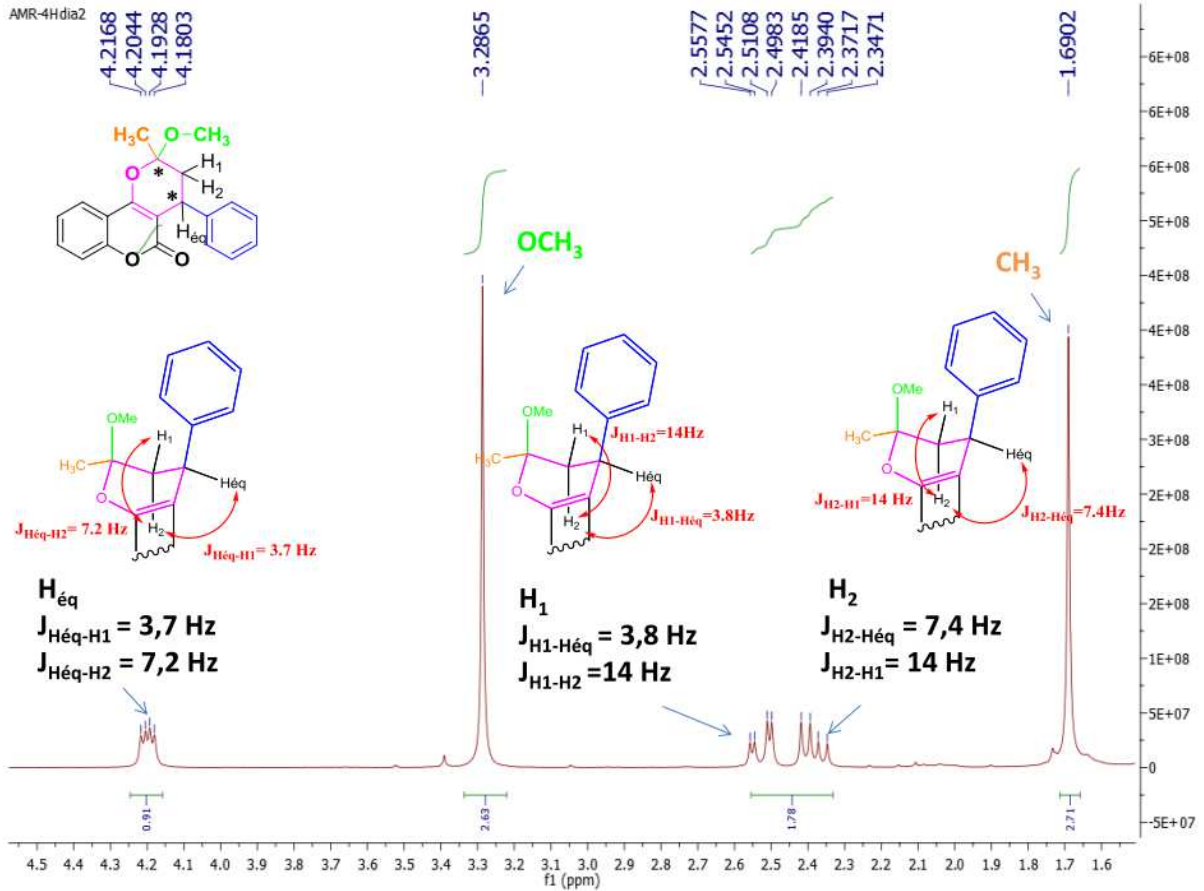


Schéma 43 : Spectre RMN ¹H du diastéréoisomère minoritaire du cyclocoumarol

Après avoir obtenu, les dérivés du cyclocoumarol, les diastéréoisomères majoritaires ont par la suite été testés biologiquement afin d'évaluer leur activité inhibitrice sur COX-2.

IV.3.2 Résultats des tests biologiques

Les études biologiques ont été réalisées dans l'équipe du Pr Bertrand Liagre à la Faculté de Pharmacie de Limoges, dans le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (EA 1069). Dans le cadre de ma thèse, l'activité inhibitrice sur COX-2 a été évaluée sur les diastéréoisomères majoritaires des analogues du cyclocoumarol synthétisés. Cette activité a été déterminée par inhibition de la production de PGE₂, la prostaglandine majoritairement surproduite en cas d'inflammation. Les résultats obtenus sont décrits dans la Figure 41 et le Tableau 13.

La synthèse de PGE₂ est évaluée après pré-traitement par les agents pharmacologiques à 10 μM pendant 2 h puis traitement par le LPS (10 ng/mL) pendant 24 h. Les cellules Raw 264.7 sontensemencées à 2.10⁵ cellules/puits pendant 24 h puis traitées comme décrit précédemment. Les taux de PGE₂ sont déterminés à partir des surnageants de culture à l'aide d'un kit EIA (Cayman Chemical). Les résultats sont exprimés par la moyenne ± l'écart type de 8 expériences indépendantes. Le NS-398, inhibiteur spécifique de la cyclooxygénase-2, a été utilisé comme molécule de référence [276].

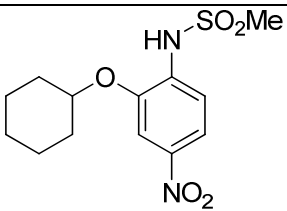
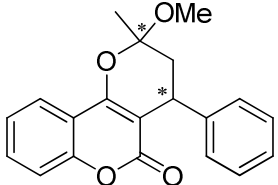
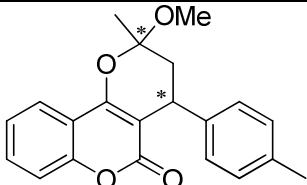
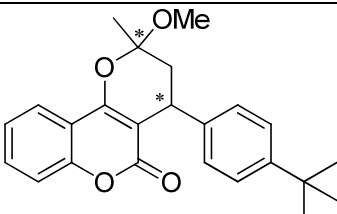
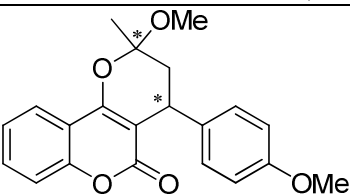
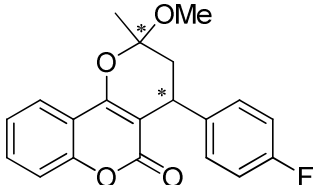
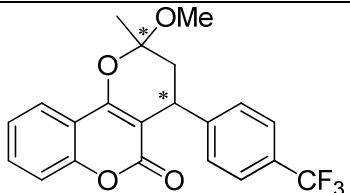
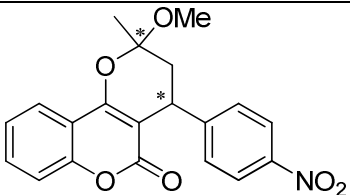
Composés	Structures	% inhibition de PGE ₂
NS-398		88
7a		50
7b		60
7c		52
7d		79
7e		48
7f		31
7g		0

Tableau 13 : Inhibition de la production de PGE₂ stimulée par le LPS par l'action d'agents pharmacologiques dans les cellules Raw 264.7

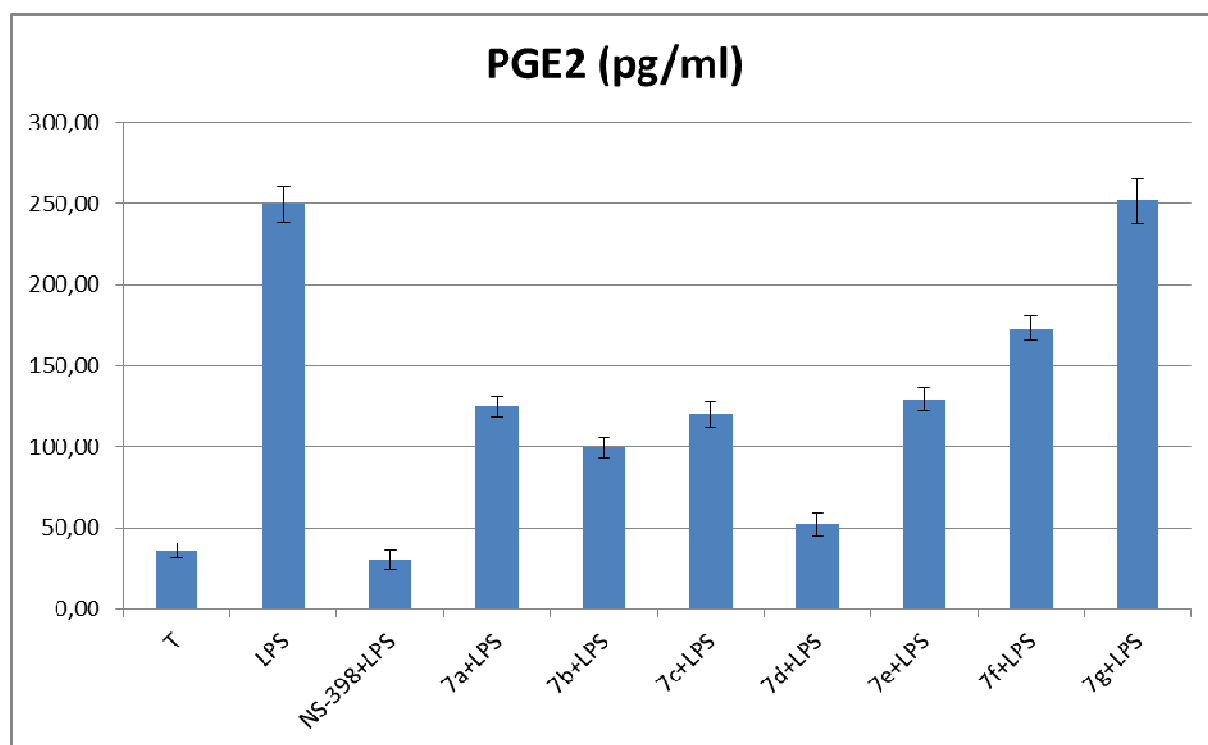


Figure 41 : Résultats obtenus lors de l'évaluation de l'inhibition sur COX-2 des analogues du cyclocoumarol synthétisés

Le composé présentant la plus forte inhibition de la synthèse de PGE₂ est le composé **7d** avec une inhibition de PGE₂ proche de la molécule de référence, **NS-398**. (79% et 88% d'inhibition respectivement). L'ensemble des molécules testées présente une activité inhibitrice de l'ordre de 50% d'inhibition (**7a**, **7b**, **7c**, **7e**). Le composé (**7f**) se révèle être un faible inhibiteur de COX-2 (31% d'inhibition) tandis que (**7g**) ne présente aucune inhibition sur la synthèse de PGE₂ (Tableau 13).

Après avoir déterminé l'effet inhibiteur sur COX-2, l'un des critères importants était d'évaluer la sélectivité COX-2 vis-à-vis de COX-1. En effet, des molécules non sélectives sont connues pour avoir des effets secondaires affectant notamment le système gastro-intestinal. Ainsi, le potentiel d'inhibition de COX-1 de nos composés a été testé (Figure 42) : pour cela aucune source d'inflammation (LPS) n'a été introduite dans le milieu permettant ainsi de mesurer le taux de production de la PGE₂ synthétisée par COX-1 et la conséquence sur la sélectivité (Figure 42). La synthèse de PGE₂ est évaluée après traitement par les agents pharmacologiques à 10 μM pendant 24 h en déprivation de sérum (1%) (activité COX-1). Les cellules Raw 264.7 sontensemencées à 2.10⁵ cellules/puits pendant 24 h puis traitées comme décrit précédemment. Les taux de PGE₂ sont déterminés à partir des

surnageants de culture à l'aide d'un kit EIA (Cayman Chemical). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart type de 6 expériences indépendantes (Figure 42).

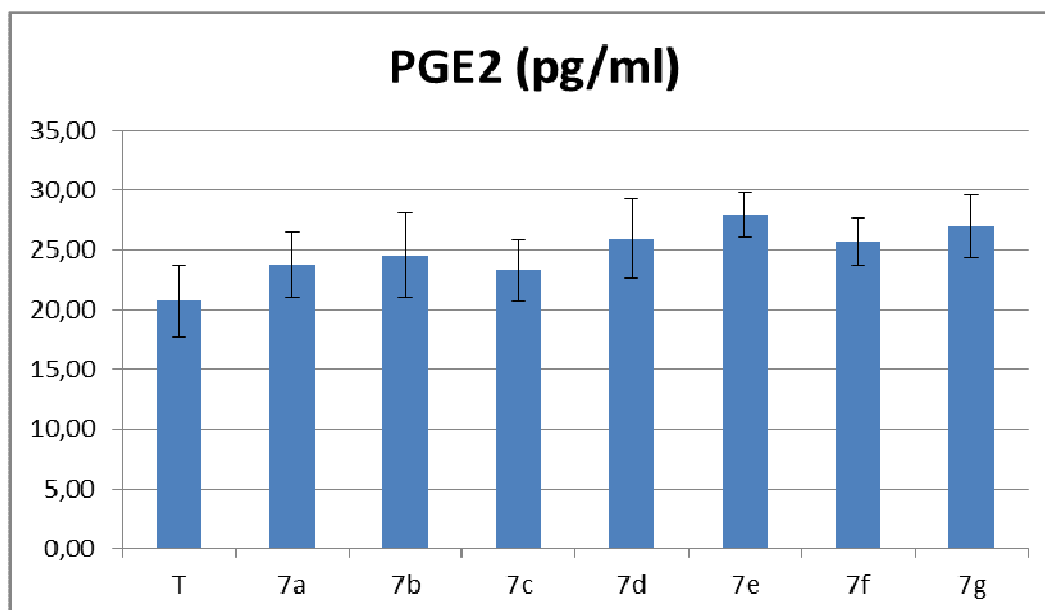


Figure 42 : Résultats obtenus lors de l'évaluation de la sélectivité de COX-2 vis-à-vis de COX-1

Les molécules testées ne démontrent aucune inhibition significative vis-à-vis de COX-1. Cela conforte les résultats obtenus précédemment et démontrent que le composé **7d** présente à la fois une bonne inhibition et une bonne sélectivité pour COX-2.

A partir de la molécule la plus prometteuse de la série (**7d**, cyclocoumarol méthoxylé) nous nous sommes ensuite intéressés au critère de dose-réponse dans l'idée de déterminer si la molécule présentait une inhibition de COX-2 plus importante en fonction de la concentration testée. Le composé (**7d**) a été testé à 4 doses différentes : 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M. (Figure 43) et le **NS-398** a été, une nouvelle fois, prise comme molécule de référence. La synthèse de PGE₂ est évaluée après pré-traitement par les agents pharmacologiques (1-20 μ M) pendant 2 h puis traitement par le LPS (10 ng/mL) pendant 24h. Les cellules Raw 264.7 sontensemencées à $2 \cdot 10^5$ cellules/puits pendant 24h puis traitées comme décrit précédemment. Les taux de PGE₂ sont déterminés à partir des surnageants de culture à l'aide d'un kit EIA (Cayman Chemical). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'écart type de 6 expériences indépendantes.

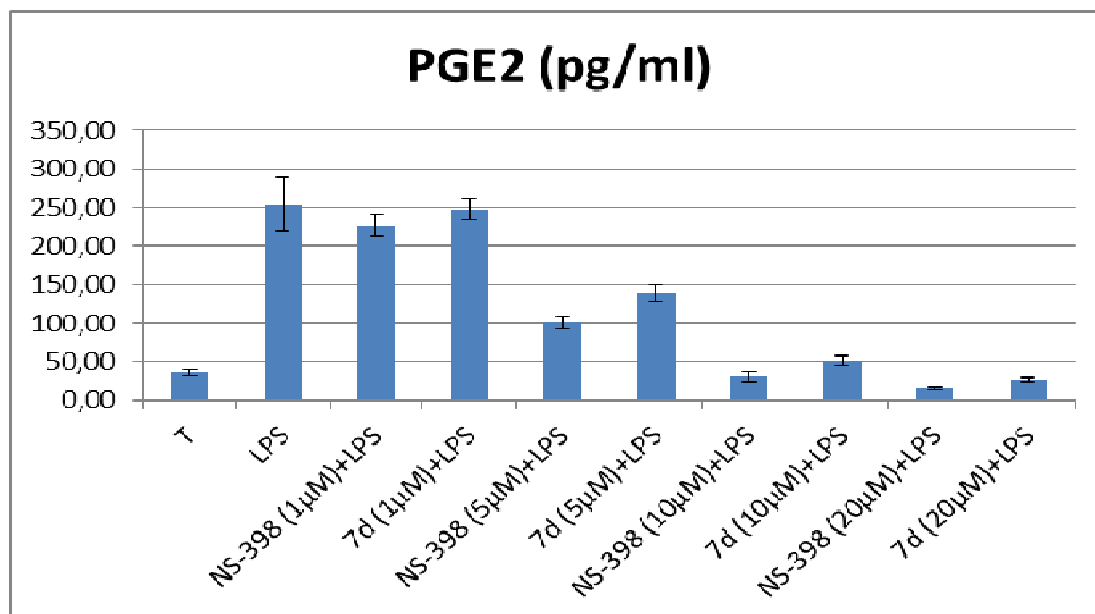


Figure 43 : Résultats obtenus pendant l'étude dose-effet

Quatre expériences aux concentrations différentes ont été menées (1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM). A 1 μM , on note une inhibition faible de 3 et 11% pour **7d** et **NS-398** respectivement. A 5 μM l'inhibition reste moyenne (45% et 61% pour **7d** et **NS-398** respectivement). A 10 et 20 μM l'inhibition est très intéressante : **7d** révèle une inhibition de 79% et 89% respectivement, tandis que **NS-398** démontre une inhibition de 88% à 10 μM et de 94% à 20 μM . Ainsi, à 20 μM , la molécule synthétisée **7d** révèle une inhibition proche de la molécule de référence. (Tableau 14). D'après ces expériences, il semble que **7d** présente une inhibition dose-dépendante.

Dose (μM)	% inhibition de PGE ₂	
	NS-398	7d
1	11,0	3,0
5	61	45
10	88	79
20	94	89

Tableau 14 : Inhibition de la production de PGE₂ stimulée par le LPS par l'action d'agents pharmacologiques dans les cellules Raw 264.7 à des doses différentes

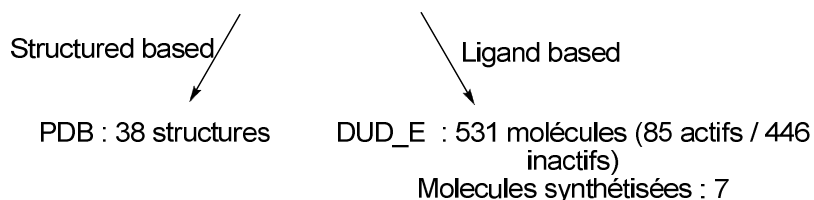
Les tests biologiques montrent que la plupart des molécules synthétisées possède une activité inhibitrice de COX-2 sans présenter une inhibition significative sur COX-1. Dans cette série, une molécule se détache tout particulièrement, le cyclocoumarol méthoxylé (**7d**), et se révèle être une nouvelle molécule sélective de COX-2 avec une inhibition dose-dépendante.

IV.3.3 Utilisation de la modélisation moléculaire pour guider la recherche d'inhibiteurs sélectifs de COX-2

La démarche adoptée suit les étapes décrites dans le schéma suivant (Schéma 44) :

1) Recherche des modes de liaisons des inhibiteurs sélectifs de COX-2 connus (PDB)

2) Génération de pharmacophores sélectifs de COX-2 (LigandScout)



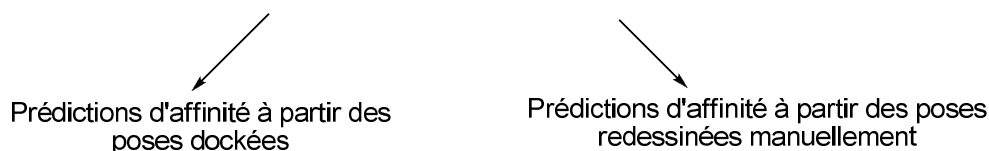
3) Docking (Surflex-Dock)

- Choix de la structure de COX-2
- Etudes des modes de liaisons des composés synthétisés

4) Prédiction d'affinité des composés synthétisés et nouvelles molécules potentiellement inhibitrices de COX-2 (SeeSAR)

- Composés synthétisés

2 approches ont été testées pour évaluer la capacité du logiciel à prédire les résultats obtenus par les tests biologiques



- Nouveaux composés

- Etude d'affinités de prédiction (SeeSAR)
- Etude des modes de liaisons (SeeSAR)
- Etude de la sélectivité (Pymol)
- Evaluation de la capacité de SeeSAR à prédire correctement les meilleures poses dockées

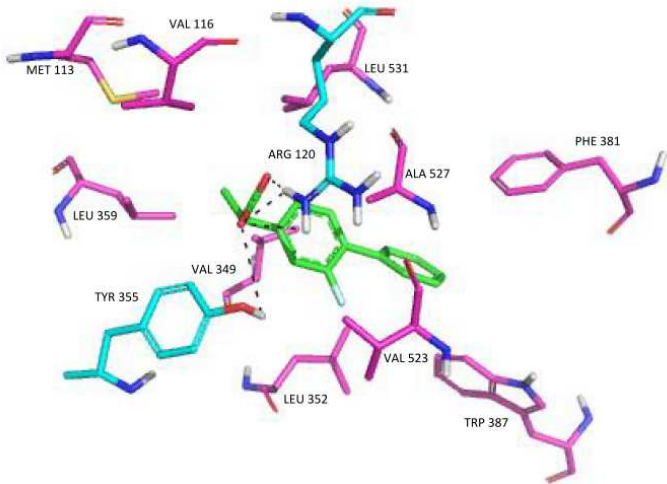
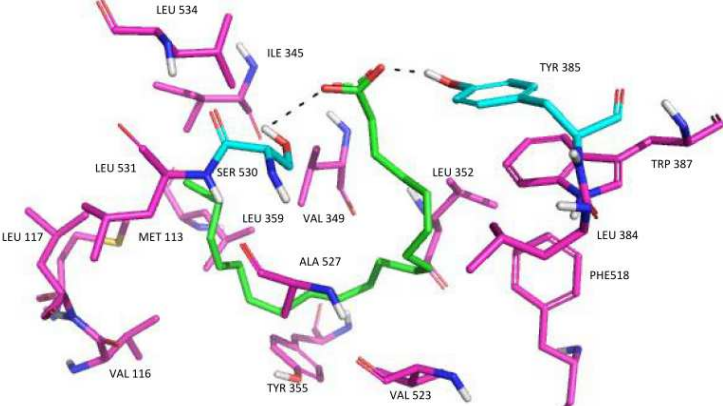
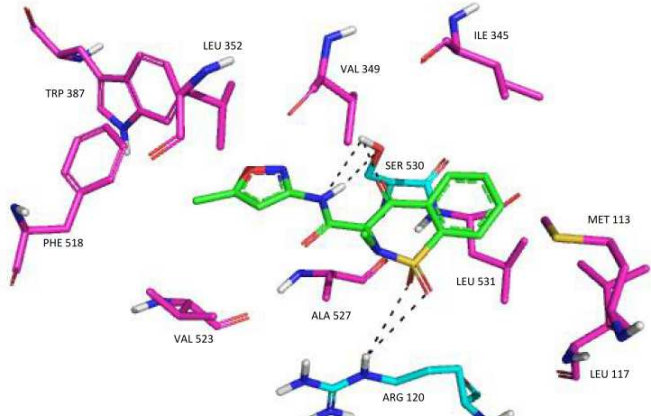
Schéma 44 : Les différentes étapes réalisées lors des études de modélisation moléculaire

IV.3.3.1 Détermination des modes de liaison des inhibiteurs connus de la COX-2

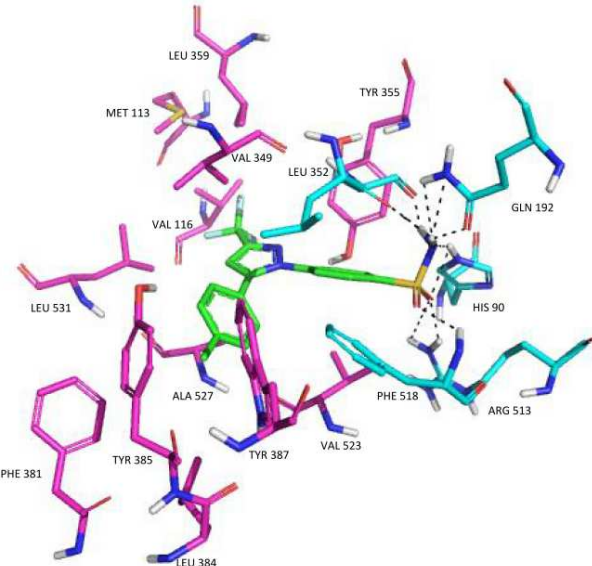
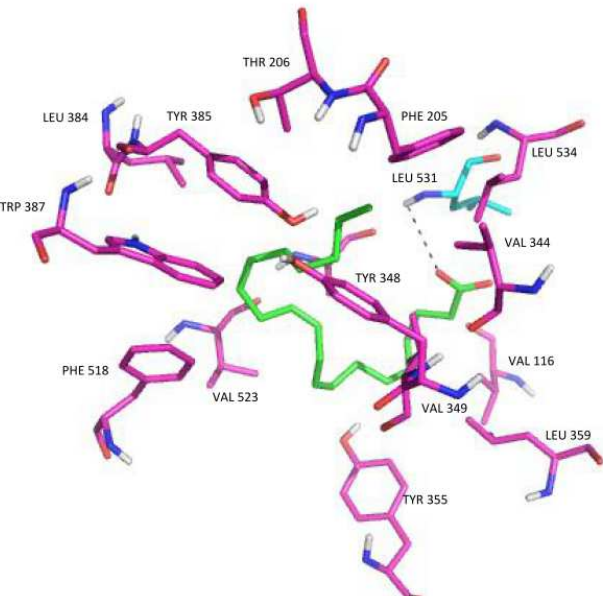
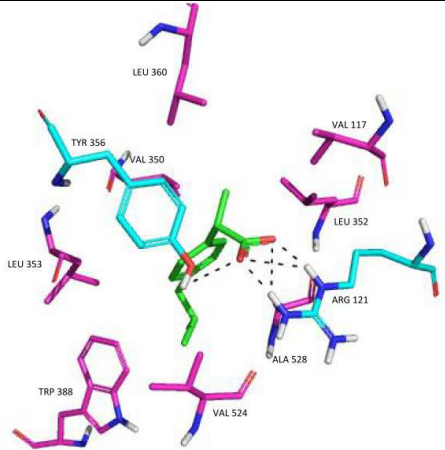
Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au mode de liaison des inhibiteurs connus de COX-2 dans le site actif de la protéine pour identifier les interactions importantes pouvant expliquer l'inhibition de l'activité de COX-2.

Pour cela, nous avons utilisé des structures de protéines co-cristallisées avec des inhibiteurs de COX-2. Ces structures sont disponibles dans la PDB (Protein Data Bank). La PDB contient 47 structures de COX-2 provenant de la souris (dont 3 apo : 5COX, 5FDQ, 4RRY) et 6 issues de l'homme (très récemment élucidées) (cf Tableau dans Partie expérimentale). Toutes les études décrites dans ce paragraphe ont été réalisées avant que les structures humaines ne soient disponibles, seuls les résultats des structures provenant de la souris seront donc présentés.

En utilisant les logiciels de visualisation Pymol et Chimera, nous avons identifié manuellement les acides aminés de la COX-2 impliqués dans des liaisons hydrogène avec les inhibiteurs. Parmi les acides aminés retrouvés lors de cette étude, certains avaient déjà été identifiés dans la littérature [35] par des études de mutagenèse dirigée. A partir des 38 structures, 10 modes de liaison distincts ont été mis en évidence. Et parmi ces 10 modes de liaison, 2 sont très largement majoritaires puisque partagés par respectivement 16 et 11 ligands. Le premier mode de liaison majoritaire est caractérisé par l'établissement de liaisons hydrogène ou électrostatiques avec les résidus Arg 120 et Tyr 355. Les ligands des structures 3PGH, 3HS7, 3KRK, 3NT1, 3NTB, 3MDL, 3OLU, 3QH0, 3QMO, 3Q7D, 3RR3, 3NTG, 4E1G, 4FM5, 4RSO et 4COX possèdent ce mode de liaison. Dans le second mode de liaison majoritaire, le ligand établit des liaisons hydrogène avec les résidus, Ser 530 et Tyr 385. Les ligands des structures de COX-2 1CVU, 1PXX, 3HS5, 3HS6, 3OLT, 3LN0, 3MQE, 4OTY, 4RRW, 4RRZ, 4RUT adoptent ce mode de liaison. De plus, les ligands des 6 structures de COX-2 humaines récemment élucidées présentent aussi ce mode de liaison. Par ailleurs, pour les 8 derniers modes de liaison mis en évidence, le nombre de ligands répondant à ces différents modes diminue significativement. En effet, il y a entre 1 à 3 ligands qui correspondent à ces modes de liaison (Tableau 15).

PDB	a.a. essentiels	Représentation des différentes modes de liaison
3PGH 3HS7 3KRK 3NT1 3NTB 3MDL 3OLU 3QH0 3QMO 3Q7D 3RR3 3NTG 4E1G 4FM5 4RSO 4COX	R120 et Y355 (liaisons H ou électrostatiques)	
1CVU 1PXX 3HS5 3HS6 3OLT 3LN0 3MQE 4OTY 4RRW 4RRZ 4RUT	S530 et Y385 (liaisons H)	
4M10 4M11 4ZOL	S530, R120 (liaisons H)	

<p>1CX2 6COX</p>	<p>H90 et R513 (liaisons H ou électrostatiques)</p>	
<p>1DDX</p>	<p>Y355, W387 (liaisons H)</p>	

<p>3LN1</p>	<p>H90, R513, S353, Q192, L352, F518 (liaisons H).</p>	
<p>3TZI</p>	<p>L531(liaisons H)</p>	
<p>4PH9</p>	<p>R121, Y356 (liaisons H)</p>	

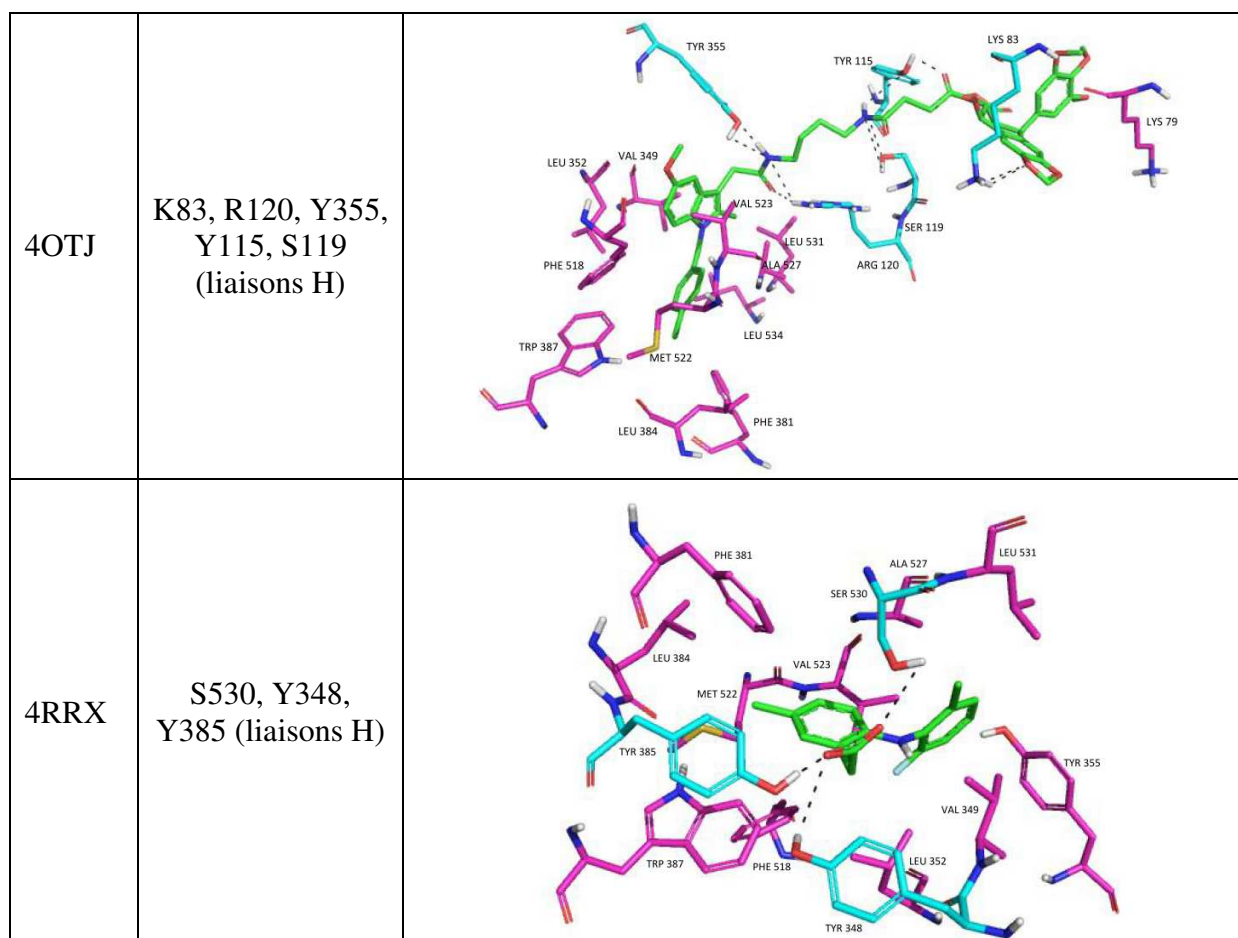


Tableau 15 : Les 10 modes de liaison des structures de COX-2 décrites dans la PDB. (rose : interactions hydrophobes, bleu : liaisons hydrogène)

IV.3.3.2 Génération des pharmacophores sélectifs de COX-2

IV.3.3.2.1 Littérature

A partir des molécules sélectives de COX-2 tels que le célécoxib et le rofécoxib des études *in silico* ont été menées dans le but d'identifier de nouvelles structures sélectives de COX-2. Parmi ces études, quelques modèles pharmacophoriques (sélectifs) de COX-2 ont été élucidés. Quelques exemples sont donnés par la suite.

Ainsi en 2006, Michaux et collaborateurs [277] élucident un pharmacophore sélectif de COX-2 en utilisant le logiciel Catalyst et la méthode « structure-based ». A partir de la structure de 16 composés co-cristallisés sélectifs de COX-2, un modèle pharmacophorique a été généré. Ce modèle est composé d'un HBA (A), 2 groupes hydrophobes (H) et d'un cycle aromatique (R) (Figure 44). De plus, 44 volumes d'exclusion ont été ajoutés représentant les acides aminés les plus représentatifs du site actif de COX-2. Un criblage virtuel contre la base de

Maybridge a identifié 300 hits. Après différents filtrages, notamment en utilisant des filtres ADME-Tox et des études de docking, 8 molécules ont été sélectionnées et testées biologiquement. Parmi ces 8 composés, 5 présentaient une activité intéressante.

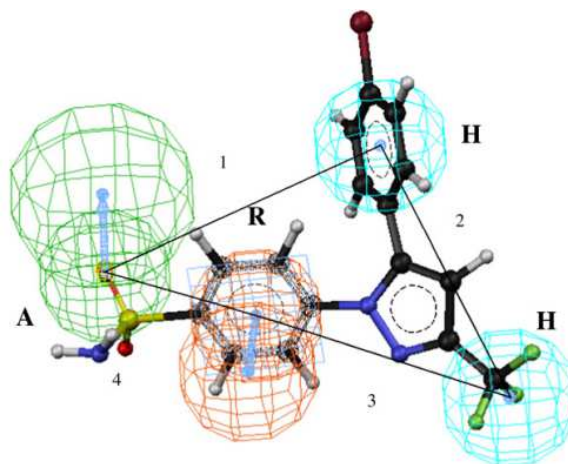
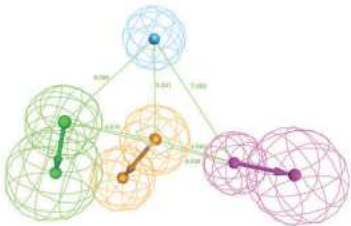
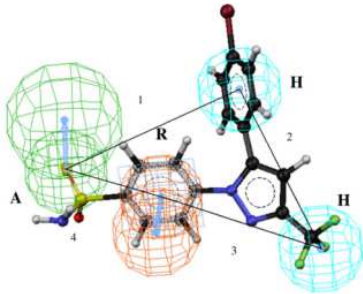


Figure 44 : Pharmacophore sélectif de COX-2 généré par Catalyst : en bleu, les groupements hydrophobes (H), en vert, les HBA (A) et en rouge le cycle aromatique (R) [277]

En 2014, Temml et collaborateurs [278] proposent des modèles pharmacophoriques « structure-based » non sélectifs de COX-1 et COX-2, générés avec LigandScout. En tout, 9 modèles pharmacophoriques pour COX-2 ont été générés, puis filtrés à l'aide d'inhibiteurs connus de COX-2 extraits de la DUD et de la ChEMBL pour ne conserver que 5 modèles pharmacophoriques. Après criblage virtuel et tests expérimentaux, 3 modèles pharmacophoriques non sélectifs de COX-2 ont été validés.

D'autres pharmacophores sélectifs de COX-2 ont été construits et décrits dans la littérature (Tableau 16).

Méthodes	Pharmacophores sélectifs de COX-2 (nb de points pharmacophoriques) Image et nb de points pharmacophoriques	Ligands	Logiciels	Résultats	Ref
Docking basé sur les pharmacophores et screening	Modèle pharmacophorique : 2HBD (violet), 2HBA (vert), 1H (bleu) et 1RA (orange) (image) 	24	Programme de génération de pharmacophores : HypoGen Base de données pour le screening : InterBioscreen synthetic Programmes de docking : CDOCKER, GOLD	4 composés intéressants révélés	[279]
Docking et pharmacophore énergétique (E-pharmacophore)	Modèle pharmacophorique : 1 charge negative, 2 cycles aromatiques	43	Génération de pharmacophores : Phase Docking : Glide Attribution d'une valeur énergétique à chaque point pharmacophorique	2 composés intéressants révélés	[280]
Pharmacophore à partir de composés connus (COX-2 inhibitors)	Modèle pharmacophorique : 3 groupes hydrophobes et 1HBA	4	Génération de pharmacophores : Catalyst Docking : DOCK 6.0	2 composés intéressants révélés	[281]
Pharmacophore à partir de composés connus (COX-2 inhibitors)	Modèle pharmacophorique : 1HBA (A), 2 groupes hydrophobes (H), 1 cycle aromatique (R) et 44 volumes d'exclusion, non représentés (image) 	16	Génération de pharmacophores : Catalyst Docking : GOLD Base de données pour le screening : Maybrigde	5 composés intéressants révélés	[277]

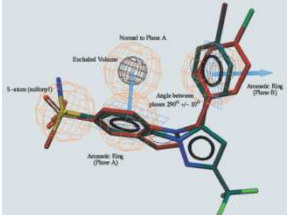
<p>Pharmacophore à partir de composés connus (COX-2 inhibitors)</p>	<p>Modèle pharmacophorique : 1 atome S (orange), 2 cycles aromatiques (orange), 1 volume exclusion (grise) (image)</p> 	<p>3</p>	<p>Génération de pharmacophores : Catalyst</p>	<p>1 composé intéressant révélé</p>	<p>[282]</p>
--	--	----------	--	---	--------------

Tableau 16 : Pharmacophores sélectifs de COX-2 décrits dans la littérature (étude exhaustive en utilisant les mots clés : « *selectives pharmacophores COX-2* », recherche Scifinder, 17/09/2016)

IV.3.3.2.2 Expériences réalisées

L'objectif de notre étude est de générer un ou plusieurs modèles pharmacophoriques sélectifs de COX-2 pouvant être utilisés en criblage virtuel dans le but de trouver de nouveaux composés potentiellement sélectifs de COX-2. De plus, ces pharmacophores peuvent nous permettre de déterminer si les composés synthétisés au laboratoire partagent un pharmacophore commun avec les inhibiteurs connus pour prédire leur potentiel d'inhibition de COX-2.

IV.3.3.2.2.1 « Structure-based »



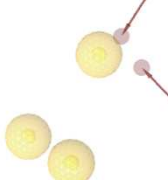




Dans un premier temps, en utilisant l'approche « structure-based » du logiciel LigandScout, nous avons généré les pharmacophores à partir de 38 structures de la PDB co-cristallisées avec des inhibiteurs.

Ils présentent entre 1 et 4 groupements hydrophobes, 1 et 2 groupements HBA et certains contiennent en plus 1 groupement NI ou 1 groupement HBD (voir Tableau 23 annexe). Ces pharmacophores ont été criblés contre la chimiothèque des molécules synthétisées. Malheureusement, aucune molécule synthétisée n'a été identifiée comme hit lors de ce criblage.

Ensuite ces pharmacophores ont été criblés avec la chimiothèque de la DUD_E afin de voir parmi les molécules « actives » (hautement sélectives) de cette base lesquelles répondaient aux pharmacophores de la PDB. Parmi les 38 pharmacophores générés, seuls 10

pharmacophores permettent de retrouver des inhibiteurs de COX-2 hautement sélectifs inclus dans la DUD_E (de 1 à 12 molécules selon le pharmacophore) (Tableau 17).

Parmi ces pharmacophores, 2 paires de modèles ont été réalisées à partir de structures co-cristallisées avec le même ligand : il s'agit des structures COX-2 4PH9 et 4RS0 d'une part, 1CX2 et 6COX d'autre part. De façon prévisible, les pharmacophores obtenus avec les structures 4PH9 (entrée 7) et 4RS0 (entrée 8) sont similaires et présentent les mêmes résultats lors du criblage virtuel. Cependant, les pharmacophores générés avec les structures 1CX2 (entrée 1 du tableau) et 6 COX (entrée 10) sont eux différents en terme de nombre d'HBA et d'HBD. Malgré cette différence, ces 2 pharmacophores obtiennent le même résultat en criblage virtuel en identifiant une même molécule (hautement sélective) de la DUD_E.

Entrée	Code PDB	Description	Représentation	Résultat du virtual screening
1	1CX2	5H, 3HBA		1/85
2	1DDX	2H, 1HBA		12/85
3	3MQE	3H, 2HBA		4/85
4	3QH0	1H, 1NI, 3HBA		3/85
5	4FM5	3H, 1NI, 3HBA		2/85
6	4OTJ	4H, 4HBA, 1HBD		1/85
7	4PH9	3H, 1NI, 3HBA		1/85





8	4RS0	3H, 1NI, 3HBA		1/85
9	4Z0L	(S) 3H, 2HBA		1/85
		(R) 3H, 3HBA		1/85
10	6COX	5H, 2HBA, 1HBD		1/85

Tableau 17 : Résultats du screening entre les pharmacophores des inhibiteurs de la COX-2 de la PDB qui partagent un pharmacophore commun avec les molécules sélectives de la DUD_E

(H : hydrophobe, HBA : accepteur de liaison hydrogène HBD : donneur de liaison hydrogène, NI : zone ionisable négative).

Le travail se basant sur la méthode « structure-based », nous a permis de construire 10 pharmacophores potentiellement sélectifs de COX-2. Toutefois, les résultats du criblage virtuel ne révèlent que très peu de molécules hautement sélectives de la DUD_E répondant à ces différents pharmacophores. Aucune molécule synthétisée ne correspond à l'un des 38 modèles pharmacophoriques issus de la PDB. Aussi, nous avons par la suite élaboré des pharmacophores avec la méthode « ligand-based ».

Résumé :

Génération de pharmacophores "structure-based" à partir des 38 structures de COX-2 issues de la PDB

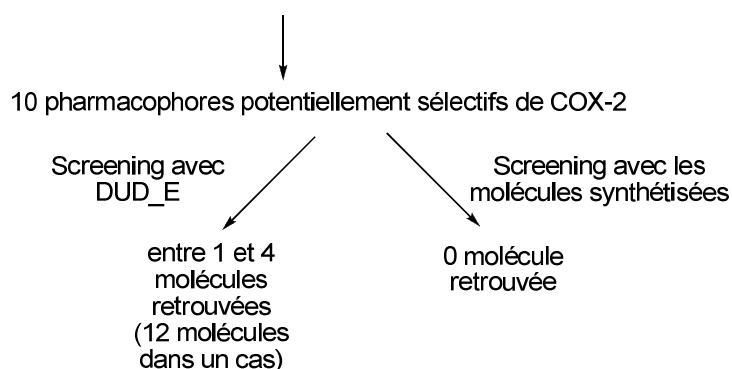


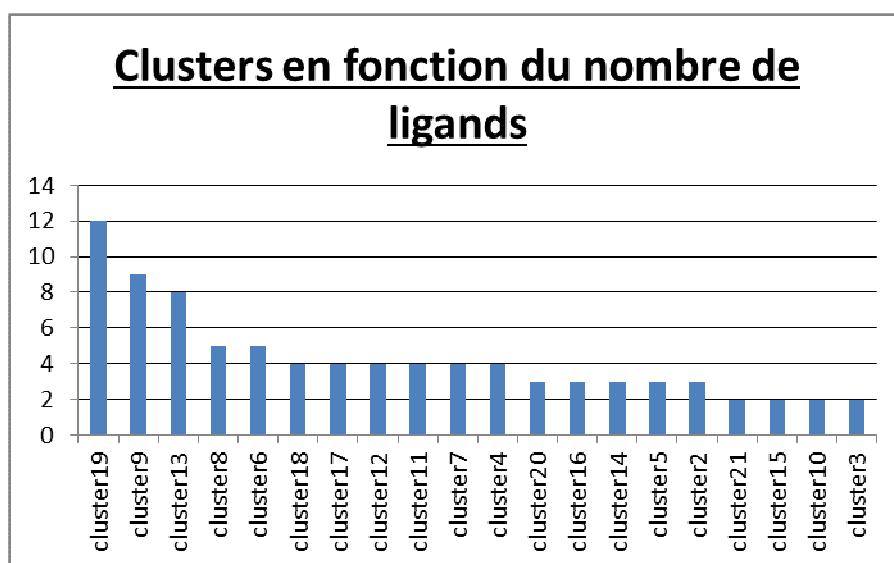
Schéma 45 : Résumé des résultats obtenus par la méthode « structure-based »

IV.3.3.2.2.2 « Ligand-based »

La méthode « ligand-based » permet, à partir de la structure d'un ensemble de ligands (notamment, ceux de la DUD_E et les molécules synthétisées), de générer des pharmacophores. Ces pharmacophores seront ensuite optimisés dans le but de construire des pharmacophores (hautement) sélectifs de COX-2.

Tout d'abord, nous avons voulu déterminer un ou plusieurs pharmacophores permettant de couvrir l'espace chimique représenté par les 85 ligands hautement sélectifs de COX-2 inclus dans la DUD_E (Tableau 24 annexe).

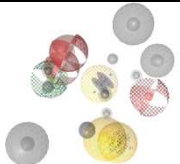
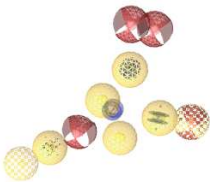

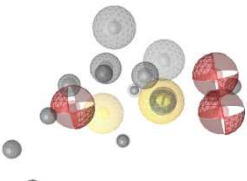
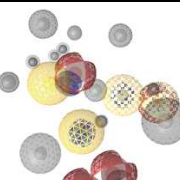
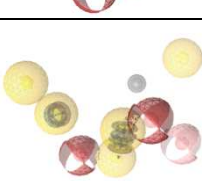
Etant donné la diversité structurale composant cette série, il était impossible de représenter les 85 ligands par un seul pharmacophore. Les ligands ont donc été divisés (voir partie expérimentale) en 21 clusters ; chaque cluster contenant entre 2 et 12 ligands sélectifs (Graphe 1). A noter que les clusters 1 et 2 contenant 1 ligand chacun ont été réunis en un seul cluster auquel a été ajouté un ligand du cluster 19 qui n'a pas pu être retrouvé lors de la construction du pharmacophore sélectif de ce cluster. Le cluster 2 contient donc 3 ligands et le nombre total de clusters est réduit à 20 (Graphe 1).

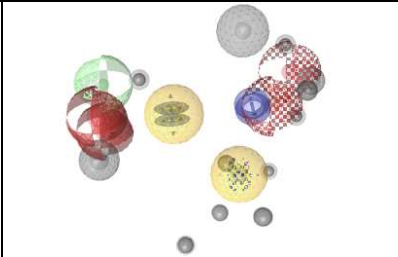
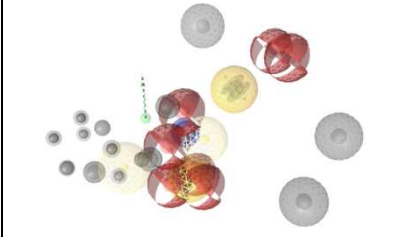

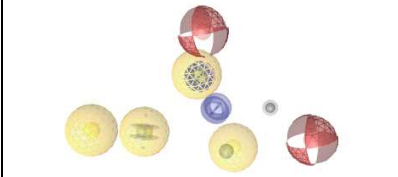
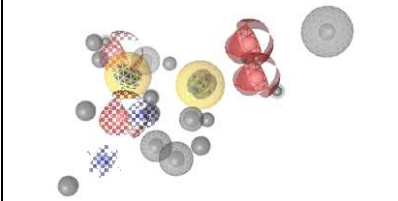

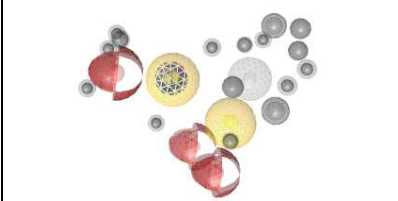
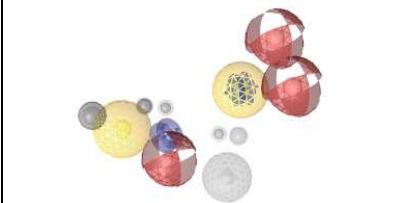


Grappe 1 : Nombre de ligands inclus dans chaque cluster

Ensuite un pharmacophore a été généré pour chaque cluster et criblé avec la chimiothèque de la DUD_E. L'option « merged pharmacophore » (M) a principalement été utilisée pour la construction des pharmacophores. Cependant lorsqu'après criblage plus d'un ligand constituant le cluster n'est pas retrouvé, l'option « shared pharmacophore » (S) a aussi été

utilisée. De plus, les pharmacophores ont été optimisés manuellement comme décrit dans la littérature [283, 284] (ajout de volume d'exclusion ajout ou retrait de points pharmacophoriques ajout ou retrait de points pharmacophoriques optionnels ...) pour qu'ils ne reconnaissent que des inhibiteurs hautement sélectifs de la COX-2 inclus dans la base de données de la DUD_E (Tableau 18).

Entrée	Cluster	M ou S	Description du pharmacophore	Représentation	Nb de hits
1	Cluster_2	M	1H opt, 2H, 1Ar, 1Ar opt, 1HBA opt, 2HBA, 1HBD opt, 10 exc vol		3
2	Cluster_3	M	4H, 1H opt, 1H, 1H opt, 3Ar, 1Ar opt, 1HBA, 1HBA opt, 2 HBA		2
3	Cluster_4	M	3H, 2H dis, 1Ar, 1Ar dis, 1Ar, 3HBA, 1HBD opt, 5 exc vol		4
4	Cluster_5	S	2H, 1Ar, 3HBA, 13 exc vol		3
5	Cluster_6	M	1H, 1H opt, 1H, 1H opt, 1Ar, 1Ar opt, 1Ar, 1HBA opt, 2HBA, 13 exc vol		5
6	Cluster_7	S	5H, 3Ar, 2HBA, 1HBA dis, 1 exc vol		4

7	Cluster_8	M	2H, 2Ar, 1Ar opt, 2HBA opt, 2HBA, 1HBD dis, 12 exc vol		5
8	Cluster_9	M	1H opt, 2H, 1H opt, 2Ar, 7HBA, 1HBD opt, 14 exc vol		9
9	Cluster_10	S	3H, 2H dis, 2Ar dis, 1Ar, 1HBA, 2HBA dis, 5 exc vol		2
10	Cluster_11	S	4H, 1Ar, 1Ar dis, 1Ar, 2HBA, 2exc vol		4
11	Cluster_12	M	2H, 2Ar, 2Ar opt, 2HBA opt, 2HBA, 18 exc vol		4
12	Cluster_13	S	1H, 3Ar, 4HBA, 7 exc vol		8
13	Cluster_14	S	2H, 1Ar, 3HBA, 17 exc vol		3
14	Cluster_15	S	2H, 2Ar, 3HBA, 6exc vol		2


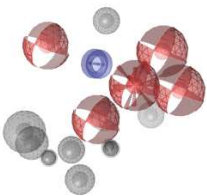
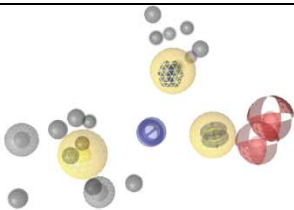
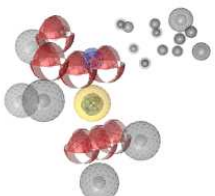
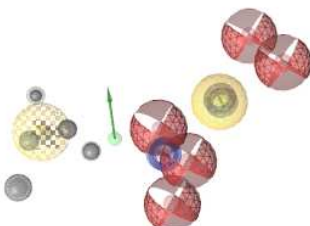
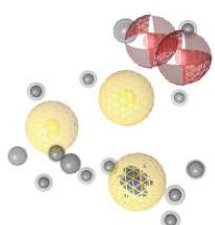
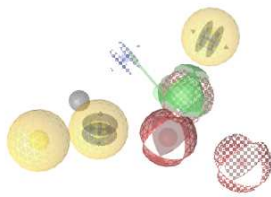
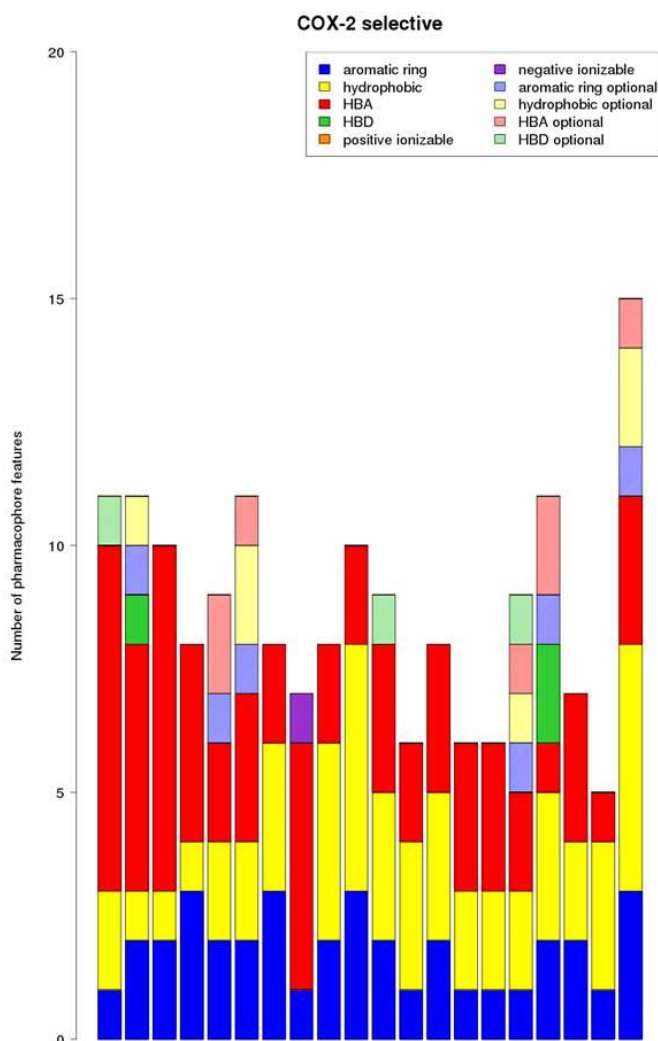
15	Cluster_16	S	3H, 2Ar, 1Ar dis, 3HBA, 14 exc vol		3
16	Cluster_17	S	1NI, 1Ar, 5HBA, 10 exc vol		4
17	Cluster_18	S	3H, 3Ar, 2HBA, 17 exc vol		4
18	Cluster_19 *	M	1H, 2Ar, 7HBA, 18exc vol		8
19	Cluster_19 *	M	1H, 1H opt, 2Ar, 1Ar opt, 5HBA, 1HBD, 5 exc vol		9
20	Cluster_20	S	3H, 1Ar, 2HBA, 15 exc vol		3
21	Cluster_21	M	3H, 1Ar opt, 2Ar, 1HBA, 2HBA opt, 1HBD dis, 1HBD, 1 exc vol		2

Tableau 18 : Description des pharmacophores générés pour chaque cluster

(H : hydrophobe, Ar : cycle aromatique, HBA : accepteur de liaison hydrogène, HBD : donneur de liaison hydrogène, opt : optionnel, exc vol : volume de sphère d'exclusion, M : « merged pharmacophore », S : « shared pharmacophore »* : pour le cluster_19, la construction de 2 pharmacophores a été nécessaire pour retrouver 11/12 des ligands constituant ce cluster).

Ainsi 21 pharmacophores hautement sélectifs de COX-2 ont été élucidés chacun contenant entre 6 et 14 points pharmacophoriques et 0 à 18 sphères de volume d'exclusion. Parmi ces pharmacophores certains retrouvent des ligands aussi identifiés par d'autres pharmacophores générés par d'autres clusters. C'est le cas du pharmacophore généré pour le cluster_12 qui est dit redondant car il ne retrouve que des ligands identifiés avec d'autres pharmacophores et peut donc être éliminé. Au total, ce sont 20 pharmacophores sélectifs de COX-2 qui sont conservés (Graphe 2).



Graphe 2 : Histogramme décrivant chaque pharmacophore sélectif de COX-2 élucidé. Chaque barre indique le nombre et la nature des points pharmacophoriques constituant un pharmacophore, les sphères de volume d'exclusion ne sont pas représentées

Ces 20 pharmacophores sélectifs de COX-2 ont été criblés avec les molécules synthétisées au laboratoire. Malheureusement aucune molécule synthétisée au laboratoire n'est retrouvée comme hit lors de ce criblage ce qui signifie qu'aucune molécule ne répond aux critères de

ces pharmacophores sélectifs. Cependant il faut rappeler que ces pharmacophores ont été construits à partir de molécules hautement sélectives (ratio d' $IC_{50} > 1000$). Aussi, d'autres études prenant en compte un critère de sélectivité moins élevé (ex : $IC_{50} < 100$; $100 \leq IC_{50} \leq 500$; $500 \leq IC_{50} < 1000$) seraient intéressantes à réaliser dans le but de construire des modèles pharmacophoriques moins sélectifs et de voir si les molécules synthétisées répondent à ces pharmacophores.

L'approche inverse a aussi été étudiée en construisant le pharmacophore des dérivés du cyclocoumarol. Ce modèle est constitué de 1 groupement hydrophobe (1H), d'un groupement contenant un cycle aromatique (1Ar) et de 3 groupements accepteurs de liaisons hydrogènes (3HBA) (Figure 45). Ce pharmacophore a ensuite été criblé contre les bases de données des ligands de la PDB et des inhibiteurs inclus dans la DUD_E. Aucun hit n'a été identifié pour les inhibiteurs de COX-2 du jeu de données PDB mais 33 molécules de la DUD_E répondent aux critères du pharmacophore des molécules synthétisées. Parmi celles-ci 8 sont hautement sélectives (> 1000), 8 autres présentent une sélectivité comprise entre $100 \leq \text{ratio } IC_{50} < 500$ et 17 molécules ont une sélectivité < 100 (Tableau 25 en annexe).

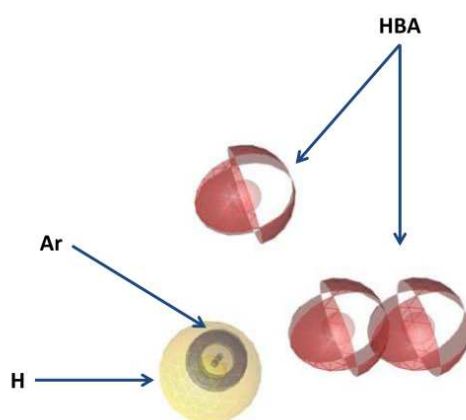


Figure 45 : Pharmacophore des dérivés du cyclocoumarol

Ainsi ce travail nous a permis d'élaborer d'une part, 20 pharmacophores hautement sélectifs de COX-2 et d'autre part un pharmacophore dérivant des molécules synthétisées au laboratoire.

Avec le modèle pharmacophorique issu des dérivés du cyclocoumarol, les résultats du criblage des ligands de la DUD_E nous confortent dans l'idée que les molécules synthétisées

pourraient être des inhibiteurs sélectifs potentiels de COX-2 ; résultats ensuite confirmés par les tests biologiques.

Résumé :

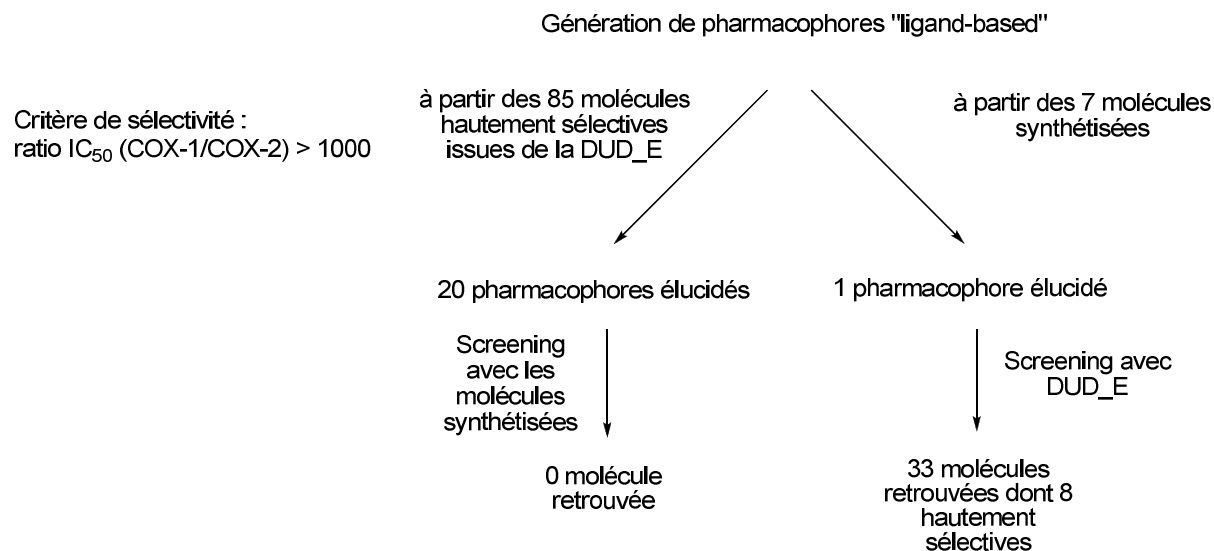


Schéma 46 : Résumé des résultats obtenus par la méthode « ligand-based »

IV.3.3.3 Etudes de docking

IV.3.3.3.1 Choix de la structure COX-2

Après avoir étudié les différents types d'interactions importantes pour l'inhibition de COX-2 et élucidé divers modèles pharmacophoriques sélectifs, nous nous sommes demandé si les dérivés du cyclocoumarol étaient capables de se lier dans le site actif de COX-2 et quelles interactions pourraient s'y établir. Pour cela, nous avons réalisé une étude de docking (logiciel Surflex-Dock).

Dans un premier temps, il a fallu déterminer une structure de COX-2 de la PDB qui sera utilisée pour réaliser le docking avec le cyclocoumarol. Pour des raisons de temps de calcul, nous n'avons pas réalisé le docking sur chacune des structures de la PDB. De plus, des travaux antérieurs au laboratoire ont montré que les performances de docking obtenues avec une structure bien choisie étaient similaires à celles obtenues avec un ensemble de structures [285]. Pour choisir la structure de la protéine de départ, nous avons recherché les ligands de la PDB structurellement similaires au cyclocoumarol, et plus particulièrement des ligands contenant un cycle coumarin ou un bioisostère de cette structure. Après inspection visuelle, les ligands de la PDB qui ressemblent à la structure de la coumarine portent soit un noyau

benzopyrane (3NTG, 3MQE et 3LN0) soit un noyau naphthalène (3Q7D et 3NT1). Nous avons ajouté une 6^{ème} structure, 1CX2, précédemment étudiée au laboratoire [285] et décrite dans la littérature en tant qu'inhibiteur sélectif de COX-2 (Figure 46).

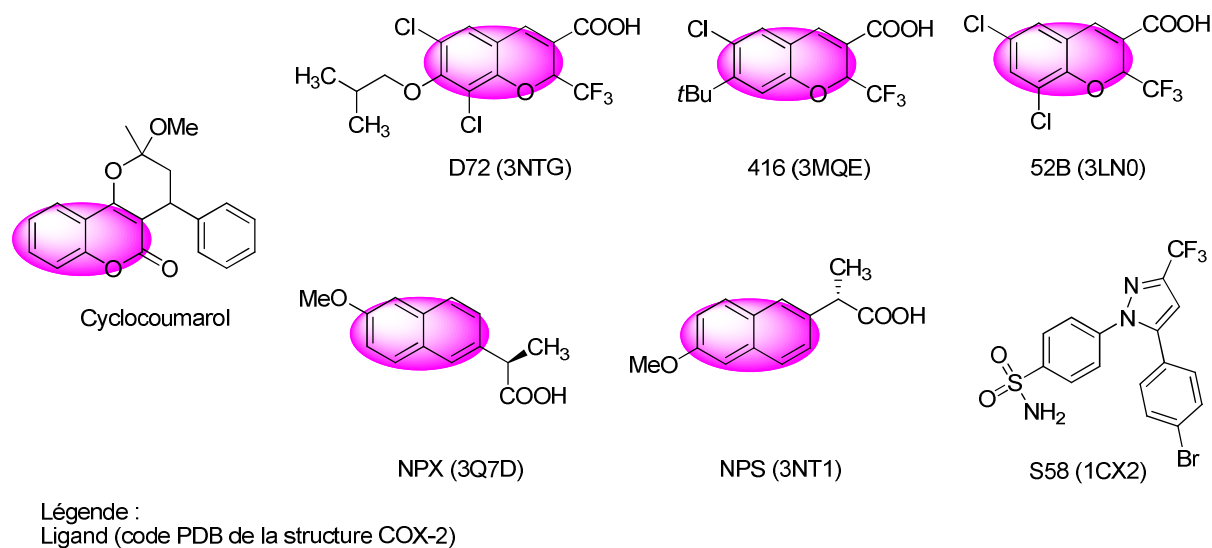


Figure 46 : Structure chimique des ligands D72 (3NTG), 416 (3MQE), 52B (3LN0), NPX (3Q7D), NPS (3NT1) portant deux cycles à 6 chaînons fusionnés, S58 (1CX2), décrits dans la PDB et le cyclocoumarol

Une étude de docking préliminaire a donc été réalisée (logiciel Surflex-Dock) avec ces 6 structures et leurs ligands co-cristallisés respectifs afin d'évaluer la capacité du logiciel à retrouver la pose cristallisée. Ceci permet de s'assurer de la capacité du logiciel à prédire correctement les modes de liaison et ainsi d'accorder une plus grande confiance aux prédictions obtenues lors de l'étude prospective.

Après avoir réalisé ce travail et analysé les 20 poses pour chaque structure il en résulte que pour seulement 2 structures 1CX2 et 3LN0, le logiciel de docking a été capable de retrouver la pose cristallisée. Ces 2 structures ont donc été sélectionnées (Figure 47).

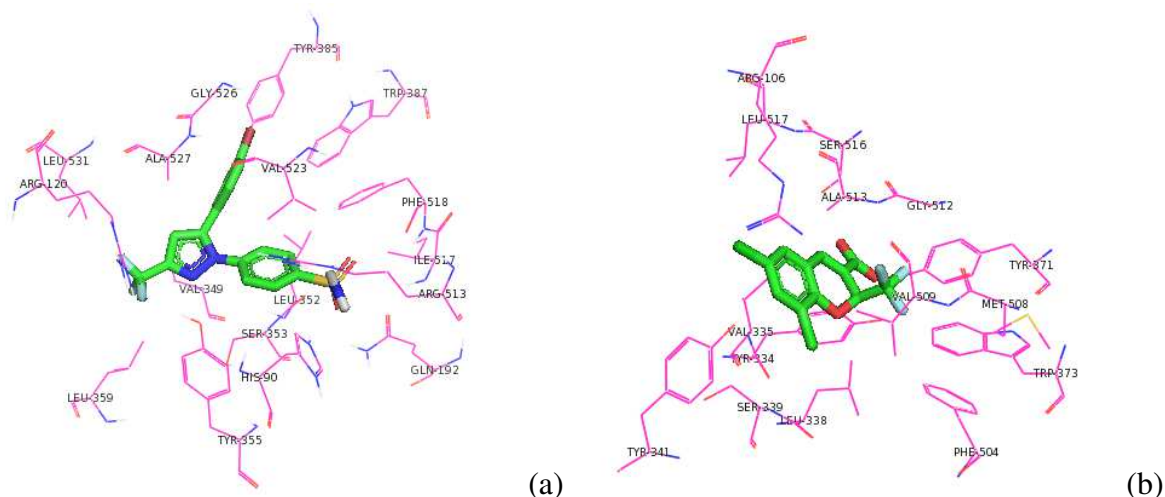


Figure 47 : (a) : Site actif de la structure 1CX2 avec son ligand S58 (vert), (b) site actif de la structure 3LN0 avec son ligand 52B (vert)

Pour sélectionner parmi ces 2 structures laquelle sera retenue, un deuxième docking, cette fois du cyclocoumarol, a été réalisé dans chacune des 2 structures 1CX2 et 3LN0. Parmi les 20 nouvelles poses générées pour chaque structure, la première pose (c'est-à-dire celle présentant le meilleur score de docking) a été importée dans SeeSAR avec la structure PDB dans lequel le docking a été réalisé. A partir de cette conformation dockée du cyclocoumarol, les composés synthétisés au laboratoire ont été redessinés manuellement. L'affinité pour COX-2 de chaque analogue du cyclocoumarol redessiné manuellement a été prédite par SeeSAR. L'objectif était d'évaluer la capacité de prédiction du logiciel en comparant les résultats prédits aux résultats biologiques obtenus expérimentalement. La structure 3LN0 semble donner les résultats de prédiction les plus pertinents puisque pour 6 molécules sur 7, la tendance de prédiction correspond à celle des résultats biologiques obtenus. Seule l'activité de l'analogue méthoxylé ne suit pas cette tendance. Dans le cas de la structure 1CX2, les prédictions d'affinité ne sont pas en accord avec les résultats expérimentaux : nous avons observé des clashes stériques avec les molécules nitrée et *tert*-butylée et les activités prédites sont de l'ordre du μM - mM (vs nM - μM avec 3LN0).

Pour la suite, la structure 3LN0 a donc été sélectionnée pour réaliser les études de docking avec le cyclocoumarol et ses dérivés synthétisés (Schéma 47).

Résumé :

Choix de la structure COX-2 utilisée comme référence pour réaliser le docking

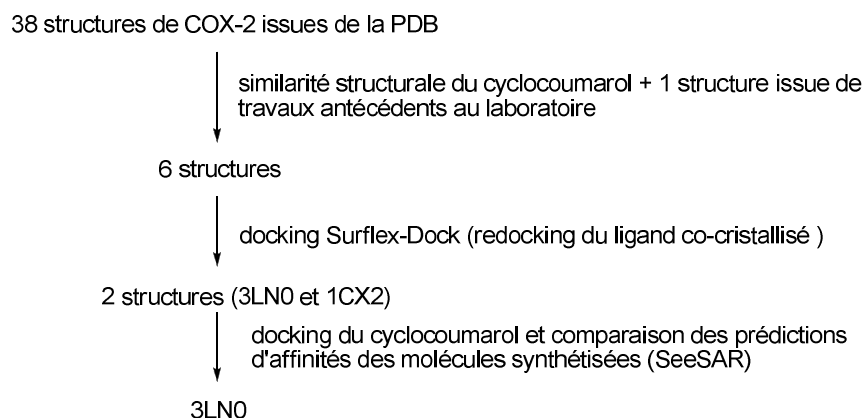


Schéma 47 : Résumé de la démarche permettant de sélectionner la structure de COX-2 qui sera utilisée pour réaliser les études de docking

IV.3.3.3.2 Etude des modes de liaison des dérivés du cyclocoumarol

Après avoir réalisé le docking du cyclocoumarol et de ses dérivés synthétisés au laboratoire, les 20 poses de chaque composé ont été analysées dans le but de rechercher les interactions importantes potentielles entre le composé et le site de liaison de la COX-2 (Tableau 19).

Un exemple de la première pose parmi les 20 générées pour le cyclocoumarol (Figure 48, A) et le 4-OMe cyclocoumarol (Figure 48, B) est représenté ci-dessous.

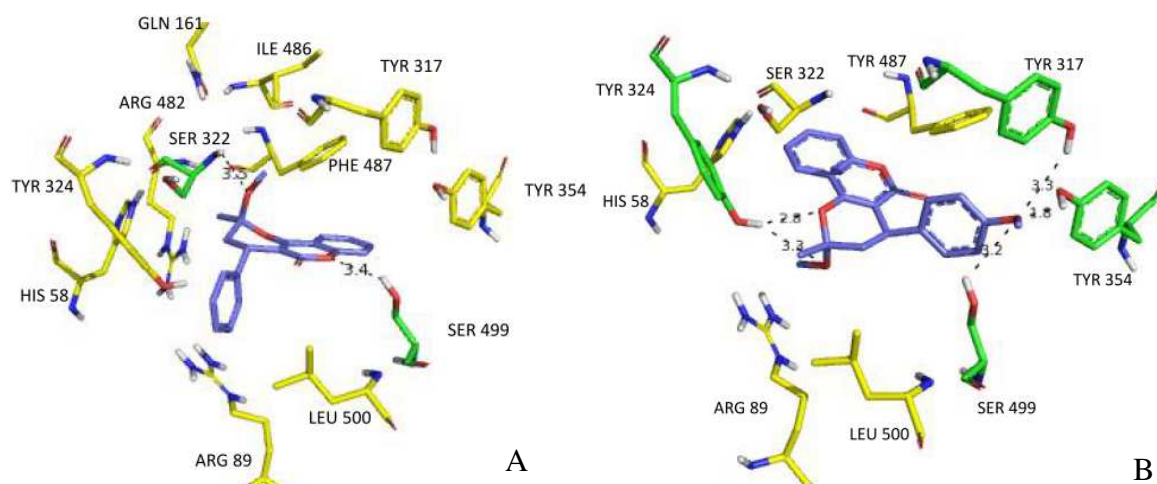


Figure 48 : Représentation des interactions les plus importantes de la première des 20 poses du cyclocoumarol (A) et du 4-Ome cyclocoumarol (B) dans le site actif de COX-2 (structure 3LN0)

(En vert, les acides aminés (Ser 499, Ser 322, Tyr 324, Tyr 317 et Tyr 354) réalisant des liaisons hydrogène avec le cyclocoumarol (violet) et en jaune les principaux acides aminés qui réalisent des interactions hydrophobes).

Ce travail a montré que les dérivés du cyclocoumarol peuvent se lier dans le site actif de COX-2 avec un certain nombre d'acides aminés selon la pose considérée. Ainsi, lorsque le cyclocoumarol est nu (4-H), 3 principaux résidus (Ser 499, Ser 322 et Tyr 324) stabilisent la molécule dans le site actif de COX-2 via des liaisons hydrogène. Ces liaisons se réalisent principalement autour de la fonction lactone et du groupement méthoxy de la molécule (Figure 48, A).

Pour le groupement trifluorométhyle, seule 1 liaison hydrogène est observée. Cette liaison s'établit soit avec la Ser 499 et la fonction lactone de la molécule, soit avec la Tyr 324 qui interagit avec le groupement méthoxy de la molécule. La différence du nombre de liaisons hydrogène entre la molécule nue et la molécule substituée par un groupement électroattracteur peut éventuellement expliquer les résultats biologiques obtenus. En effet, le cyclocoumarol présente une inhibition de la synthèse de PGE₂ de 50% tandis que son analogue trifluorométhylé démontre une activité inhibitrice de 30% (Figure 49, C).

Néanmoins, pour le cas du dérivé nitré, 9 acides aminés (Ser 322, His 58, Phe 487, Tyr 324, Arg 482, Leu 321, Ile 486, Arg 89 et Ser 499) entourent la molécule et participent à l'établissement de 2 à 7 liaisons hydrogène selon les poses considérées. Ces résidus peuvent

interagir avec la fonction lactone et le groupement méthoxy de la molécule, mais la grande majorité de ces résidus (5 résidus sur 9) encadrent le groupement nitro. Dans le cas du nitro, ce n'est donc pas le nombre de liaisons hydrogène qui explique la totale inactivité de ce composé lors des tests biologiques (Figure 49, D).

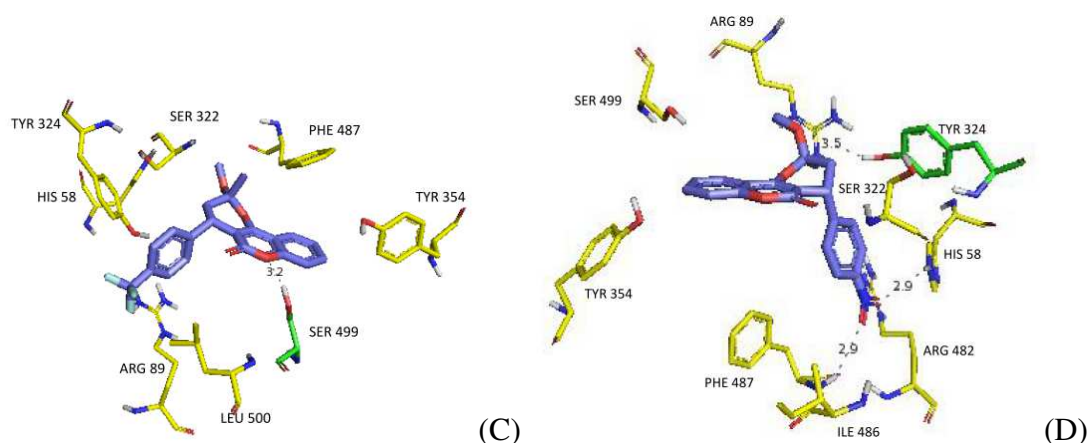


Figure 49 : Représentation des interactions les plus importantes de la première des 20 poses du 4-CF₃ cyclocoumarol (C) et du 4-NO₂ cyclocoumarol (D) dans le site actif de COX-2 (structure 3LN0)

(En vert, les acides aminés (Ser 499 et Tyr 324) réalisant des liaisons hydrogène avec les dérivés du cyclocoumarol (violet) et en jaune les principaux acides aminés qui réalisent des interactions hydrophobes)

Lorsque des alkyles (Me et *t*-Bu) sont introduits en position para du groupement benzyle du cyclocoumarol, 4 résidus principaux (Tyr 324, Ser 499, Ser 322 et Arg 89) stabilisent les molécules par des liaisons hydrogène. Pour des petits substituants tels que le méthyle, ces 4 résidus permettent l'établissement de 1 à 3 liaisons hydrogène selon la pose considérée (Figure 50, E). Pour un substituant plus encombré comme le *tert*-butyle, 3 acides aminés supplémentaires (Ala 496, His 58 et Arg 482) participent à l'établissement de 1 à 7 liaisons hydrogène selon les différentes poses de ce composé (Figure 50, F). Ces composés présentent un mode de liaison similaire à celui du cyclocoumarol (3 acides aminés communs avec le cyclocoumarol : Ser 499, Ser 322 et Tyr 324, liaisons hydrogène localisées au niveau de la fonction lactone et du groupement méthoxy) avec toutefois des liaisons hydrogène supplémentaires au niveau de l'oxygène du noyau pyrane. Ces analogues présentant un mode de liaison similaire au cyclocoumarol présentent aussi une activité inhibitrice similaire à la molécule parent. Le dérivé méthylé a une activité inhibitrice de 60% et le composé *tert*-butylé inhibe la production de PGE₂ à hauteur de 52%.

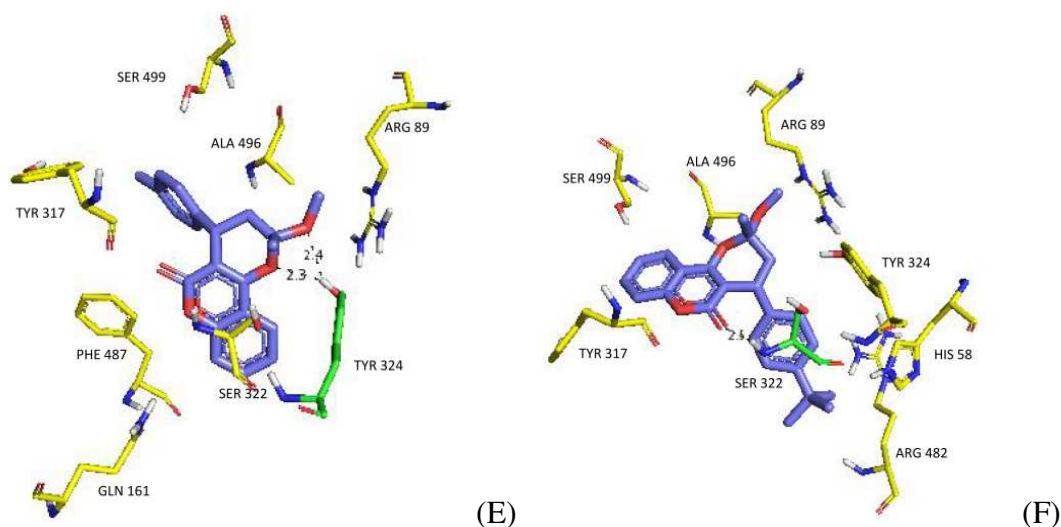


Figure 50 : Représentation des interactions les plus importantes de la première des 20 poses du 4-Me cyclocoumarol (E) et du 4-tBu cyclocoumarol (F) dans le site actif de COX-2 (structure 3LN0)

(En vert, les acides aminés (Ser 322 et Tyr 324) réalisant des liaisons hydrogène avec les dérivés du cyclocoumarol (violet) et en jaune les principaux acides aminés qui réalisent des interactions hydrophobes).

Pour le méthoxy, 7 acides aminés (Tyr 324, Ser 499, Tyr 354, Tyr 317, His 58, Arg 89 et Leu 500) participent à l'établissement de 1 à 6 liaisons hydrogène selon les poses considérées. La plupart de ces liaisons hydrogène sont observées au niveau du groupement électrodonneur introduit sur le groupement benzylique de la molécule et la grande majorité de ces résidus (5 résidus sur 7) encercle ce substituant. En plus de ces interactions, d'autres liaisons hydrogène sont localisées au niveau de la fonction lactone du noyau coumarin mais également au niveau du noyau pyrane (par l'atome d'oxygène et le groupement méthoxy) de la molécule. La diversité des liaisons hydrogène associée au groupement électrodonneur peut expliquer les résultats des tests biologiques montrant une activité inhibitrice de la synthèse de PGE₂ de 79%, proche de celle d'un inhibiteur sélectif de COX-2 de référence, le NS-398. (Figure 48, B).

Enfin, pour des substituants halogénés tel que le fluor, 3 résidus principaux (Tyr 324, Arg 89 et Ser 499) participent à l'établissement de liaisons hydrogène. Jusqu'à 6 liaisons hydrogène au maximum ont été observées localisées au niveau de la lactone. Le mode de liaison de ce dérivé est assez similaire à celui du cyclocoumarol (2 résidus sur 3 similaires : Tyr 324 et Ser 499) et réalisant des liaisons hydrogène avec la lactone tout comme dans le cas du

cyclocoumarol nu). Par conséquent, l'analogue fluoré présente une inhibition de la synthèse de PGE2 de 48% tout à fait comparable à celle du cyclocoumarol (50%) (Figure 51, G).

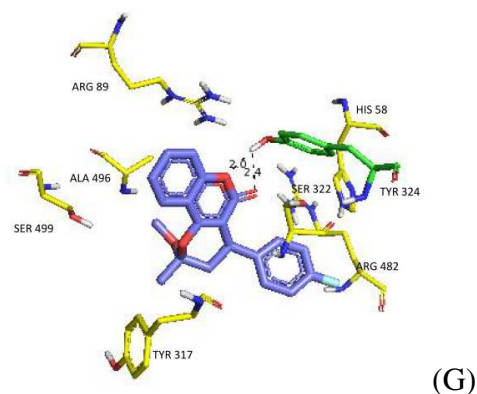


Figure 51 : Représentation des interactions les plus importantes de la première des 20 poses du 4-F cyclocoumarol (G) dans le site actif de COX-2 (structure 3LN0)

(En vert, les acides aminés (Ser 322) réalisant des liaisons hydrogène avec le dérivé du cyclocoumarol (violet) et en jaune les principaux acides aminés qui réalisent des interactions hydrophobes)

Molécules synthétisées	<p style="text-align: center;">ligand 1a</p>	<p style="text-align: center;">ligand 2a</p>	<p style="text-align: center;">ligand 3a</p>
Pymol			Ser322, His58, Phe487,
Liaisons H (nb total de liaison H)	Ser499, Ser322, Tyr 324 (1-2)	Ser499, Ser322, Tyr324 (1-2)	Tyr324, Arg482, Leu 321, Ile486, Arg 89, Ser499, (2-7)

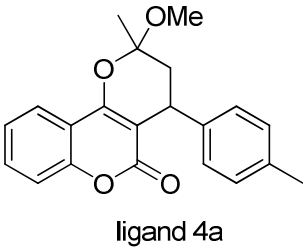
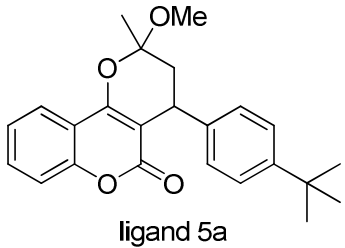
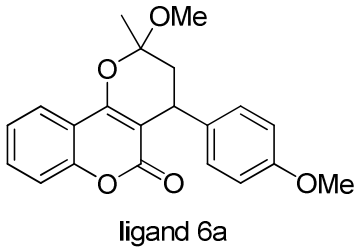
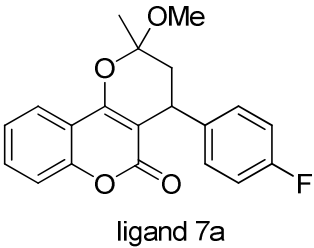
Molécules synthétisées	 ligand 4a	 ligand 5a	 ligand 6a
Pymol Liaisons H (nb total de liaison H)	Tyr324, Ser499, Ser322, Arg89 (1-3).	Tyr324, Ser499, Ser322, Arg89 (1-3).	Tyr324, Ser499, Tyr354, Tyr317, His58, Arg89, Leu500 (1-6)
Molécules synthétisées	 ligand 7a		
Pymol Liaisons H (nb total de liaison H)	Tyr324, Arg89, Ser499 (0-6)		

Tableau 19 : Etude des différentes liaisons hydrogène pour l'ensemble des 20 poses dockées de chaque analogue synthétisé (Pymol)

Ainsi ce travail a permis de montrer que le mode de liaison des 7 molécules synthétisées au laboratoire implique deux résidus communs (Ser 499 et Tyr 324). Selon les résultats obtenus, les dérivés nitré et méthoxylé possèdent une bonne affinité avec la protéine et sont stabilisés par de nombreuses liaisons hydrogène. Ces résultats théoriques ne sont pas en accord avec les résultats biologiques expérimentaux puisque le dérivé 4-OMe a une activité inhibitrice très intéressante sur COX-2 alors que le dérivé 4-NO₂ est complètement inactif. Il semblerait donc que le caractère électroattracteur et électrodonneur de ces substituants joue un rôle important.

L'étude de docking a permis d'émettre des hypothèses sur des modes d'inhibition potentiels des molécules synthétisées dans le site actif de COX-2 à travers la mise en place des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes.

IV.3.3.4 Prédiction de nouveaux analogues au cyclocoumarol, potentiellement inhibiteurs de COX-2 (SeeSAR)

Le logiciel SeeSAR a été utilisé pour prédire l'affinité de nouvelles molécules dont la synthèse est prévue au laboratoire. Pour cela, la prédiction d'affinité des molécules déjà synthétisées a d'abord été réalisée pour évaluer la qualité de prédiction du logiciel, puis le protocole de prédiction a été répété afin d'identifier les nouvelles molécules issues de la stratégie 1 ou 2 à synthétiser en priorité.

Pour cette partie, la première pose dockée du cyclocoumarol dans la structure 3LN0 nous a servi de modèle pour évaluer l'affinité des molécules synthétisées et des nouvelles molécules de départ.

IV.3.3.4.1 Molécules synthétisées

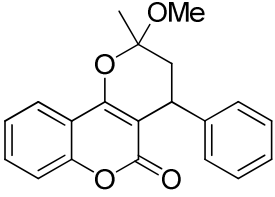
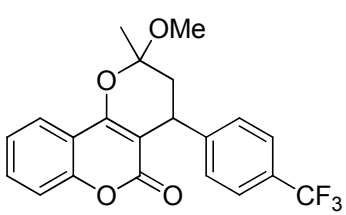
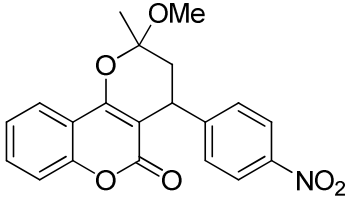
L'objectif de ce travail est de déterminer si les résultats des tests biologiques sont confirmés par le logiciel. Pour cela deux approches ont été réalisées. Dans un premier temps, nous avons étudié l'affinité prédite par SeeSAR pour les 20 poses générées lors du docking pour chaque molécule synthétisée et nous avons comparé l'affinité prédite pour chaque analogue synthétisé aux résultats expérimentaux. Dans un second temps, nous avons redessiné manuellement chacun de ces composés et comparé l'affinité prédite par rapport aux résultats expérimentaux. L'approche qui suivra au mieux la tendance des tests biologiques sera par la suite retenue pour effectuer d'autres études ultérieures (voir section Proposition de nouvelles molécules).

Dans un premier temps, les 20 poses de chaque molécule, obtenues après le docking, sont importées dans SeeSAR et leur affinité prédite par le logiciel.

Les résultats sont les suivants (Tableau 20) : pour les 20 poses du cyclocoumarol (ligand 1a) les affinités sont de l'ordre du mM-nM tandis que les résultats biologiques de ce composé ont démontré une activité inhibitrice moyenne. Pour le dérivé 4-CF₃ (ligand 2a), 18 poses présentent un clash avec le site actif mais 2 poses ont une affinité prédite l'ordre du pM-μM alors qu'une activité inhibitrice faible est observée expérimentalement pour ce dérivé. Pour le

composé 4-NO₂ (ligand 3a) qui n'a pas d'activité inhibitrice sur COX-2 selon les tests biologiques, 4 poses sur 20 ont une affinité prédite de l'ordre du μM . Le dérivé 4-Me (ligand 4a) présente 13 poses qui ont une affinité de l'ordre du nM- μM alors que les résultats biologiques de ce composé ont démontré une activité inhibitrice moyenne. Pour le dérivé 4-*t*Bu (ligand 5a) qui a également démontré une activité inhibitrice moyenne sur COX-2 selon les tests biologiques, toutes les poses présentent un clash avec le site actif. Pour le dérivé 4-OMe (ligand 6a) qui présente une activité inhibitrice proche de celle du NS-398, la prédiction est de l'ordre du nM-mM pour les 10 poses qui ne clashent pas. Enfin le 4-F cyclocoumarol (ligand 7a) a une prédiction d'affinité prédite de l'ordre du μM (pour les 7 poses qui ne clashent pas) alors qu'il présente une activité inhibitrice moyenne sur COX-2 selon les tests biologiques.

Ce premier travail montre que la plupart des molécules synthétisées ont une affinité prédite de l'ordre du nM- μM , 2 d'entre elles (ligands 1a et 6a) ont une affinité de l'ordre du mM-nM et une molécule (ligand 2a) présente une affinité de l'ordre du pM- μM . Il semblerait que ces molécules pourraient potentiellement inhiber COX-2. Les résultats des tests biologiques sont comparables avec l'affinité prédite de SeeSAR pour les molécules dont l'activité inhibitrice est moyenne (μM) ; cependant pour la molécule où l'inhibition est très efficace et la molécule inactive, le logiciel SeeSAR ne prédit pas les affinités attendues.

Molécules synthétisées	 <p>ligand 1a</p>	 <p>ligand 2a</p>	 <p>ligand 3a</p>
Prédiction d'affinité des poses prédites par Surfex selon SeeSAR	nM/ μM -mM	Clash avec le site de liaison sauf pour 2 poses : pdb002 (pM-nM), pdb010 (nM- μM)	Clash avec le site de liaison sauf pour 4 poses : pdb007, pdb010-12 (μM)

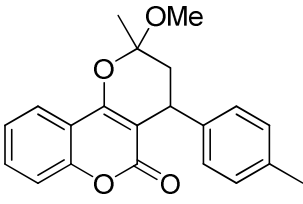
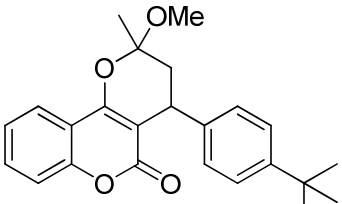
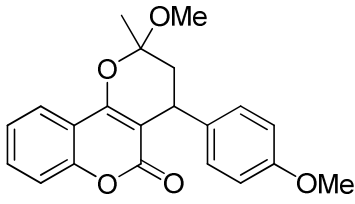
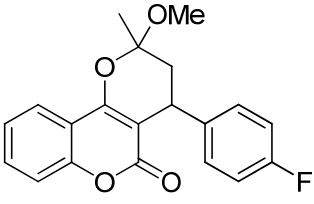
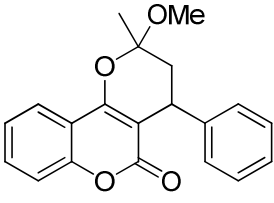
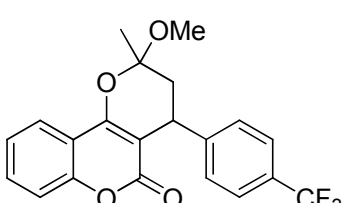
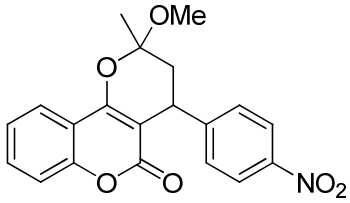
Molécules synthétisées	 ligand 4a	 ligand 5a	 ligand 6a
Prédiction d'affinité des poses prédites par Surfex selon SeeSAR	Clash avec le site de liaison sauf pour 13 poses : pdb000-12 (nM- μ M)	Clash avec le site de liaison	Clash avec le site de liaison, sauf pour pdb000-003, 006-009 (nM- μ M) 015-016 (μ M-mM)
Molécules synthétisées	 ligand 7a		
Prédiction d'affinité des poses prédites par Surfex selon SeeSAR	Clash avec le site de liaison, sauf pour pdb000, 001, 005, 012-015 (μ M)		

Tableau 20 : Etude de l'affinité prédite (SeeSAR) des 20 poses générées par Surfex pour chaque composé synthétisé

SeeSAR utilise une fonction de score différente de Surfex pour prédire l'affinité des poses générées. Ainsi sur les 7 molécules synthétisées, pour 4 composés, la pose prédite comme ayant la meilleure affinité par SeeSAR présente une affinité prédite de l'ordre du μ M. Ces quatre molécules correspondent aux analogues trifluorométhylé (ligand 2a, pose 10), nitré (ligand 3a, pose 7), méthoxylé (ligand 6a, pose 7), et fluoré (ligand 7a, pose 1). Par ailleurs, 1

molécule rencontre des clashes stériques avec les acides aminés du site actif, il s'agit du dérivé *tert*-butylé (ligand 5a). En effet, ce substituant présente l'inconvénient d'être encombrant, il est donc compréhensible que ce composé puisse entraîner des clashes stériques avec les acides aminés entourant cette molécule. Enfin, deux molécules sont prédites comme ayant de très bonnes affinités de l'ordre du nM. Il s'agit du cyclocoumarol nu (ligand 1a, pose 11) et de son analogue méthylé (ligand 4a, pose 0). Ces prédictions concordent avec les résultats biologiques puisque ces deux molécules présentent respectivement 50% et 60% d'inhibition de PGE₂. Pour ce dernier cas, le dérivé méthylé présente la meilleure affinité qui s'accorde avec la première pose de docking générée par Surflex (Tableau 21).

Molécules synthétisées	 <p>ligand 1a</p>	 <p>ligand 2a</p>	 <p>ligand 3a</p>
Meilleure affinité prédite selon SeeSAR et rang de la pose (pdb xxx)	nM (pdb 011)	μM (pdb 010)	μM (pdb 007)

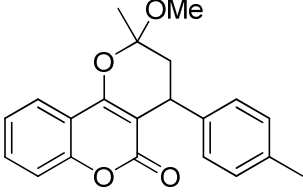
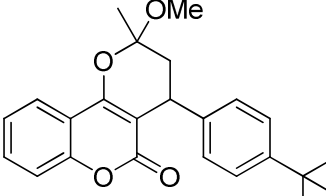
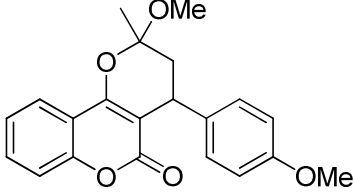
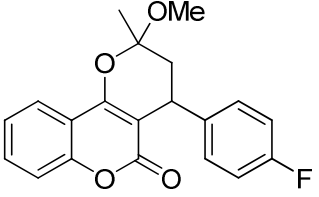
Molécules synthétisées	 ligand 4a	 ligand 5a	 ligand 6a
Meilleure affinité prédite selon SeeSAR et rang de la pose (pdb xxx)	nM (pdb 000)	Clash avec le site actif	μM (pdb 007)
Molécules synthétisées	 ligand 7a		
Meilleure affinité prédite selon SeeSAR et rang de la pose (pdb xxx)	μM (pdb 001)		

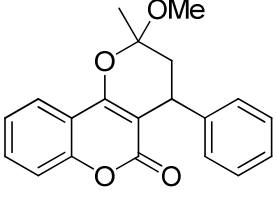
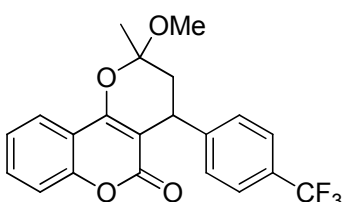
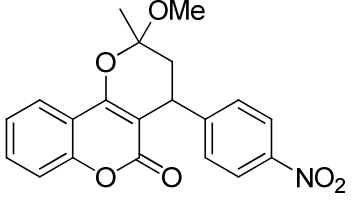
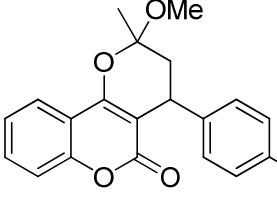
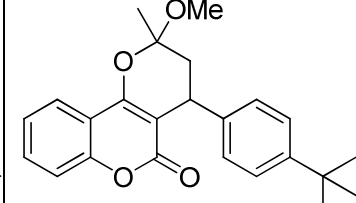
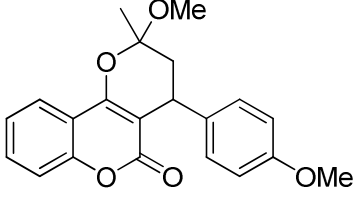
Tableau 21 : Etude de l'affinité prédite (SeeSAR) de la meilleure pose dockée pour chaque composé synthétisé

Ainsi, en se basant uniquement sur les prédictions de SeeSAR, les molécules synthétisées semblent présenter un caractère potentiel d'inhibition de COX-2 mais pour chaque molécule il est difficile de déterminer et de hiérarchiser laquelle des molécules serait un « bon, moyen ou mauvais » inhibiteur potentiel de COX-2 puisque dans les 20 poses générées de chaque molécule, on observe soit des clashes stériques du composé avec les acides aminés du site actif, soit l'ensemble des 20 poses d'une seule molécule présente des affinités très différentes balayant le pM au mM (cas du dérivé trifluorométhylé).

Dans un second temps, à partir de la première pose du cyclocoumarol dans 3LN0 obtenue par Surfex, chacune des molécules synthétisées a été redessinée à la main à partir du cyclocoumarol (dernière colonne du tableau) et les affinités prédites pour ces molécules redessinées ont été comparées aux résultats des tests biologiques.

Les résultats sont les suivants (Tableau 22) : pour 5 molécules, le cyclocoumarol (ligand 1a), le dérivé 4-CF₃ (ligand 2a), le dérivé 4-Me (ligand 4a), le dérivé 4-F (ligand 5a), et le dérivé 4-OMe (ligand 6a), l'affinité prédite est de l'ordre du nM. Le 4-NO₂ (ligand 3a) présente une affinité prédite de l'ordre du μM. Enfin le dérivé 4-*t*Bu (ligand 5a) a une affinité prédite de l'ordre du pM-nM. Ainsi en redessinant manuellement les molécules dans le site actif de COX-2 les clashes stériques sont évités et la prédiction d'affinité de toutes les molécules est augmentée par rapport aux poses de Surfex. De plus, comme pour le travail précédent, les résultats obtenus par les tests biologiques sont comparables pour les molécules dont l'activité inhibitrice est moyenne. De plus, pour la molécule où l'inhibition est très efficace (ligand 6a) et la molécule inactive (ligand 3a) le logiciel SeeSAR prédit des affinités différentes avec une affinité plus importante pour le 4-OMe cyclocoumarol que pour le dérivé nitro. Bien que ces deux molécules soient prédites comme actives, la tendance de la prédiction suit de quelque peu la tendance des résultats biologiques.

Aucune molécule ne montre de clashes stériques avec les acides aminés du site actif et les molécules redessinées ont des affinités prédites supérieures à celles des poses de Surfex. En effet, sur les 7 molécules synthétisées, 6 présentent une affinité de l'ordre du nM, et seul le dérivé nitré à une affinité de l'ordre du μM (Tableau 22).

<p>Molécules synthétisées</p>	 <p>ligand 1a</p>	 <p>ligand 2a</p>	 <p>ligand 3a</p>
<p>Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar</p>	<p>nM</p>	<p>nM</p>	<p>nM-μM</p>
<p>Molécules synthétisées</p>	 <p>ligand 4a</p>	 <p>ligand 5a</p>	 <p>ligand 6a</p>
<p>Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar</p>	<p>nM</p>	<p>pM-nM</p>	<p>nM</p>

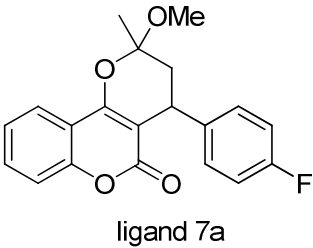
Molécules synthétisées	 <p style="text-align: center;">ligand 7a</p>
Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar	nM

Tableau 22 : Etude de l'affinité prédite des composés synthétisés dessinés sur SeeSAR

Cependant, comme pour le travail précédent, il est difficile, à partir de ces résultats, de prédire laquelle de ces molécules serait un bon inhibiteur de COX-2. Mais selon les échelles d'affinité prédites par SeeSAR, il est possible d'ordonner les molécules synthétisées selon une affinité décroissante. Ainsi, la première molécule intéressante serait le dérivé *tert*-butylé puis les analogues méthylé, fluoré et trifluorométhylé dans cet ordre. S'ensuit le cyclocoumarol nu et viennent enfin les dérivés méthoxylé et nitré. Ces résultats sont difficilement analysables et ne reflètent pas l'activité biologique observée expérimentalement. On peut supposer que les paramètres d'affinité de prédiction de SeeSAR jouent sur les résultats obtenus. Néanmoins, en s'appuyant uniquement sur ces résultats, il semblerait qu'on puisse distinguer les inhibiteurs de COX-2 de ceux qui ne le sont pas.

En conclusion, la deuxième approche semble donner de meilleurs résultats (Schéma 48) et c'est donc celle que nous allons appliquer par la suite pour essayer de prédire quelles molécules devraient être synthétisées en priorité.

Résumé :

Composés synthétisés

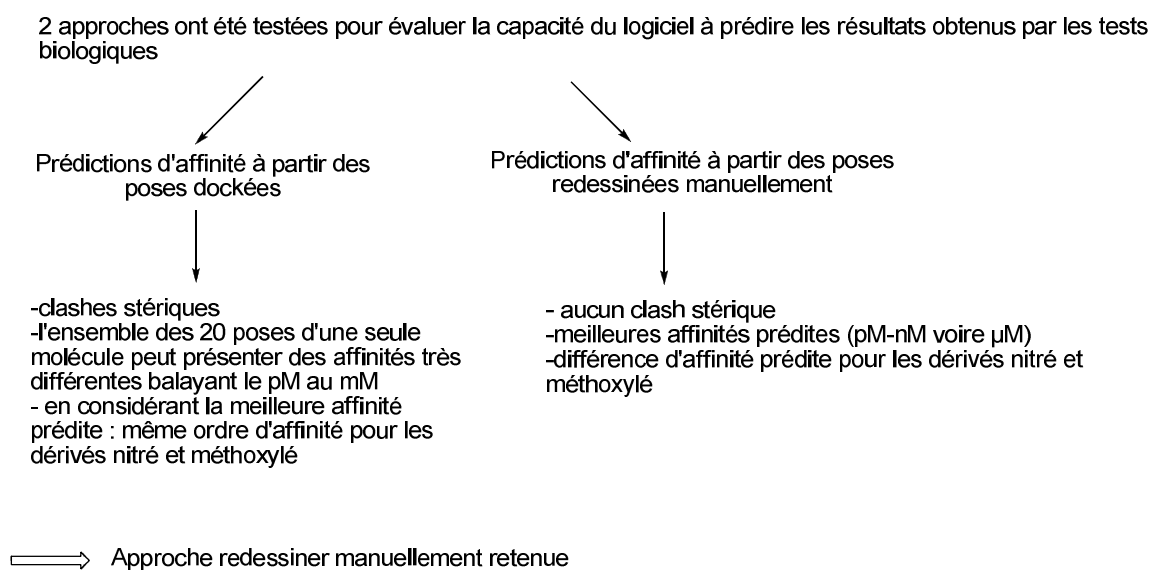


Schéma 48 : Résumé de l'évaluation de SeeSAR à prédire les résultats obtenus biologiquement (deux approches : poses dockées ou redessiner manuellement)

IV.3.3.4.2 Proposition de nouvelles molécules

A partir des résultats biologiques et des outils bioinformatiques dont nous disposons, nous avons envisagé une série de modifications structurales autour du cyclocoumarol. Inspirés par les pharmacomodulations définies au début du projet de thèse, une liste de 303 molécules a été élaborée. Nous avons proposé de pharmacomoduler le cyclocoumarol avec un large éventail de substituants (ex : alkyl, halogènes, noyau aromatiques, noyaux aromatiques hétérocycliques...) dans plusieurs positions.

A partir de cette liste de molécules, plusieurs études ont été réalisées dans le but de déterminer quelles molécules sont les plus susceptibles d'être actives et devraient donc être synthétisées en premier. Nous avons tout d'abord dessiné manuellement chacun de ces composés dans SeeSAR afin d'évaluer leur affinité. Nous avons sélectionné les composés présentant les meilleures affinités prédites (ordre du nM- μ M) et nous avons déterminé leurs modes d'inhibition potentiels. Pour cela chaque pose dessinée a été analysée avec Seesar pour identifier les différents types d'interactions (notamment les liaisons hydrogène) pouvant s'établir entre la molécule et les résidus du site actif. L'objectif étant d'expliquer, pour ces composés sélectionnés, l'affinité prédite par SeeSAR et de vérifier si la poche spécifique de la COX-2 est occupée pour ainsi prédire la sélectivité de ces nouveaux composés.

Une étude d'alignement entre les poses dockées et la pose dessinée manuellement a été réalisée pour évaluer si la pose redessinée manuellement était prédite comme un mode de liaison potentiel par Surflex-dock et ainsi augmenter la fiabilité de cette prédiction.

Parmi les 303 molécules suggérées, 39 se sont révélées intéressantes, le reste des molécules présentant des clashes stériques avec les acides aminés du site actif de COX-2 (Tableaux A-G annexes). Le mode de liaison de ces 39 molécules a été analysé dans le but de prédire la sélectivité vis-à-vis de COX-2 en étudiant la capacité de la molécule à s'insérer dans la poche spécifique de COX-2. Parmi les 39 molécules, seules 13 ne s'insèrent pas dans cette poche additionnelle, les 26 molécules restantes présentant une occupation partielle de la seconde poche latérale de COX-2 (Figure 52).

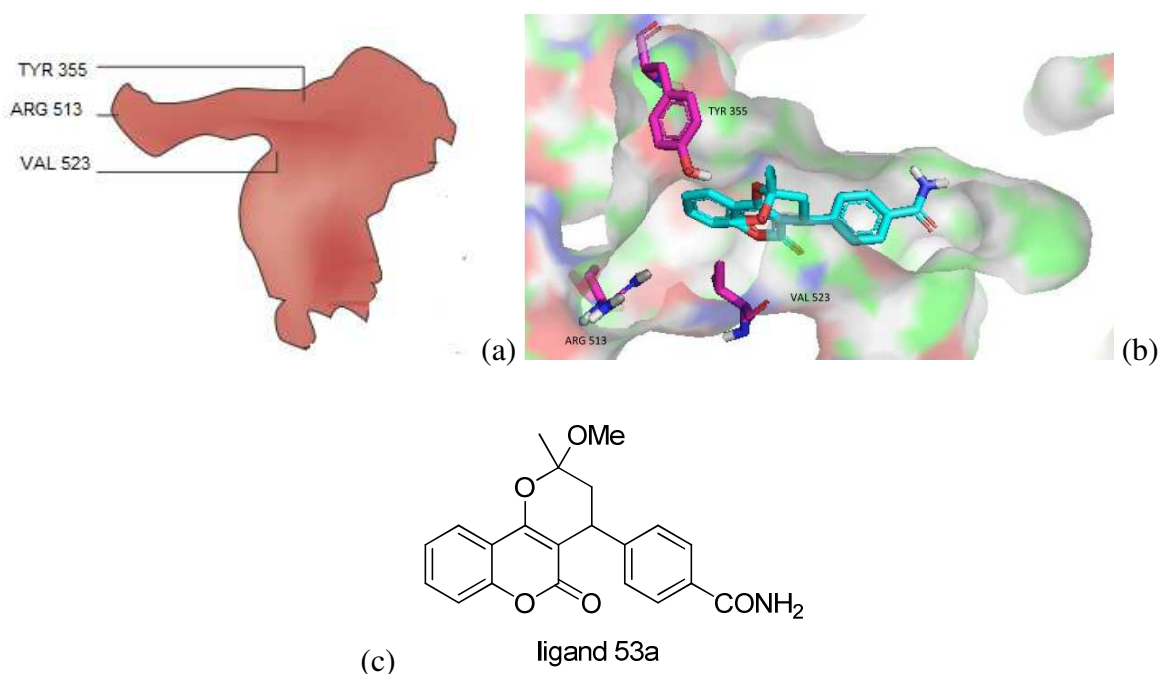


Figure 52 : (a) Représentation de la poche sélective adaptée selon [53] (b) occupation partielle du ligand 53a, pose 6 (bleu) et en violet 3 acides aminés majeurs (Arg 513, Val 523 et Tyr 355) situés dans la poche spécifique de COX-2

Par la suite, nous avons voulu vérifier si la pose redessinée manuellement à l'aide de SeeSAR était aussi identifiée par docking comme une pose potentielle. Ainsi, chaque pose générée par Surflex a été superpositionnée avec la molécule redessinée manuellement. Une superposition correcte a été observée pour 18 ligands (12a, 53a, 2b, 3b, 5b, 6b, 13b, 20b, 25b, 48b, 49b, 1d, 18d, 19d, 12ia, 9fa, 6fa, 8fa) et en particulier pour les ligands 6b, 13b, 20b, 12ia, 9fa, 6fa et

8fa, la première pose obtenue lors du docking (donc celle ayant obtenu le meilleur score de docking) correspondait à la pose redessinée manuellement (Figure 53).

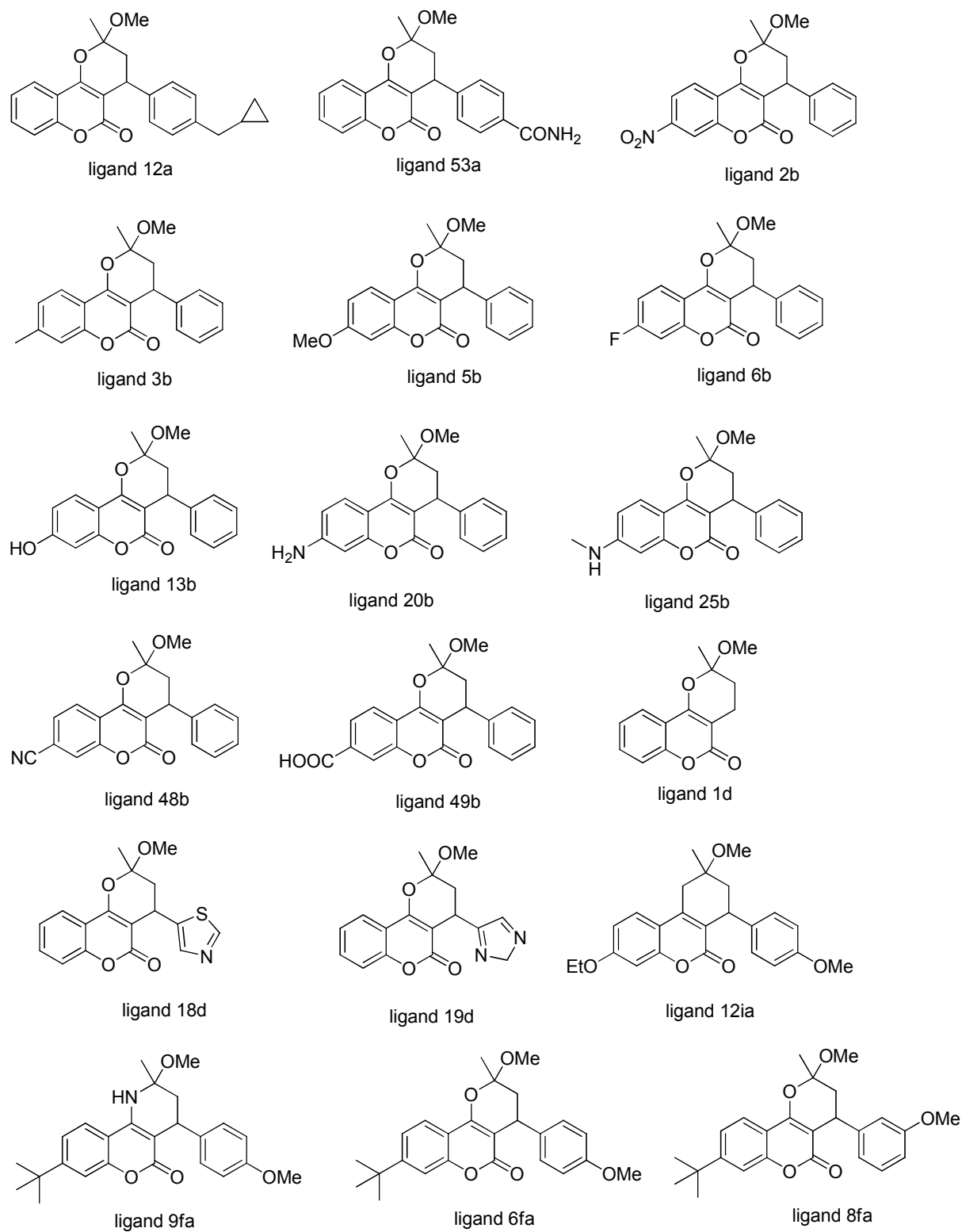


Figure 53 : Structures chimiques des 18 ligands dont les poses dockées présentent une superposition correcte avec la pose redessinée

IV.3.3.4.2.1 Pharmacomodulations 1 et 2

Dans un premier temps la pharmacomodulation 1 (série a) a été explorée en introduisant divers substituants en position 4 du noyau benzylique du cyclocoumarol (Tableau 26 annexe Série ligands_a). Les molécules à prédire sont données ci-dessous (Figure 54).

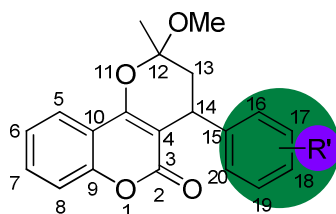
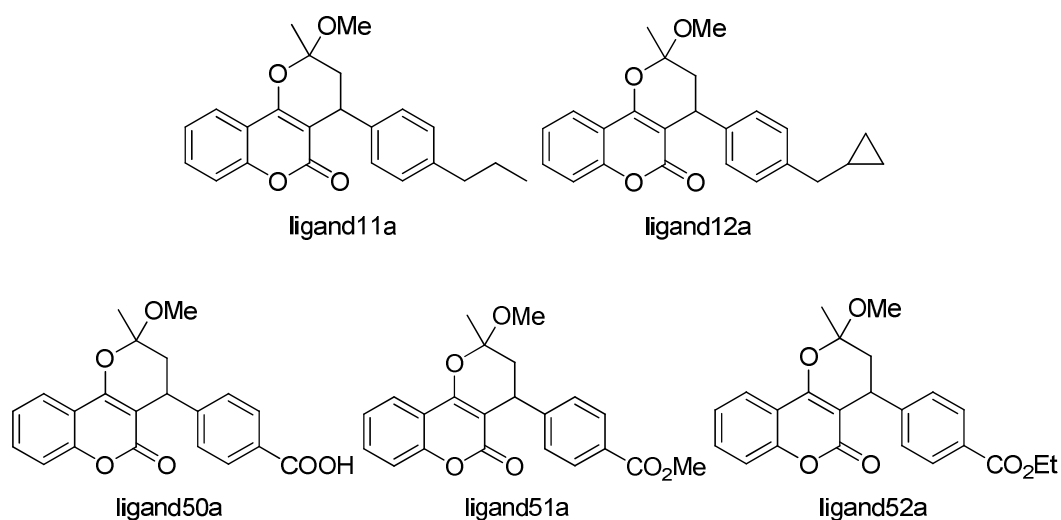


Figure 54 : Rappel des molécules obtenues selon la pharmacomodulation 1 (série a)

Cette étude a mis en évidence quelques molécules intéressantes (Figure 55) présentant soit un groupement alkyle ou cyclopropyle (ligand 11a et 12a) soit une fonction acide carboxylique (ligand 50a) en position 4 du noyau benzylique. La prédiction d'affinité de ces molécules est de l'ordre nM- μ M. D'autres molécules portant des fonctions esters ou amides présentent également des affinités de l'ordre du nM- μ M (ligands 51a-55a) (Figure 55). Les interactions sur Pymol révèlent en particulier des liaisons hydrogène avec Ser 499, Ser 322 et Arg 89 (Tableau 26 annexe série ligands_a). Il serait donc intéressant de travailler autour de ces molécules dans le but d'augmenter l'affinité de prédiction vis-à-vis de COX-2, en modifiant par exemple la position de la fonction carbonyle sur le noyau benzylique.



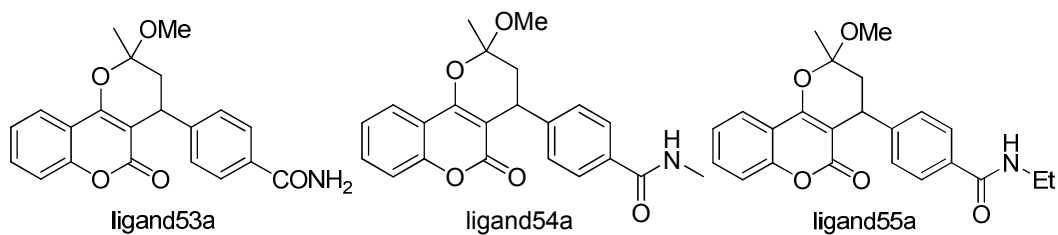


Figure 55 : Structure chimique des molécules de la série a présentant une affinité prédite de l'ordre du nM- μ M. (Tableau 26 annexes ligands_a)

La deuxième pharmacomodulation (séries d et e) concerne la substitution du groupement phényle par des noyaux aromatiques. Quelques structures intéressantes (Figure 56) substituées par des noyaux hétérocycliques (ligands 15d et 18d) présentent une affinité prédite de l'ordre du nM- μ M (Tableaux 29 et 30 annexe séries ligands_d, ligands_e). Les interactions sur Pymol révèlent en particulier des liaisons hydrogène avec Ser 499 et Ser 322.

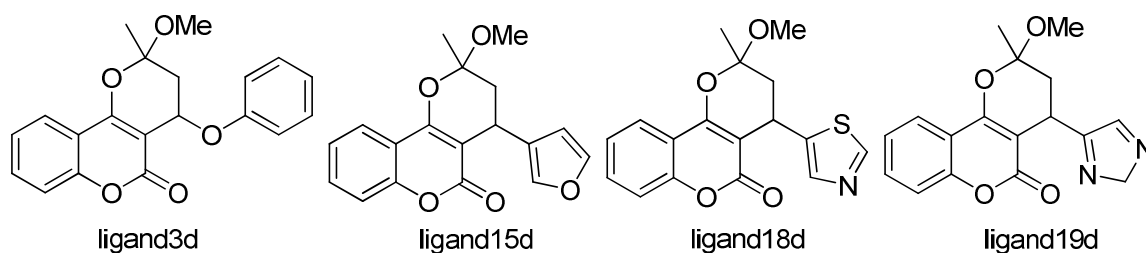


Figure 56 : Structure chimique des molécules de la série d présentant une affinité prédite de l'ordre du nM- μ M. (Tableau 29 annexes ligands_d)

A l'inverse des remplacements du phényle par des noyaux hétérocycliques ne donnent pas de résultats d'affinité satisfaisants. C'est le cas du naphthalène (ligand 2d), de l'indole (ligand 4d), de la quinoline (ligand 5d), de la pyridine et de ses dérivés (ligand 6d et 7d), des furanes et thiophènes substitués (ligands 16d et 17d) qui entraînent des clashes stériques avec les résidus du site actif de COX-2. Il en est de même pour les dérivés du cyclocoumarol portant sur leur noyau benzylique des hétérocycles substitués par un ou deux azotes, oxygènes ou la combinaison de ces deux atomes dans leur cycle (ligands 8d-14d). Pour des raisons stériques ces composés ne s'insèrent pas dans le site actif de COX-2. Néanmoins, les noyaux thiazole et imidazole remplaçant le noyau benzylique du cyclocoumarol semblent prometteurs. En effet, leur affinité de prédiction s'étale du μ M-nM (ligands 18d et 19d) (Figure 56).

Pour les composés de la série e, substituer le noyau benzylique par un noyau coumarinique entraîne des clashes stériques et confirment que cette substitution est favorisée par des composés hétérocycles non substitués et peu encombrants.

La troisième pharmacomodulation (série b et c) concerne l'introduction des substituants soit uniquement sur le noyau de la coumarine, soit de part et d'autre des deux phényles du cyclocoumarol (Figure 57).

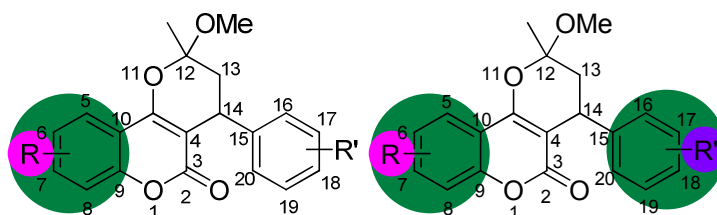


Figure 57 : Rappel des molécules envisagées de la pharmacomodulation 2 (série b et c)

Pour cette étude, seulement quelques structures intéressantes ressortent avec des affinités prédites de l'ordre nM- μ M, le reste des molécules entraîne des clashes avec les résidus du site actif (Tableaux 27 et 28 annexes séries ligands_b et ligands_c).

Dans cette série, tous les substituants introduits en position 4 du noyau benzylique de la série a ont été transférés en position 7 sur le noyau benzylique de la coumarine. L'objectif est d'étudier sur quelle partie des deux phényles du cyclocoumarol il est plus judicieux d'introduire des substituants pour augmenter l'affinité des composés et inhiber l'activité de COX-2.

Les résultats de la prédiction indiquent que tout comme la série a, les ligands de la série b portant des substituants trop encombrants ou flexibles (ligands 1b, 4b, 9b-12b, 14b-24b, 26b-47b, 50b-54b) se heurtent à des acides aminés entourant la molécule et entraînent donc des clashes stériques. Cependant, en se concentrant uniquement sur de petits groupes (hydroxyles (ligand 13b) ou méthoxy (ligand 5b), dérivés nitré, méthylé et fluoré (ligand 2b, 3b et 6b), des amines nues (ligand 20b) ou dérivées par des méthyles (ligand 25b), nitrile (ligand 48b) et acide carboxylique (ligand 49b), quelques molécules supplémentaires ressortent comme potentiellement intéressantes. Tous ces petits groupements sont donc à préconiser en tant que substituants du noyau coumarinique.

Il est particulièrement intéressant d'étudier la prédiction d'affinité des dérivés méthoxy et nitré : en les introduisant en position 7 du noyau coumarinique il semblerait que le composé méthoxy ait une meilleure prédiction d'affinité (nM) que le dérivé nitré (μM). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors des tests biologiques des composés déjà synthétisés. Il serait intéressant de synthétiser et de tester ces molécules afin d'évaluer leur activité biologique et de les comparer à leurs analogues substitués en para du noyau benzylique. Il en est de même pour les dérivés méthylé et fluoré, les résultats étant similaires au travail effectué précédemment sur les molécules synthétisées.

Etonnamment la substitution par des hydroxyles (ligand 13b), des amines substituées par de groupements non encombrants (ligands 20b et 25b) et la substitution par la fonction nitrile (ligand 48) du côté du noyau coumarinique, permet aux composés correspondant de s'insérer dans le site actif de COX-2 alors que des clashes stériques sont observés dans le cas où les substituants sont introduits en para du noyau benzylique. A l'inverse, les substituants de type esters ou amides entraînent des clashes stériques (ligands 50b-54b).

Pour les ligands de la série c, le même substituant a été introduit dans deux positions du cyclocoumarol : en para du noyau benzylique et en position 7. L'objectif ici est d'étudier l'influence de substituants de même nature introduits à la même position sur chaque côté de la molécule.

Les résultats sont similaires avec ceux obtenus dans les séries précédentes. Les substituants encombrés ou flexibles entraînent des clashes stériques. Dans cette série le risque de clash est multiplié par 2 puisqu'il suffit qu'un substituant positionné sur l'un des deux noyaux aromatiques entraîne un clash stérique pour que toute la molécule ne s'insère pas. Sur les 54 molécules de la série c, seules 2 molécules se révèlent intéressantes (ligand 3c et 6c).

Compte tenu des résultats obtenus pour les séries b et c, le développement de cyclocoumarol disubstitués n'est pas très pertinent. Les meilleures molécules sont illustrées dans la figure 53. Elles sont substituées par divers groupement parmi lesquels un groupement électroattracteur (NO_2 , ligand 2b) ou électrodonneur (OH, OMe, ligands 13b et 5b), des alkyles (Me, ligands 3b et 3c), des halogènes (ligands 6b, 7b, 8b, et 6c), des amines (ligands 20b et 25b), des nitriles (ligand 48b) et des acides carboxyliques (ligand 49b) (Figure 58). Les interactions sur Pymol révèlent en particulier des liaisons hydrogène avec Ser 499 et Ser 322 pour les ligands

48b, 3c et 6c et seulement avec Ser 499 pour les autres ligands (Tableaux 27 et 28 annexes ligands_b et ligands_c).

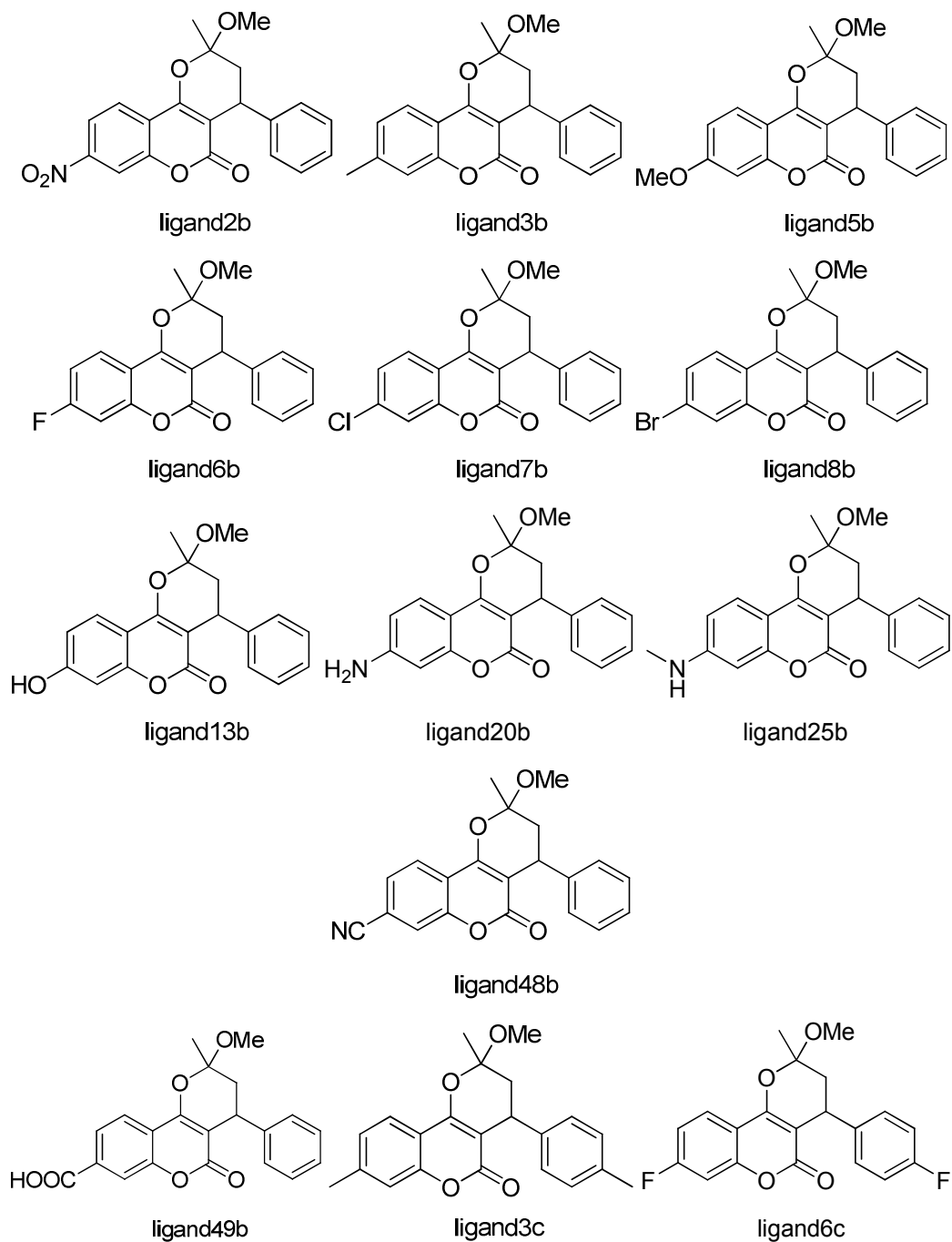


Figure 58 : Structure chimique des molécules de la série b et c présentant une affinité prédite de l'ordre du nM- μ M. (Tableaux 27 et 28 annexes ligands_b et ligands_c)

IV.3.3.4.2.2 Modifications proposées à partir du 4-OMe-cyclocoumarol

Compte tenu des résultats biologiques, nous avons décidé de travailler autour de la structure du 4-OMe, qui s'est révélé le meilleur inhibiteur de la COX-2 (taux d'inhibition de PGE₂ à 80%).

Un premier travail utilisant la première pose du cyclocoumarol dans 3LN0 a été mené. Les modifications proposées ont concerné : le changement du méthyle de la position 12 par divers alkyles ou cycloalkyles, la modification de la position du 4-OMe de la fonction benzylique et l'introduction de disubstitutions du groupement OMe sur différentes positions du cyclocoumarol (Tableau 30 annexe série ligands_f) (Figure 59).

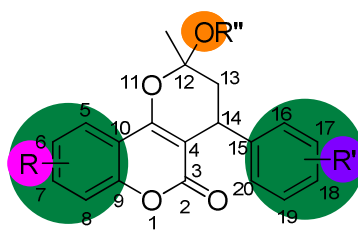


Figure 59 : Pharmacomodulation du cyclocoumarol au niveau de l'acétal et de part et d'autre des 2 phényles (série f)

Le remplacement du groupement méthoxy en position 12 par des groupements plus encombrants entraîne des clashes stériques (ligands 2f-7f) (ligands 10f-17f) Cependant, l'introduction d'un groupement hydroxyle (ligand 1f) facilite l'insertion du composé dans le site actif conduisant une affinité prédite de l'ordre du nM.

Concernant l'étude de la position de la fonction méthoxy seule la monosubstitution sur le noyau benzylique a démontré des affinités prédites intéressantes de l'ordre du nM, et plus particulièrement, lorsque ce groupe est positionné en ortho ou en méta (ligands 8f et 9f). Pour les composés di- ou tri-substitués, des clashes stériques sont observés (ligands 10f-17f), excepté pour le composé 12f où l'affinité est de l'ordre du pM-nM.

Compte tenu des résultats obtenus seulement quelques structures se sont révélées intéressantes (prédiction d'affinité : nM- μ M) et une molécule de l'ordre du pM-nM (ligand 12f), le reste entraînant des clashes avec les résidus du site actif (Figure 60). Ces molécules portent soit la combinaison 4-OMe et 1 groupement hydroxyle en position 12 (ligand 1f) sur le squelette du cyclocoumarol soit uniquement un groupement OMe en position 2 (ligand 8f) ou 3 (ligand

9f). L'affinité prédite de ces molécules est de l'ordre nM ou μM . Pour le composé 12f l'affinité est très intéressante, de l'ordre du pM-nM. Les interactions sur Pymol révèlent en particulier des liaisons hydrogène avec Ser 499, Ser 322 et Arg 89.

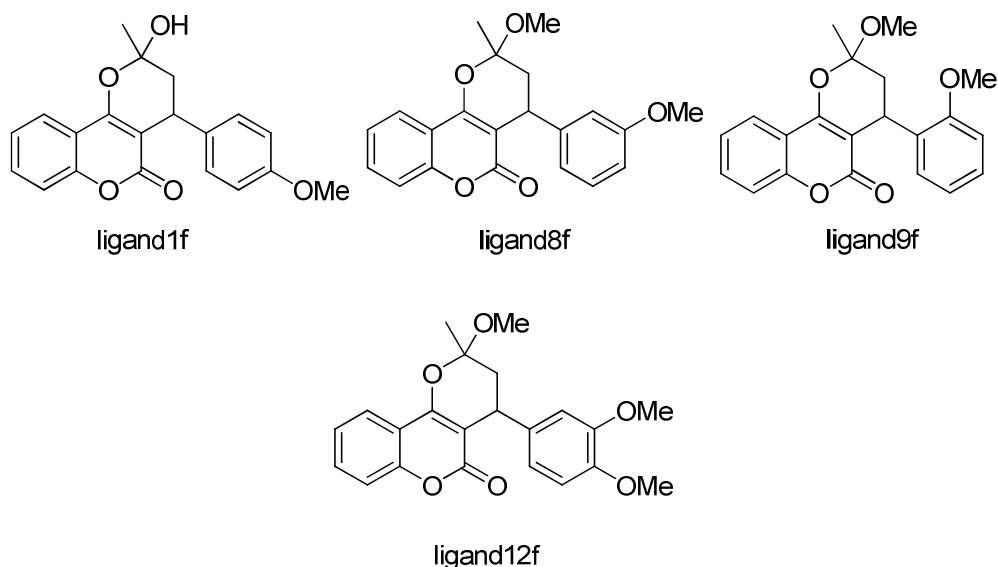


Figure 60 : Molécules de la série f présentant des affinités de nM- μM (et pM pour le ligand 12f). (Tableau 30 annexes ligands_f)

Un deuxième travail a été réalisé en utilisant le complexe 3LN0 et la première pose dockée du 4-OMe cyclocoumarol. Les modifications proposées ont concerné la combinaison de plusieurs modifications : la position du 4-OMe sur le cycle benzylique, l'introduction de divers substituants sur le cycle de la coumarine, des modifications bioisostériques sur le noyau pyrane du cyclocoumarol (-NH, -CH)...(série 4-OMebis, Tableau 31 annexe).

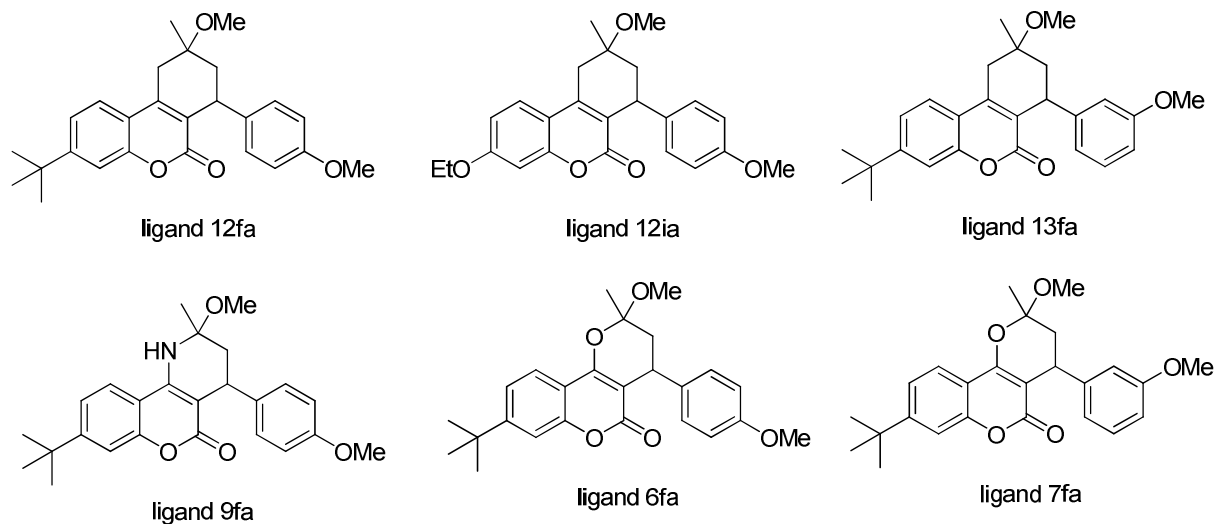
Sur les 109 molécules de cette deuxième série, seules 7 molécules (Figure 61) se révèlent être intéressantes avec une affinité de l'ordre du nM (prédiction d'affinité en redessinant manuellement les molécules). Le reste des molécules présentent une affinité $\geq \mu\text{M}$ et n'ont pas été retenues pour la suite de cette étude (Tableau 31 annexe ligands 4-OMebis).

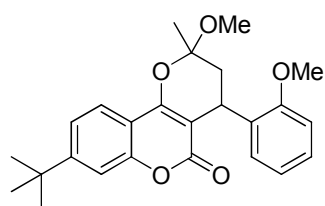
Ces 6 molécules partagent plusieurs points communs. Tout d'abord, elles ne portent qu'un seul substituant positionné en para du noyau coumarin, majoritairement le groupement *tert*-butylé (ligands 12fa, 13fa, 9fa, 6fa, 8fa, 7fa), une seule molécule (ligand 12ia) portant un groupement éthoxy. Ensuite, le groupement acétal est favorisé par rapport à d'autres groupements plus petits ou plus encombrants qui démontrent des affinités plus faibles de l'ordre du μM voire pour certains cas de l'ordre du mM (Tableau 31 annexe ligands 4-

OMebis). Par ailleurs, la monosubstitution du groupement méthoxy sur le noyau benzénique est favorisée, et ce, quelle que soit la position de ce groupement (ortho, méta et para ortho). Enfin, la substitution par un groupement bioisostère n'entraîne pas de différence particulière en termes d'affinité pour l'ensemble de ces 7 molécules.

Malgré l'encombrement du groupement *tert*-butylé, 7 molécules démontrent de fortes affinités et s'insèrent dans la poche spécifique de COX-2 (Figure 61) Les interactions sur Pymol révèlent en particulier des liaisons hydrogène avec 2 résidus communs : Ser 499 et Tyr 324. (Tableau 31 annexe 4-OMebis). Pour augmenter la diversité de ces molécules, il serait intéressant de travailler autour des molécules bioisostères et de tester leur activité inhibitrice sur COX-2.

D'autres études peuvent être menées en réalisant le même travail mais cette fois-ci avec différents substituants (autre que le méthoxy) introduits sur le phényle du cyclocoumarol, et choisis de manière judicieuse afin d'augmenter l'affinité des composés. C'est le cas par exemple, du 4-Me cyclocoumarol qui est la deuxième molécule après le dérivé méthoxy à présenter une inhibition de la synthèse de PGE₂ à 60%.

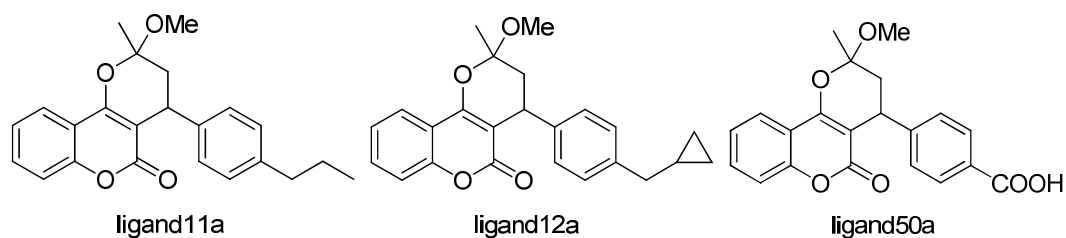




ligand 8fa

Figure 61 : Molécules de la série ligands_4-OMebis présentant des affinités de nM- μ M (Tableau 31 annexe de la série ligands_4-OMebis)

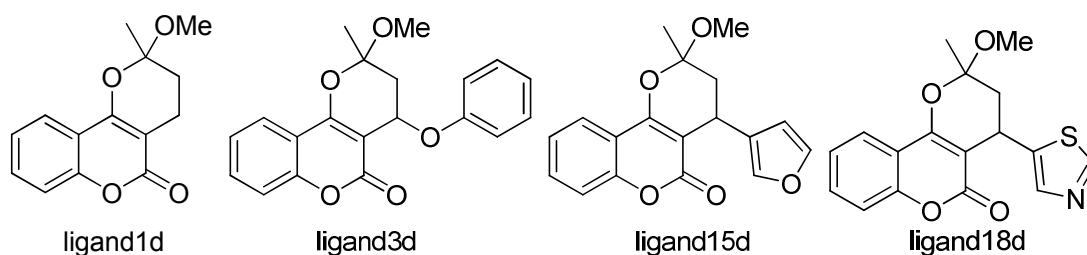
Ainsi, 39 nouvelles molécules potentiellement intéressantes peuvent être rapidement synthétisées et testées biologiquement dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs sélectifs de COX-2 (Figure 62).



ligand11a

ligand12a

ligand50a

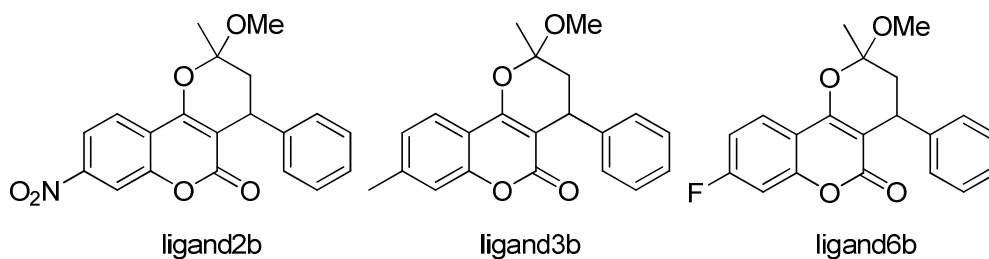


ligand1d

ligand3d

ligand15d

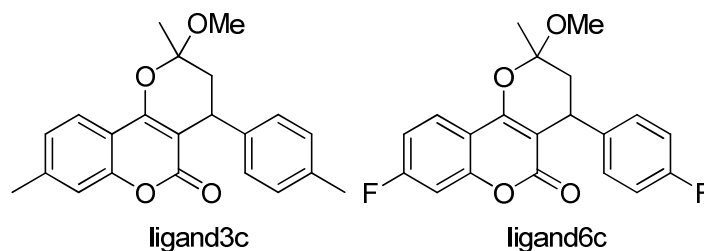
ligand18d



ligand2b

ligand3b

ligand6b



ligand3c

ligand6c

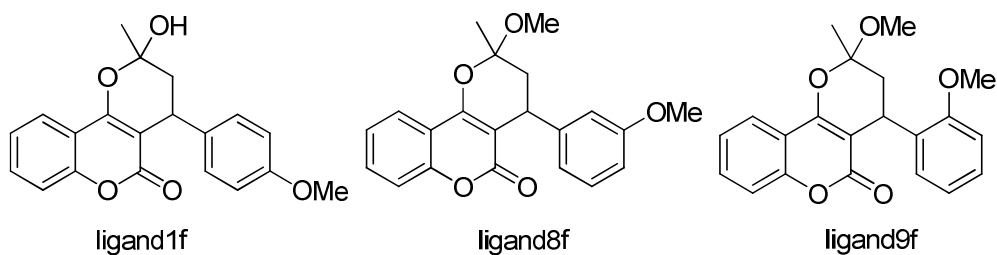


Figure 62 : Quelques exemples de molécules intéressantes pouvant être synthétisées

Résumé :

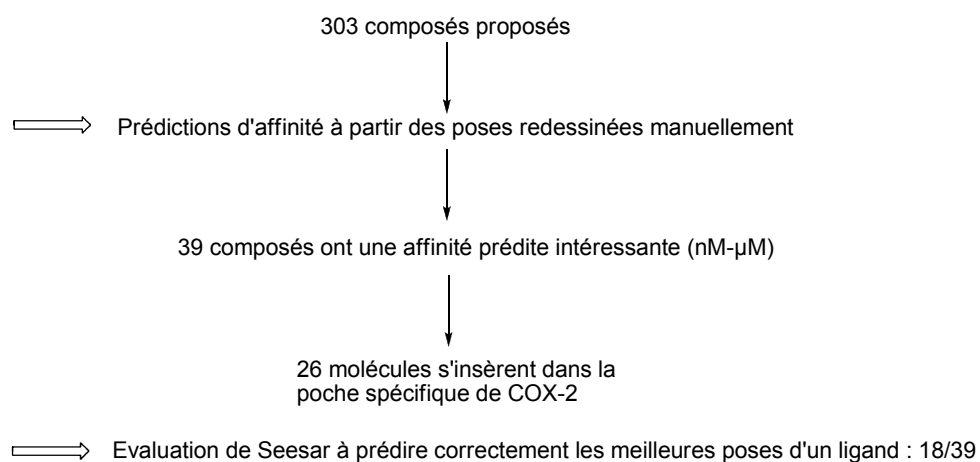


Schéma 49 : Résumé de la prédiction des 303 molécules proposées

Cinquième partie : Conclusion

L'inflammation est un phénomène affectant des millions de personnes à travers le monde et intervenant dans de nombreuses maladies. Il existe une grande variété de médiateurs inflammatoires impliqués dans différentes fonctions biologiques. Cependant, du fait de la complexité du corps humain, inhiber ces médiateurs inflammatoires peut à la fois traiter la maladie et réduire l'inflammation tout comme entraîner des effets secondaires indésirables. Ainsi le développement d'un nouveau médicament se révèle être un véritable défi où la balance bénéfice-risque est un des éléments majeurs à prendre en considération.

La cyclooxygénase-2 intervient dans le processus de l'inflammation et des inhibiteurs sélectifs de la COX-2, c'est-à-dire n'inhibant pas la COX-1, permettent de réduire l'inflammation en évitant les problèmes gastro-intestinaux bien connus des inhibiteurs non sélectifs. De nombreux inhibiteurs sélectifs ont été mis au point, la majorité présentant une structure tricyclique ou bicyclique avec un noyau central. Certains d'entre eux ont été commercialisés, comme les coxibs par exemple, qui sont efficaces pour réduire l'inflammation et qui n'affectent pas le système gastro-intestinal mais des problèmes cardiovasculaires, hépatiques et allergiques ont entraîné le retrait de certains composés du marché (Vioxx).

Pour découvrir de nouvelles molécules à la fois efficaces et présentant moins d'effets secondaires, des méthodes *in silico* ont été utilisées dans le but de trouver de nouvelles structures originales à visée anti-inflammatoire. A partir du travail réalisé avec le logiciel TOMOCOMD-CARDD, plusieurs structures possédant des propriétés anti-inflammatoires ont été identifiées. Parmi celles-ci, un dérivé de la coumarine, le cyclocoumarol a été choisi pour développer de nouvelles molécules sélectives inhibitrices de COX-2.

Des modèles pharmacophoriques ont été élaborés à partir d'inhibiteurs connus dans le but de révéler les points pharmacophoriques importants et nécessaires à l'activité et à la sélectivité

vis-à-vis de COX-2. Les pharmacophores sélectifs de COX-2 générés permettront de guider la synthèse de diverses autres molécules inhibant sélectivement COX-2.

Des molécules dérivant du cyclocoumarol ont été synthétisées, puis testées biologiquement : la plupart d'entre elles présentent une activité sur COX-2 sans aucune inhibition significative sur COX-1. Parmi celles-ci une molécule, le composé 7d, démontre une activité quasi-similaire à celle du NS-398, un inhibiteur sélectif connu.

Ainsi, cette étude portant sur le cyclocoumarol et ses dérivés a permis de découvrir une série de composés nouvelle et originale capable d'inhiber sélectivement COX-2.

Par la suite, un travail de phamacomodulation autour de ces dérivés a été réalisé en utilisant des outils *in silico* dans le but de prédire l'affinité de nouveaux composés. Ces nouvelles structures seront synthétisées puis testées biologiquement.

En conclusion, de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la COX-2 issus du cyclocoumarol ont été conçus en alliant synthèse chimique, outils *in silico* et tests biologiques.

Sixième partie : Partie expérimentale

VI.1 Chimie

Materials and Methods

All reagents were obtained from commercial sources unless otherwise noted, and used as received. Heated experiments were conducted using thermostatically controlled oil baths and were performed under an atmosphere oxygen-free in oven-dried glassware when necessary. All reactions were monitored by analytical Thin Layer Chromatography (TLC) and GC-MS analysis. TLC was performed on aluminium sheets precoated silica gel plates (60 F₂₅₄, Merck). TLC plates were visualized using irradiation with light at 254 nm. Flash column chromatography was carried out when necessary using silica gel 60 (particle size 0.040-0.063 mm, Merck).

The structure of the products prepared by different methods was checked by comparison of NMR, IR and MS data and by the TLC behavior. ¹H and ¹³C-NMR spectra were recorded on a Bruker BioSpin GmbH spectrometer 400 MHz, at room temperature. Chemical shifts are reported in δ units, parts per million (ppm). Coupling constants (*J*) are measured in hertz (Hz). Splitting patterns are designed as followed: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; m, multiplet; br, broad; ddd: doublet of doublet of doublet. Various 2D techniques and DEPT experiments were used to establish the structures and to assign the signals. GC-MS analysis were performed with an Agilent 6890N instrument equipped with a dimethyl polysiloxane capillary column (12 m x 0.20 mm) and an Agilent 5973N MS detector-column temperature *gradient* 80-300°C (method 80): 80°C (1 min); 80°C to 300°C (12.05°C/min); 300°C (2 min); Infrared spectra were recorded over the 400-4000 cm⁻¹ range with an Agilent Technologies Cary 630 FTIR/ ATR/ ZnSe spectrometer.

Melting points were achieved on a kofler block. The reactions using microwaves as the activating/heating source were accomplished using a microwave oven (CEM Discover 1TM) under pressure and were monitored by ChemDriver.

X-ray diffraction data for **4H_cyclo_dia1**, **4H_cyclo_dia2**, **4-OMe_cyclocoumanol_diamajo** were obtained at room temperature on a Rigaku XtaLabPro diffractometer equipped with a microfocus source (MicroMax003_Mo) and multilayer confocal mirrors (Mo K α radiation, $\lambda = 0.71075 \text{ \AA}$). Data were indexed, integrated and scaled using *CrysAlisPro*¹ software suite. They were also corrected for polarization, Lorentz and absorption effects (*SCALE3 ABSPACK*).

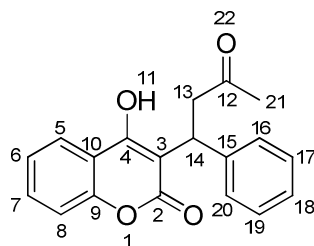
The structure were solved with the ShelXT² structure solution program using Direct Methods and refined with the ShelXL³ refinement package using Least Squares minimisation. All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters and C-bound H atoms have been added geometrically and treated as riding on their parent atoms. O-bound H atom was located in a difference Fourier and N-H distance was restrained to 0.87 \AA using DFIX command and standard uncertainty (0.02 \AA).

1. Rigaku Oxford Diffraction, CrysAlisPro Software system, version 38.41o, Rigaku Corporation, Oxford, UK. (2015).

2. Sheldrick, G. M. SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. Found. Adv.* 71, 3–8 (2015).

3. Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 71, 3–8 (2015).

Preparation of *4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-2H-chromen-2-one (8a)*



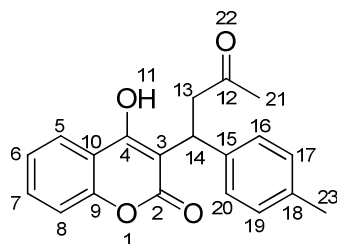
Chemical Formula: C₁₉H₁₆O₄
Molecular Weight: 308,33 g/mol

A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 577mg, 3.49 mmol, **9a**), benzalacetone (1 equiv., 510 mg, 3.49 mmol, **2a**) and DIPEA (5 % mole), was stirred at reflux in distilled water (0.6 M) for 20 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). The mixture was cooled at 0 °C during 2 h, whereupon a heavy gum separated out and the aqueous phase was decanted off. The gum was extracted by AcOEt /water (x3). The aqueous phase decanted off from the mixture was also extracted by AcOEt/water (x3). The organic layers was dried over MgSO₄ and reduced under pressure. The crude product was purified by flash chromatography (eluent gradient: cyclohexane/AcOEt : 7/3 then 5/5) and the desired product was obtained as a white powder, in 93% yield (1.01 g). R_f (cyclohexane/AcOEt : 5/5) = 0.52.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ (ppm) = 1.56 (s, 1H, H₂₁), 1.63 (s, 2H, H₂₁), 1.87-1.92 (m, 1H, H₁₃), 2.30-2.35 (m, 1H, H₁₃), 3.96-4.00 (m, 1H, H₁₄), 7.27 (m, 5H, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀), 7.35-7.40 (m, 2H, H₆, H₈), 7.61-7.67 (m, 1H, H₇) 7.83 (d, 1H, H₅, J = 7.8 Hz).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ (ppm) = 27.22 (C₁₄), 35.18 (C₂₁), 42.82 (C₁₃), 99.66 (C₃), 115.62 (C₁₀), 116.19 (C₈), 122.70 (C₅), 123.94 (C₆), 125.93 (C₁₈), 127.08 (C₁₆, C₂₀), 128.25 (C₁₇, C₁₉), 131.95 (C₇), 143.97 (C₁₅), 152.31 (C₉), 158.79 (C₄), 160.23 (C₂).

Preparation of *4-hydroxy-3-(3-oxo-1-p-tolylbutyl)-2H-chromen-2-one (8b)*



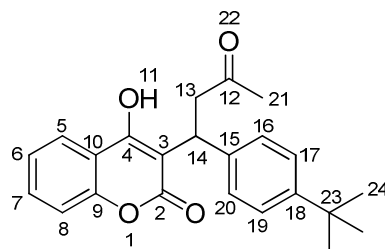
Chemical Formula: $C_{20}H_{18}O_4$
Molecular Weight: 322,35 g/mol

A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 510 mg, 3.09 mmol, **9a**), (*E*)-4-*p*-tolylbut-3-en-2-one (1 equiv., 500 mg, 3.09 mmol, **2b**) and DIPEA (5 % mole), was stirred at reflux in distilled water (0.6 M) for 4 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). The mixture was cooled at 0 °C during 2 h, whereupon a heavy gum separated out and the aqueous phase was decanted off. The gum was extracted by AcOEt /water (x3). The aqueous phase decanted off from the mixture was also extracted by AcOEt/water (x3). The organic layers was dried over $MgSO_4$ and reduced under pressure. The crude product was purified by flash chromatography (eluent gradient: cyclohexane/AcOEt : 7/3 then 5/5) and the desired product was obtained as a white powder in 47% yield (470 mg). R_f (cyclohexane/AcOEt : 5/5) = 0.44.

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ (ppm) = 1.57 (s, 1H, H_{21}), 1.63 (s, 2H, H_{21}), 1.84-1.90 (m, 1H, H_{13}), 2.24 (s, 1H, H_{23}), 2.27 (s, 2H, H_{23}), 2.28-2.33 (m, 1H, H_{13}), 3.92-3.96 (m, 1H, H_{14}), 7.03-7.06 (m, 4H, H_6, H_8, H_{17}, H_{19}), 7.36-7.40 (m, 2H, H_{16}, H_{20}), 7.61-7.65 (m, 1H, H_7), 7.83 (dd, 1H, H_5 , $J = 1.52 ; 8.3$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ (ppm) = 20.62 (C_{23}), 27.23 (C_{14}), 34.75 (C_{21}), 42.83 (C_{13}), 99.63 (C_3), 115.62 (C_{10}), 116.17 (C_8), 122.68 (C_5), 123.98 (C_6), 126.96 (C_{16}, C_{20}), 128.82 (C_{17}, C_{19}), 131.91 (C_7), 134.80 (C_{18}), 140.85 (C_{15}), 152.29 (C_9), 158.66 (C_4), 160.19 (C_2).

Preparation of *3-(1-(4-tert-butylphenyl)-3-oxobutyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one (8c)*



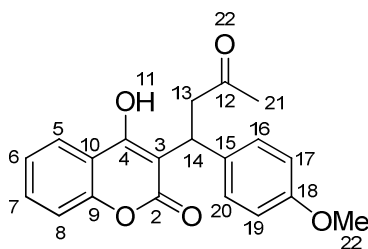
Chemical Formula: C₂₃H₂₄O₄
Molecular Weight: 364,43 g/mol

A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 413mg, 2.49 mmol, **9a**), (*E*)-4-(4-*tert*-butylphenyl) but-3-en-2-one (1 equiv., 505 mg, 2.49 mmol, **2c**) and DIPEA (5 % mole), was stirred at reflux in distilled water (0.6 M) for 48 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). The mixture was cooled at 0 °C during 2 h, whereupon a heavy gum separated out and the aqueous phase was decanted off. The gum was extracted by AcOEt /water (x3). The aqueous phase decanted off from the mixture was also extracted by AcOEt/water (x3). The organic layers was dried over MgSO₄ and reduced under pressure. The crude product was purified by flash chromatography (eluent gradient: cyclohexane/AcOEt : 8/2 then 7/3) and the desired product was obtained as a yellowish powder in 56% yield (483 mg). R_f (cyclohexane/AcOEt : 7/3) = 0.19.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ (ppm) = 1.19 (s, 9H, H₂₄), 1.56 (s, 1H, H₂₁), 1.63 (s, 2H, H₂₁), 2.31-2.34 (m, 1H, H₁₃), 2.66-2.68 (m, 1H, H₁₃), 3.92-3.96 (m, 1H, H₁₄), 7.08-7.10 (m, 2H, H₁₆, H₂₀), 7.23-7.28 (m, 2H, H₁₇, H₁₉), 7.37-7.41 (m, 2H, H₆, H₈), 7.61-7.65 (m, 1H, H₇), 7.81-7.84 (m, 1H, H₅).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) : δ (ppm) = 26.34 (C₁₄), 31.22 (C₂₄), 34.03 (C₂₁), 34.66 (C₂₃), 42.90 (C₁₃), 99.65 (C₃), 115.63 (C₁₀), 116.17 (C₈), 122.68 (C₅), 123.99 (C₆), 124.99 (C₁₇, C₁₉), 126.69 (C₁₆, C₂₀), 131.92 (C₇), 140.83 (C₁₅), 148.00 (C₁₈), 152.28 (C₉), 158.67 (C₄), 160.22 (C₂), 190.0 (C₁₂).

Preparation of **4-hydroxy-3-(1-(4-methoxyphenyl)-3-oxobutyl)-2H-chromen-2-one (8d)**



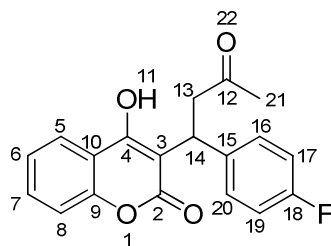
Chemical Formula: $C_{20}H_{18}O_5$
Molecular Weight: 338,35 g/mol

A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 469mg, 2.84 mmol, **9a**), (*E*)-4-(4-methoxyphenyl)but-3-en-2-one (1 equiv., 500 mg, 2.84 mmol, **2f**) and DIPEA (5 % mole), was stirred at reflux in distilled water (0.6 M) for 48 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :8/2). The mixture was cooled at 0 °C during 2 h, whereupon a heavy gum separated out and the aqueous phase was decanted off. The gum was extracted by AcOEt /water (x3). The aqueous phase decanted off from the mixture was also extracted by AcOEt/water (x3). The organic layers was dried over $MgSO_4$ and reduced under pressure. The crude product was purified by flash chromatography (eluent gradient: cyclohexane/AcOEt : 8/2 then 7/3) and the desired product was obtained as a yellow powder in 81% yield (780 mg). R_f (cyclohexane/AcOEt : 7/3) = 0.29.

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ (ppm)= 1.56 (s, 1H, H_{21}), 1.62 (s, 2H, H_{21}), 1.81-1.95 (m, 1H, H_{13}), 2.25-2.31 (m, 1H, H_{13}), 3.70 (s, 3H, H_{22}), 3.91-3.96 (m, 1H, H_{14}), 6.80 (m, 2H, H_{16} , H_{20}), 7.08-7.11 (m, 2H, H_6 , H_8), 7.38 (m, 2H, H_{17} , H_{19}), 7.60-7.66 (m, 1H, H_7), 7.81 (d, 1H, H_5 , $J = 8.0$ Hz).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) : δ (ppm) = 27.24 (C_{14}), 34.31 (C_{21}), 42.83 (C_{13}), 54.95 (C_{22}), 99.70 (C_3), 113.63 (C_{17} , C_{19}), 115.64 (C_{10}), 116.15 (C_8), 122.68 (C_5), 123.95 (C_6), 128.07 (C_{16} , C_{20}), 131.88 (C_7), 135.70 (C_{15}), 152.29 (C_9), 157.48 (C_{18}), 158.55 (C_4), 160.17 (C_2).

Preparation of **3-(1-(4-fluorophenyl)-3-oxobutyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one(8e)**



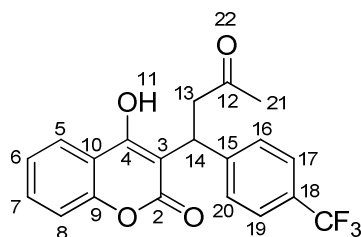
Chemical Formula: C₁₉H₁₅FO₄
Molecular Weight: 326,32 g/mol

A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 506 mg, 3.16 mmol, **9a**), (*E*)-4-(4-fluorophenyl)but-3-en-2-one (1 equiv., 506 mg, 3.16 mmol, **2d**) and DIPEA (5 % mole), was stirred at reflux in distilled water (0.6 M) for 4 h. The reaction was monitored by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). The mixture was cooled at 0 °C during 2 h, whereupon a heavy gum separated out and the aqueous phase was decanted off. The gum was extracted by AcOEt /water (x3). The aqueous phase decanted off from the mixture was also extracted by AcOEt/water (x3). The organic layers were dried over MgSO₄ and reduced under pressure. The crude product was purified by flash chromatography (eluent gradient: cyclohexane/AcOEt : 7/3 then 5/5) and the desired product was obtained as a yellow powder in 27% yield (281 mg). R_f (cyclohexane/AcOEt : 5/5) = 0.29.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ (ppm) = 1.57 (s, 1H, H₂₁), 1.64 (s, 2H, H₂₁), 2.10-2.17 (m, 1H, H₁₃), 2.28-2.35 (m, 1H, H₁₃), 3.98-4.02 (m, 1H, H₁₄), 7.00-7.08 (m, 2H, H₁₆, H₂₀), 7.20-7.26 (m, 2H, H₆, H₈), 7.37-7.42 (m, 2H, H₁₇, H₁₉), 7.62-7.66 (m, 1H, H₇), 7.82-7.84 (m, 1H, H₅).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) : δ (ppm) = 27.20 (C₁₄), 34.46 (C₂₁), 42.64 (C₁₃), 99.67 (C₃), 114.42 (d, C₁₇ or C₁₉ ²J_{C-F} = 21 Hz), 114.87 (d, C₁₉ or C₁₇ ²J_{C-F} = 21 Hz), 115.60 (C₁₀), 116.20 (C₈), 122.74 (C₅), 124.02 (C₆), 128.92 (d, C₁₆ or C₂₀ ³J_{C-F} = 8.0 Hz), 129.15 (d, C₂₀ or C₁₆ ³J_{C-F} = 8.0 Hz), 132.00 (C₇), 140.03 (C₁₅), 152.32 (C₉), 158.83 (C₁₈), 160.23 (C₄), 161.81 (C₂), 207.15 (C₁₂).

Preparation of *4-hydroxy-3-(3-oxo-1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)butyl)-2H-chromen-2-one* (**8f**)



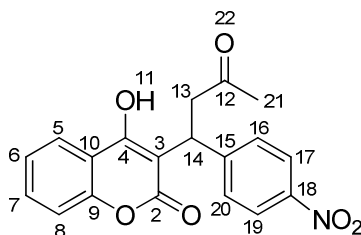
Chemical Formula: C₂₀H₁₅F₃O₄
Molecular Weight: 376,33 g/mol

A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 386 mg, 2.33 mmol, **9a**), (*E*)-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)but-3-en-2-one (1 equiv., 500 mg, 2.33 mmol, **2i**) and DIPEA (5 % mole), was stirred at reflux in distilled water (0.6 M) for 48 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). The mixture was cooled at 0 °C during 2 h, whereupon a heavy gum separated out and the aqueous phase was decanted off. The gum was extracted by AcOEt /water (x3). The aqueous phase decanted off from the mixture was also extracted by AcOEt/water (x3). The organic layers was dried over MgSO₄ and reduced under pressure. The crude product was purified by flash chromatography (cyclohexane/AcOEt : 7/3) and the desired product was obtained as a yellowish powder in 40% yield (350 mg). R_f (cyclohexane/AcOEt : 7/3) = 0.30

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ (ppm) = 1.59 (s, 1H, H₂₁), 1.66 (s, 2H, H₂₁), 1.86-1.93 (m, 1H, H₁₃), 2.33-2.37 (m, 1H, H₁₃), 4.07-4.11 (m, 1H, H₁₄), 7.38-7.46 (m, 4H, H₁₆, H₁₇, H₁₉, H₂₀), 7.57-7.69 (m, 3H, H₆, H₇, H₈), 7.84 (m, 1H, H₅).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) : δ (ppm) = 27.15 (C₁₄), 35.40 (C₂₁), 42.23 (C₁₃), 99.63 (C₃), 115.54 (C₁₀), 116.27 (C₈), 122.77 (C₅), 124.11 (CF₃), 125.11 (C₆), 128.01 (C₁₇, C₁₉, C₁₈), 128.83 (C₁₆, C₂₀), 132.16 (C₇), 149.04 (C₁₅), 152.35 (C₉), 159.20 (C₄), 160.32 (C₂).

Preparation of *4-hydroxy-3-(1-(4-nitrophenyl)-3-oxobutyl)-2H-chromen-2-one* (**8g**)



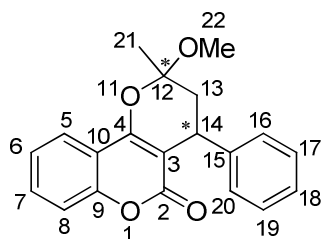
Chemical Formula: C₁₉H₁₅NO₆
Molecular Weight: 353,33 g/mol

A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 87 mg, 0.52 mmol, **9a**), (*E*)-4-(4-nitrophenyl) but-3-en-2-one (1 equiv., 100 mg, 0.52 mmol, **2h**) and DIPEA (5 % mole), was stirred at reflux in distilled water (0.6 M) for 18 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). The mixture was cooled at 0 °C during 2 h, whereupon a heavy gum separated out and the aqueous phase was decanted off. The gum was extracted by AcOEt /water (x3). The aqueous phase decanted off from the mixture was also extracted by AcOEt/water (x3). The organic layers was dried over MgSO₄ and reduced under pressure. The crude product was purified by flash chromatography (eluent gradient: cyclohexane/AcOEt : 7/3 then 5/5) and the desired product was obtained as yellow-brown powder, in 96% yield (176 mg). R_f (cyclohexane/AcOEt : 5/5) = 0.40

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ (ppm) = 1.61 (s, 1H, H₂₁), 1.67 (s, 2H, H₂₁), 2.32-2.34 (m, 1H, H₁₃), 2.66-2.67 (m, 1H, H₁₃), 4.14-4.20 (m, 1H, H₁₄), 7.39-7.54 (m, 4H, H₁₆, H₁₇, H₁₉, H₂₀), 7.64-7.68 (m, 1H, H₆), 7.85 (d, 1H, H₈, J = 7.3 Hz), 8.08-8.13 (m, 2H, H₅, H₇).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) : δ (ppm) = 30.71 (C₁₄), 35.20 (C₂₁), 45.14 (C₁₃), 99.61 (C₃), 116.30 (C₁₀), 116.41 (C₈), 122.80 (C₅), 122.97-123.47 (C₁₇, C₁₉), 124.17 (C₆), 128.57-128.89 (C₁₆, C₂₀), 132.25 (C₇), 141.07 (C₁₈), 145.63 (C₁₅), 152.38 (C₉), 159.32 (C₄), 160.38 (C₂).

Preparation of *2-methoxy-2-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one (7a)*



Chemical Formula: C₂₀H₁₈O₄
Molecular Weight: 322,35

4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-2H-chromen-2-one (1 equiv., 100 mg, 0.325 mmol, **8a**), was refluxed in HCl 4% MeOH (10 equiv., 1 g, 3.25 mmol) for 23 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt : 7/3). When the reaction was finished, the mixture was cool down at room temperature, 1mL of distilled water was added, followed by extraction with AcOEt (3x10 mL). The two main diastereoisomers (**7a**) were separated by combi flash (eluant : cyclohexane/AcOEt : 8/2) and were isolated to afford 60 mg (53%) of the first diastereoisomer as a white powder and 10 mg (9%) of the second diastereoisomer as a white powder too.

Dia 1 : H₁₄ in axial position (R_f = 0.33, cyclohexane/AcOEt : 8/2):

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.70 (s, 3H, H₂₁), 2.01 (dd, 1H, H_{13-ax}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13ax-14ax} = 11.8 Hz), 2.52 (dd, 1H, H_{13-eq}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{eq-ax} = 6.9 Hz), 3.36 (s, 3H, H₂₂), 4.16 (dd ,1H, H_{14-ax}, J_{ax-ax} = 11.8 Hz, J_{ax-eq} = 6.9 Hz), 7.24-7.26 (m, 2H, H₁₆, H₂₀), 7.28-7.35 (m, 5H, H₆, H₈, H₁₇, H₁₈, H₁₉), 7.53-7.58 (ddd, 1H ,H₇, J = 9.4, 7.4, 1.7 Hz), 7.91 (dd, 1H ,H₅, J = 8.0, 1.3 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.35 (C₂₁), 35.60 (C₁₄), 43.52 (C₁₃), 49.94 (C₂₂), 101.44 (C₃), 105.63 (C₁₂), 115.80 (C₁₀), 116.72 (C₈), 122.46 (C₅), 123.84(C₆), 126.54 (C₁₈), 127.16 (C₁₆, C₂₀ or C₁₇, C₁₉), 128.72 (C₁₇, C₁₉ or C₁₆, C₂₀), 131.62 (C₇), 143.55 (C₁₅), 153.14 (C₉), 158.25 (C₄), 161.19 (C₂).

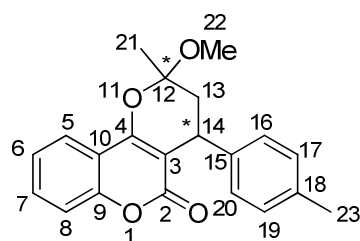
Dia 2 : H₁₄ in equatorial position : (R_f = 0.29, cyclohexane/AcOEt : 8/2):

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.69 (s, 3H, H₂₁), 2.38 (dd, 1H, H_{13-ax}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13ax-14eq} = 7.4 Hz), 2.52 (dd, 1H, H_{13-eq}, J_{gem} = 14.1 Hz, J_{13eq-eq} = 3.8 Hz), 3.29 (s, 3H,

H₂₂), 4.19 (dd, 1H, H_{14-eq}, $J_{eq-ax} = 7.2$ Hz, $J_{eq-eq} = 3.7$ Hz), 7.21-7.32 (m, 5H, H₁₆, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀), 7.34-7.43 (m, 2H, H₆, H₈), 7.60-7.62 (m, 1H, H₇), 7.96 (dd, 1H, H₅, $J = 7.8, 1.2$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.58 (C₂₁), 35.45 (C₁₄), 39.93 (C₁₃), 49.41 (C₂₂), 102.58 (C₃), 103.30 (C₁₂), 115.89 (C₁₀), 116.86 (C₈), 122.67 (C₅), 123.97 (C₆), 126.26 (C₁₈), 127.52 (C₁₆, C₂₀ or C₁₇, C₁₉), 128.21 (C₁₇, C₁₉ or C₁₆, C₂₀), 131.87 (C₇), 143.18 (C₁₅), 153.11 (C₉), 159.07 (C₄), 162.00 (C₂).

Preparation of *2-methoxy-2-methyl-(1-(p-tolyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one (7b)*



Chemical Formula: C₂₁H₂₀O₄
Molecular Weight: 336,38

4-hydroxy-3-(3-oxo-1-*p*-tolylbutyl)-2H-chromen-2-one (1 equiv., 100 mg, 0.31 mmol, **8b**), was refluxed in HCl 4% MeOH (10 equiv., 1 g, 3.1 mmol) for 31 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt : 7/3). When the reaction was finished, the mixture was cool down at room temperature, 1mL of distilled water was added, followed by extraction with AcOEt (3x10 mL). The two main diastereoisomeres (**7b**) were separated by flash chromatography (eluant: cyclohexane/AcOEt : 8/2 and were isolated to afford 48 mg (46%) of the first diastereoisomer as a yellow powder and 13 mg (13%) of the second diastereoisomer as a yellow oil. (AMR 166)

Dia 1 : H₁₄ in axial position: (Rf = 0.42, cyclohexane/AcOEt : 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.82 (s, 3H, H₂₁), 2.13 (t, 1H, H_{13-ax}, J_{gem} = 13.7, J_{13ax-14ax} = 12.0 Hz), 2.46 (s, 3H, H₂₃), 2.62 (dd, 1H, H_{13-eq}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13eq-14ax} = 6.9 Hz), 3.48 (s, 3H, H₂₂), 4.24 (dd, 1H, H_{14-ax}, J_{ax-ax} = 11.7 Hz, J_{ax-eq} = 6.9 Hz), 7.26 (m, 4H, H₁₆, H₁₇, H₁₉, H₂₀), 7.40-7.47 (m, 2H, H₆, H₈), 7.67 (tb, 1H, H₇, J = 7.6 Hz), 8.03 (d, 1H, H₅, J = 7.7 Hz).

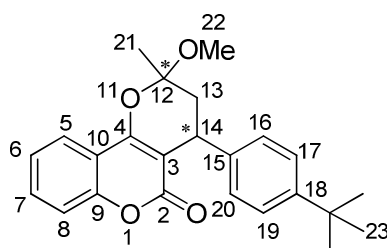
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 21.19 (C₂₃), 22.35 (C₂₁), 35.16 (C₁₄), 43.58 (C₁₃), 49.92 (C₂₂), 101.43 (C₃), 105.78 (C₁₂), 115.82 (C₁₀), 116.70 (C₈), 122.44 (C₅), 123.80 (C₆), 127.01 (C₁₆, C₂₀ or C₁₇, C₁₉), 129.45 (C₁₇, C₁₉ or C₁₆, C₂₀), 131.56 (C₇), 135.96 (C₁₈), 140.47 (C₁₅), 153.12 (C₉), 158.15 (C₄), 161.21 (C₂).

Dia 2 : H₁₄ in equatorial position (Rf = 0.35, cyclohexane/AcOEt : 8/2):

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.61 (s, 3H, H₂₁), 2.48 (s, 3H, H₂₃), 2.53-2.65 (m, 2H, H_{13-ax}, H_{13-eq}), 3.43 (s, 3H, H₂₂), 4.27-4.30 (m, 4H, H₁₆, H₁₇, H₁₉, H₂₀), 7.48-7.55 (m, 2H, H₆, H₈), 7.74 (tb, 1H, H₇, J = 7.4 Hz), 8.08 (d, 1H, H₅, J = 7.7 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) : δ (ppm) = 21.21 (C_{23}), 22.59 (C_{21}), 35.16 (C_{14}), 40.05 (C_{13}), 49.42 (C_{22}), 102.57 (C_3), 103.54 (C_{12}), 115.79 (C_{10}), 116.85 (C_8), 122.65 (C_5), 123.94 (C_6), 127.38 (C_{16} , C_{20} or C_{17} , C_{19}), 129.02 (C_{17} , C_{19} or C_{16} , C_{20}), 131.81 (C_7), 135.68 (C_{18}), 140.18 (C_{15}), 153.10 (C_9), 158.96 (C_4), 161.99 (C_2).

Preparation of *2-methoxy-2-methyl-(1-(4-tert-butylphenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one (7c)*



Chemical Formula: $C_{24}H_{26}O_4$
Molecular Weight: 378,46

3-(1-(4-tert-butylphenyl)-3-oxobutyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one (1 equiv., 100 mg, 0.27 mmol, **8c**), was refluxed in HCl 4% MeOH (10 equiv., 1 g, 2.7 mmol) for 52 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt : 7/3). When the reaction was finished, the mixture was cool down at room temperature, 1mL of distilled water was added, followed by extraction with AcOEt (3x10 mL). The two main diastereoisomers (**7c**) were separated by flash chromatography (eluant : cyclohexane/AcOEt : 8/2) and were isolated to afford 55 mg (57%) of the first diastereoisomer as a white powder and 15 mg (16%) of the second diastereoisomer as a white powder too.

Dia 1 : H_{14} in axial position ($R_f = 0.48$, cyclohexane/AcOEt : 8/2):

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.26 (s, 9H, H_{23}), 1.64 (s, 3H, H_{21}), 1.96 (t, 1H, H_{13-ax} , $J_{gem} = J_{13ax-14ax} = 13.8$ Hz), 2.45 (dd, 1H, H_{13-eq} , $J_{gem} = 14.0$ Hz, $J_{13eq-14ax} = 7.0$ Hz), 3.30 (s, 3H, H_{22}), 4.07 (dd, 1H, H_{14-ax} , $J_{ax-ax} = 11.6$ Hz, $J_{ax-eq} = 7.1$ Hz), 7.10-7.12 (m, 2H, H_{16} , H_{20}), 7.26-7.29 (m, 4H, H_6 , H_8 , H_{17} , H_{19}), 7.50 (tb, 1H, H_7 , $J = 7.7$ Hz), 7.85 (d, 1H, H_5 , $J = 8.3$ Hz).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.36 (C_{21}), 31.51 (C_{23}), 35.07 (C_{14}), 43.59 (C_{13}), 49.92 (C_{22}), 101.46 (C_3), 105.87 (C_{12}), 115.86 (C_{10}), 116.70 (C_8), 122.46 (C_5), 123.80 (C_6), 125.62 (C_{17} , C_{19}), 126.75 (C_{16} , C_{20}), 131.56 (C_7), 140.32 (C_{15}), 149.06 (C_{18}), 153.12 (C_9), 158.12 (C_4), 161.23 (C_2).

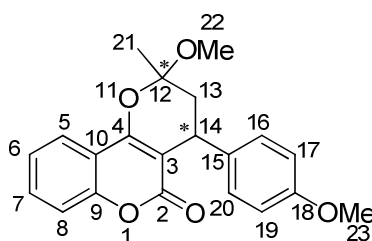
Dia 2 : H_{14} in equatorial position : ($R_f = 0.39$, cyclohexane/AcOEt : 8/2):

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.28 (s, 9H, H_{23}), 1.63 (s, 3H, H_{21}), 2.29 (dd, 1H, H_{13-ax} , $J_{gem} = 14.1$ Hz, $J_{13ax-14ax} = 7.4$ Hz), 2.45 (dd, 1H, H_{13-eq} , $J_{gem} = 14.0$ Hz, $J_{13eq-14eq} = 4.1$

Hz), 3.25 (s, 3H, H₂₂), 4.10-4.12 (m, 1H, H_{14-eq}), 7.09-7.12 (m, 2H, H₁₆, H₂₀), 7.25-7.37 (m, 4H, H₆, H₈, H₁₇, H₁₉), 7.56 (tb, 1H, H₇, $J = 7.3$ Hz), 7.90 (d, 1H, H₅, $J = 7.8$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.56 (C₂₁), 31.54 (C₂₃), 35.18 (C₁₄), 39.97 (C₁₃), 49.46 (C₂₂), 102.68 (C₃), 103.61 (C₁₂), 115.82 (C₁₀), 116.83 (C₈), 122.69 (C₅), 123.93 (C₆), 125.18 (C₁₇, C₁₉), 127.07 (C₁₆, C₂₀), 131.80 (C₇), 139.98 (C₁₅), 148.70 (C₁₈), 153.09 (C₉), 158.97 (C₄), 162.00 (C₂).

Preparation of **2-methoxy-2-methyl-(1-(4-methoxyphenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one (7d)**



Chemical Formula: C₂₁H₂₀O₅
Molecular Weight: 352.38

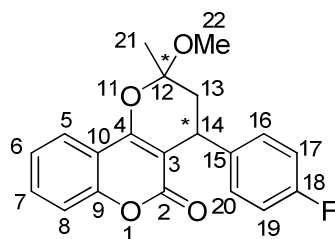
4-hydroxy-3-(1-(4-methoxyphenyl)-3-oxobutyl)-2H-chromen-2-one (1 equiv., 100 mg, 0.296 mmol, **8d**), was refluxed in HCl 4% MeOH (10 equiv., 1 g, 2.96 mmol) for 66 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). When the reaction was finished, the mixture was cool down at room temperature, 1mL of distilled water was added, followed by extraction with AcOEt (3x10 mL). The two main diastereoisomers (**7d**) were not separated by flash chromatography (eluant : cyclohexane/AcOEt : 8/2) and only one diastereoisomer was obtained, as a white powder, in a yield 63 % (66 mg).

Dia 1 : H₁₄ in axial position : (R_f = 0.39, cyclohexane/AcOEt : 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.67 (s, 3H, H₂₁), 1.96 (dd, 1H, H_{13-ax}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13ax-14ax} = 11.7 Hz), 2.46 (dd, 1H, H_{13-eq}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13eq-14ax} = 7.0 Hz), 3.33 (s, 3H, H₂₂), 3.77 (s, 3H, H₂₃), 4.08 (dd, 1H, H_{14-ax}, J_{ax-ax} = 11.9 Hz, J_{ax-eq} = 7.2 Hz), 6.82-6.85 (m, 2H, H₁₇, H₁₉), 7.13-7.16 (m, 2H, H₁₆, H₂₀), 7.26-7.32 (m, 2H, H₆, H₈), 7.53 (tb, 1H, H₇, J = 8.6 Hz), 7.89 (d, 1H, H₅, J = 6.7 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.36 (C₂₁), 34.75 (C₁₄), 43.56 (C₁₃), 49.92 (C₂₂), 55.31 (C₂₃), 101.49 (C₃), 105.86 (C₁₂), 114.17 (C₁₇, C₁₉), 115.83 (C₁₀), 116.70 (C₈), 122.46 (C₅), 123.81 (C₆), 128.12 (C₁₆, C₂₀), 131.57 (C₇), 135.46 (C₁₅), 153.12 (C₉), 158.08 (C₁₈), 158.21 (C₄), 161.20 (C₂).

Preparation of *2-methoxy-2-methyl-(1-(4-fluorophenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one (7e)*



Chemical Formula: C₂₀H₁₇FO₄
Molecular Weight: 340,34

3-(1-(4-fluorophenyl)-3-oxobutyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one (1 equiv., 100 mg, 0.29 mmol, **8e**), was refluxed in HCl 4% MeOH (10 equiv., 1 g, 2.90 mmol) for 31 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). When the reaction was finished, the mixture was cool down at room temperature, 1mL of distilled water was added, followed by extraction with AcOEt (3x10 mL) The two main diastereoisomers (**7e**) were separated by flash chromatography (eluant: cyclohexane/AcOEt : 8/2) and were isolated to afford 47 mg (44%) of the first diastereoisomer as a white powder and 21 mg (19%) , of the second diastereoisomer as a yellow powder.

Dia 1 : H₁₄ in axial position: (Rf = 0.34, cyclohexane/AcOEt : 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.98 (s, 3H, H₂₁), 2.24 (dd, 1H, H_{13-ax}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13ax-14ax} = 12 Hz), 2.75 (dd, 1H, H_{13-eq}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13eq-14ax} = 6.9 Hz), 3.62 (s, 3H, H₂₂), 4.41 (dd ,1H, H_{14-ax}, J_{ax-ax} = 11.8 Hz, J_{ax-eq} = 6.9 Hz), 7.23-7.29 (m, 2H, H₁₇, H₁₉), 7.45-7.49 (m, 2H, H₁₆, H₂₀), 7.55-7.62 (m, 2H, H₆, H₈), 7.82 (m, 1H, H₇), 8.17 (m, 1H, H₅).

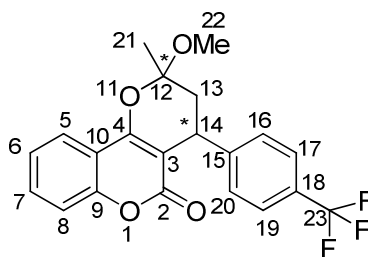
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.31 (C₂₁), 34.92 (C₁₄), 43.50 (C₁₃), 49.96 (C₂₂), 101.45 (C₃), 105.40 (C₁₂), 115.51 (d, C₁₇, C₁₉, ²J_{C-F} = 21.8 Hz), 115.71 (C₁₀), 116.72 (C₈), 122.51 (C₅), 123.92 (C₆), 128.60 (d, C₁₆, C₂₀, ³J_{C-F} = 8.3 Hz), 131.74 (C₇), 139.16 (C₁₅), 153.12 (C₉), 159.14 (d, C₁₈, J_{C-F} = 120.8 Hz), 161.17 (C₄), 163.17 (C₂).

Dia 2 : H₁₄ in equatorial position : (Rf = 0.27, cyclohexane/AcOEt : 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.96 (s, 3H, H₂₁), 2.64 (dd, 1H, H_{13-ax}, J_{gem} = 14.1 Hz, J_{13ax-14eq} = 7.3 Hz), 2.75 (dd, 1H, H_{13-eq}, J_{gem} = 14.1 Hz, J_{13eq-14eq} = 3.0 Hz), 3.54 (s, 3H, H₂₂), 4.45 (m ,1H, H_{14-eq}), 7.23-7.29 (m, 2H, H₁₇, H₁₉), 7.45-7.49 (m, 2H, H₁₆, H₂₀), 7.63-7.70 (m, 2H, H₆, H₈), 7.89 (t, 1H, H₇, J = 7.3 Hz), 8.23 (d, 1H, H₅, J = 7.8 Hz).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) : δ (ppm) = 22.63 (C_{21}), 34.57 (C_{14}), 39.87 (C_{13}), 49.38 (C_{22}), 102.42 (C_3), 103.12 (C_{12}), 115.00 (d, C_{17} , C_{19} , $^2J_{\text{C-F}} = 21.8$ Hz), 115.65 (C_{10}), 116.88 (C_8), 122.68 (C_5), 124.07 (C_6), 129.0 (d, C_{16} , C_{20} , $^3J_{\text{C-F}} = 8.3$ Hz), 132.00 (C_7), 138.87 (C_{15}), 153.09 (C_9), 159.42 (C_{18}), 162.02 (C_4), 163.01 (C_2).

Preparation of *2-methoxy-2-methyl-(1-(4-trifluoromethyl)phenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one (7f)*



Chemical Formula: C₂₁H₁₇F₃O₄
Molecular Weight: 390,35

4-hydroxy-3-(3-oxo-1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)butyl)-2H-chromen-2-one (1 equiv., 100 mg, 0.27 mmol, **8f**), was refluxed in HCl 4% MeOH (10 equiv., 1 g, 2.7 mmol) for 23 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane, AcOEt :7/3). When the reaction was finished, the mixture was cool down at room temperature; 1 mL of distilled water was added, followed by extraction with AcOEt (3x10 mL). The two main diastereoisomers (**7f**) were separated by flash chromatography (eluant : cyclohexane/AcOEt : 8/2) and were isolated to afford 42 mg (38%) of the first diastereoisomer as a yellow powder and 9 mg (8%) of the second diastereoisomer as a yellow powder too.

Dia 1: H₁₄ in axial position (42 mg): (R_f = 0.36, cyclohexane/AcOEt : 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 1.70 (s, 3H, H₂₁), 1.93 (dd, 1H, H_{13-ax}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13ax-14ax} = 12 Hz), 2.47 (dd, 1H, H_{13-eq}, J_{gem} = 14.0 Hz, J_{13eq-14ax} = 6.9 Hz), 3.34 (s, 3H, H₂₂), 4.18 (dd, 1H, H_{14-ax}, J_{ax-ax} = 11.9 Hz, J_{ax-eq} = 6.8 Hz), 7.29-7.35 (m, 4H, H₆, H₈, H₁₆, H₂₀), 7.52-7.58 (m, 3H, H₇, H₁₇, H₁₉), 7.55-7.62 (m, 2H, H₆, H₈), 7.89 (dd, 1H, H₅, J = 8.3, 1.8 Hz).

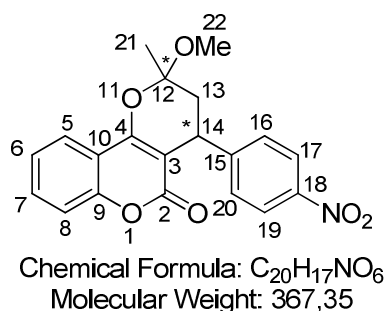
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.32 (C₂₁), 35.61 (C₁₄), 43.26 (C₁₃), 50.05 (C₂₂), 101.40 (C₃), 104.80 (C₁₂), 115.66 (C₁₀), 116.85 (C₈), 122.56 (C₅), 124.04 (C₆), 128.8 (q, C₁₈, ²J_{C-F} = 32.2 Hz), 125.75 (q, C₁₇, C₁₉, ³J_{C-F} = 3.8 Hz), 125.75 (C₁₆, C₂₀), 131.96 (C₇), 147.86 (C₁₅), 153.19 (C₉), 158.72 (C₄), 161.23 (C₂), C₂₃-F non visible.

Dia 2 : H₁₄ in equatorial position (9 mg): (R_f = 0.27, cyclohexane/AcOEt : 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ 1.65 (s, 3H, H₂₁), 2.35 (dd, 1H, H_{13-ax}, J_{gem} = 14.2 Hz, J_{13ax-14eq} = 7.4 Hz), 2.48 (dd, 1H, H_{13-eq}, J_{gem} = 14.2 Hz, J_{13eq-14eq} = 2.8 Hz), 3.19 (s, 3H, H₂₂), 4.19

(m, 1H, H_{14-eq}), 7.29 (d, 2H, H₁₆, H₂₀, $J = 8.3$ Hz), 7.34-7.39 (m, 2H, H₆, H₈), 7.50 (d, 2H, H₁₇, H₁₉, $J = 8.1$ Hz), 7.57 (td, 1H, H₇, $J = 7.4$ Hz, 1.6 Hz), 7.92 (dd, 1H, H₅, $J = 7.9$ Hz, 1.5 Hz).
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.62 (C₂₁), 35.00 (C₁₄), 39.60 (C₁₃), 49.33 (C₂₂), 102.30 (C₃), 102.47 (C₁₂), 115.57 (C₁₀), 116.99 (C₈), 122.71 (C₅), 124.18 (C₆), 125.15 (q, C₁₇, C₁₉, $^3J_{C-F} = 3.8$ Hz), 128.00 (C₁₆, C₂₀), 132.19 (C₇), 147.46 (C₁₅), 153.17 (C₉), 159.31 (C₄), 162.07 (C₂), C₁₈ et C₂₃-F non visible.

Preparation of *2-methoxy-2-methyl-(1-(4-nitrophenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one (7g)*



4-hydroxy-3-(1-(4-nitrophenyl)-3-oxobutyl)-2H-chromen-2-one (1 equiv., 100 mg, 0.283 mmol, **8g**), was refluxed in HCl 4% MeOH (10 equiv., 1 g, 2.83 mmol) for 22 h. The reaction was monitoring by TLC (cyclohexane/ AcOEt :7/3). When the reaction was finished, the mixture was cool down at room temperature, 1mL of distilled water was added, followed by extraction with AcOEt (3x10 mL). The two main diastereoisomers (**7g**) were separated by flash chromatography (eluant: cyclohexane/AcOEt : 8/2) and were isolated to afford 63 mg (64%) of the first diastereoisomer as a white powder and 11 mg (12%) of the second diastereoisomer as a yellow powder.

Dia 1 : H₁₄ in axial position : (R_f = 0.24, cyclohexane/AcOEt : 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ 1.56 (s, 3H, H₂₁), 1.95 (dd, 1H, H_{13-ax}, $J_{gem} = 13.9$ Hz, $J_{13ax-14ax} = 12.1$ Hz), 2.48 (dd, 1H, H_{13-eq}, $J_{gem} = 13.9$ Hz, $J_{13eq-14ax} = 6.8$ Hz), 3.35 (s, 3H, H₂₂), 4.24 (dd, 1H, H_{14-ax}, $J_{ax-ax} = 12.1$ Hz, $J_{ax-eq} = 6.8$ Hz), 7.30-7.35 (m, 2H, H₆, H₈), 7.38 (d, 2H, H₁₆, H₂₀, $J = 8.8$ Hz), 7.57 (ddd, 1H, H₇, $J = 9.4, 7.3, 1.6$ Hz), 7.89 (dd, 1H, H₅, $J = 9.7$ Hz, 1.3 Hz), 8.16 (d, 2H, H₁₇, H₁₉, $J = 8.8$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.31 (C₂₁), 35.72 (C₁₄), 42.91 (C₁₃), 50.11 (C₂₂), 101.36 (C₃), 104.29 (C₁₂), 115.54 (C₁₀), 116.90 (C₈), 122.60 (C₅), 124.15 (C₆, C₁₇, C₁₉), 128.11 (C₁₆, C₂₀), 132.16 (C₇), 146.79 (C₁₈), 151.65 (C₁₅), 153.20 (C₉), 158.95 (C₄), 161.21 (C₂).

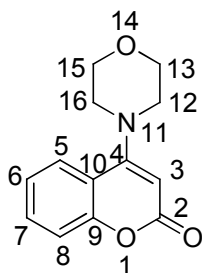
Dia 2 : H₁₄ in equatorial position : (R_f = 0.16, cyclohexane/AcOEt : 8/2)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ 1.66 (s, 3H, H₂₁), 2.37 (dd, 1H, H_{13-ax}, $J_{gem} = 14.2$ Hz, $J_{13ax-14eq} = 7.4$ Hz), 2.50 (dd, 1H, H_{13-eq}, $J_{gem} = 14.2$ Hz, $J_{13eq-14eq} = 2.5$ Hz), 3.17 (s, 3H, H₂₂), 4.22 (dd, 1H, H_{14-eq}, $J_{eq-ax} = 7.3$ Hz, $J_{eq-eq} = 2.5$ Hz), 7.34 (d, 2H, H₁₆, H₂₀, $J = 8.4$ Hz), 7.38-7.41

(m, 2H, H₆, H₈), 7.61 (ddd, 1H, H₇, $J = 9.2, 7.3, 1.6$ Hz), 7.92 (dd, 1H, H₅, $J = 7.9$ Hz, 1.5 Hz), 8.13 (d, 2H, H₁₇, H₁₉, $J = 8.8$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 22.61 (C₂₁), 34.92 (C₁₄), 39.45 (C₁₃), 49.32 (C₂₂), 101.94 (C₃), 102.18 (C₁₂), 116.06 (C₁₀), 117.06 (C₈), 122.75 (C₅), 123.46 (C₁₇, C₁₉), 124.30 (C₆), 128.54 (C₁₆, C₂₀), 132.40 (C₇), 146.43 (C₁₈), 151.29 (C₁₅), 153.18 (C₉), 159.12 (C₄), 162.10 (C₂).

Preparation of *4-morpholino-2H-chromen-2-one (63a)*



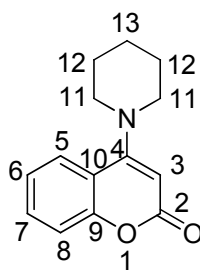
Chemical Formula: C₁₃H₁₃NO₃
Molecular Weight: 231,25

A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 165 mg, 1 mmol), morpholine (2.3 equiv., 0.2 mL 2.3 mmol) were introduced in a capped 10 mL MW-vessel and placed in a microwave oven (CEM Discover 1TM, 300W) under ambient pressure for 10 min, in 120°C, at maximal power (300W). The reaction was monitored by TLC (cyclohexane/AcOEt :8/2). The reaction mixture was then dissolved in methanol (5ml) and the solution was treated with 0.1M aqueous sodium hydroxide (3ml). The crude product was extracted with AcOEt (3x25mL). The organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product (**5a**) was isolated in a yellow powder. Yield: 63% (144.8 mg).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 3.24 (t, 2H, H₁₂, H₁₆ *J* = 4.7 Hz), 3.92 (t, 2H, H₁₃, H₁₅, *J* = 4.7 Hz), 5.72 (s, 1H, H₃), 7.22-7.26 (m, 1H, H₆, *J* = 16.3 Hz), 7.31-7.34 (m, 1H, H₈), 7.49 (ddd, 1H, H₇, *J*_{H7-H5} = 8.4Hz, *J* = 7.2 Hz, *J*_{H7-H5} = 1.6Hz), 7.59 (dd, 1H, H₅, *J*_{H5-H8} = 8.0Hz, *J*_{H5-H8} = 1.5Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 51.51 (C₁₂, C₁₆), 66.41 (C₁₃, C₁₅), 98.20 (C₃), 116.08 (C₁₀), 117.90 (C₈), 123.56 (C₅), 124.68 (C₆), 131.68 (C₇), 154.25 (C₉), 161.13 (C₄), 162.37 (C₂).

Preparation of *4-(piperidin-1-yl)-2H-chromen-2-one (63b)*



Chemical Formula: C₁₄H₁₅NO₂
Molecular Weight: 229,27

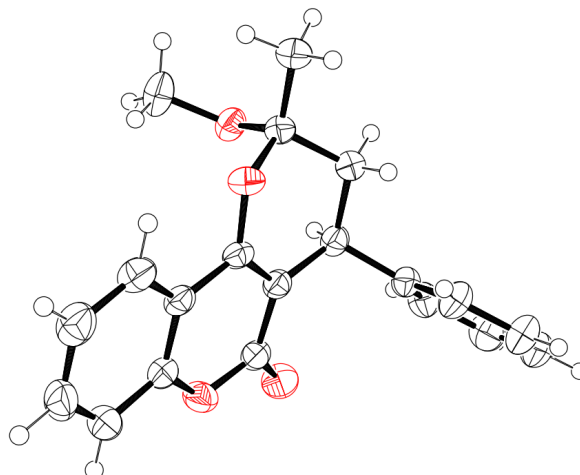
A mixture of 4-hydroxycoumarin (1 equiv., 165 mg, 1 mmol), piperidine (1 equiv., 99 μ L 1 mmol) were introduced in a capped 10 mL MW-vessel and placed in a microwave oven (CEM Discover 1TM, 300W) under ambient pressure for 15 min, in 100°C, at maximal power (300W). The reaction was monitored by TLC (cyclohexane/AcOEt :6/4). The reaction mixture was directly concentrated under reduced pressure and was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: cyclohexane/AcOEt : 6/4) to afford a yellow powder (**5b**). Yield : 32% (92 mg).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 1.67-1.68 (m, 2H, H₁₃), 1.75-1.79 (m, 4H, H₁₂), 3.18 (t, 4H, H₁₁, J = 5.6 Hz), 5.64 (s, 1H, H₃), 7.19 (ddd, 1H, H₆, J_{H6-H8} = 8.3 Hz, J_{H6-H7} = 7.1 Hz, J_{H6-H8} = 1.1 Hz), 7.26 (dd, 1H, H₈, J_{H8-H6} = 8.3 Hz, J_{H8-H6} = 1.2 Hz), 7.43 (ddd, 1H, H₇, J_{H7-H5} = 8.7 Hz, J_{H7-H6} = 7.1 Hz, J_{H7-H5} = 1.4 Hz), 7.55 (dd, 1H, H₅, J_{H5-H7} = 8.0 Hz, J_{H5-H7} = 1.6 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm) = 24.25 (2*C₁₃), 25.59 (4*C₁₂), 52.26 (4*C₁₁), 96.83 (C₃), 116.62 (C₁₀), 117.62 (C₈), 123.29 (C₅), 125.00 (C₆), 131.26 (C₇), 154.15 (C₉), 161.87 (C₂), 162.76 (C₄).

Caractérisation of cyclocoumarol diastereoisomers (4-H et 4-OMe) using cristallography by X-ray (Collaboration Dr Florent Blanchard, Dr Pascal Retailleau, ICSN, Gif-sur-Yvette).

Major diastereoisomer of cyclocoumarol (4-H, 7a dia1)



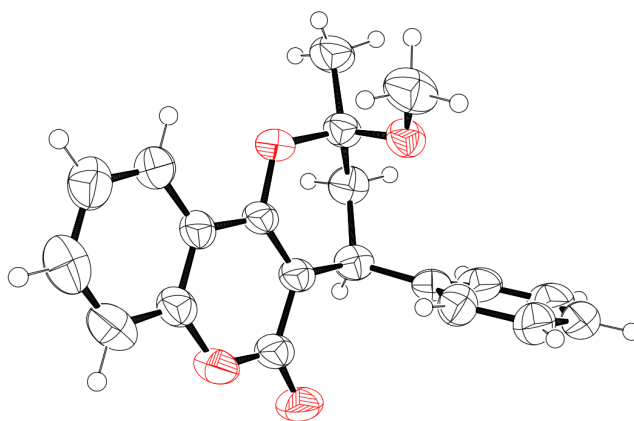
CCDC number

Empirical formula	C ₂₀ H ₁₈ O ₄
Formula weight	322.34
Temperature/K	292.7(5)
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 ₁ /n
a/Å	5.8669(3)
b/Å	16.7563(8)
c/Å	16.4159(9)
β/°	94.830(5)
Volume/Å ³	1608.08(15)
Z	4
ρ _{calc} /cm ³	1.331
μ/mm ⁻¹	0.092
F(000)	680.0
Crystal size/mm ³	0.15 × 0.13 × 0.05
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)

2 Θ range for data collection/ $^{\circ}$	6.962 to 60.034
	-7 \leq h \leq 6, -23 \leq k \leq 23, -23 \leq l \leq 21
Index ranges	
Reflections collected	16505
Independent reflections	4107 [$R_{\text{int}} = 0.0458$, $R_{\text{sigma}} = 0.0464$]
Data/restraints/parameters	4107/0/219
Goodness-of-fit on F^2	1.074
Final R indexes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0478$, $wR_2 = 0.1266$
Final R indexes [all data]	$R_1 = 0.0749$, $wR_2 = 0.1397$
Largest diff. peak/hole / e \AA^{-3}	0.32/-0.42

Table 1 : Crystal data and structure refinement for 4H-cyclo-dia_majoritaire.

Minor diastereoisomer of cyclocoumarol (4-H, 7a dia2)



CCDC number

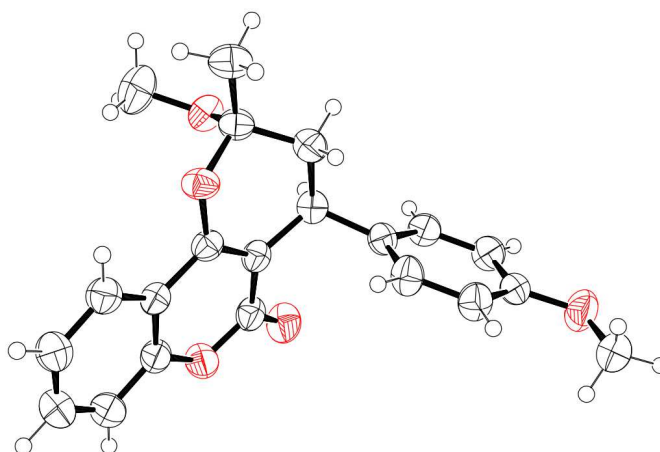
Empirical formula	C ₂₀ H ₁₈ O ₄
Formula weight	322.34
Temperature/K	292.6(4)
Crystal system	monoclinic
Space group	I2/a
a/Å	20.1207(12)
b/Å	8.5036(4)
c/Å	19.9586(14)
β/°	107.014(7)
Volume/Å ³	3265.5(4)
Z	8
ρ _{calc} /cm ³	1.311
μ/mm ⁻¹	0.091
F(000)	1360.0
Crystal size/mm ³	0.1 × 0.1 × 0.03
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2θ range for data collection/°	7.124 to 60.164
Index ranges	-26 ≤ h ≤ 27, -11 ≤ k ≤ 10, -27 ≤ l ≤ 23
Reflections collected	18115
Independent reflections	4158 [R _{int} = 0.0587, R _{sigma} = 0.0579]
Data/restraints/parameters	4158/0/219
Goodness-of-fit on F ²	1.033
Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.0549, wR ₂ = 0.1161
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.1020, wR ₂ = 0.1328

Largest diff. peak/hole / e Å⁻³

0.18/-0.18

Table 2 : Crystal data and structure refinement for 4H_cyclo_dia_minoritaire.

Major diastereoisomere of 4-OMe cyclocoumarol



CCDC number

Empirical formula	C ₂₁ H ₂₀ O ₅
Formula weight	352.37
Temperature/K	292.5(7)
Crystal system	monoclinic
Space group	C2/c
a/Å	23.694(2)
b/Å	5.6932(4)
c/Å	26.775(3)
β/°	102.720(9)
Volume/Å ³	3523.2(6)
Z	8
ρ _{calc} /cm ³	1.329

μ/mm^{-1}	0.095
F(000)	1488.0
Crystal size/ mm^3	$0.1 \times 0.03 \times 0.03$
Radiation	MoK α ($\lambda = 0.71073$)
2Θ range for data collection/ $^\circ$	7.372 to 59.93
Index ranges	$-29 \leq h \leq 31,$ $-7 \leq k \leq 7,$ $-34 \leq l \leq 36$
Reflections collected	19052
Independent reflections	4454 [$R_{\text{int}} = 0.0552, R_{\text{sigma}} = 0.0590$]
Data/restraints/parameters	4454/0/238
Goodness-of-fit on F^2	1.016
Final R indexes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0490,$ $wR_2 = 0.1170$
Final R indexes [all data]	$R_1 = 0.1036,$ $wR_2 = 0.1362$
Largest diff. peak/hole / $e \text{ \AA}^{-3}$	0.28/-0.32

Table 3: Crystal data and structure refinement for 4-OMe_cyclocoumanol_dia_majoritaire

VI.2 Biologie

Materials and Methods

Assay of PGE₂ production

Raw 264.7 cells were seeded at $2 \cdot 10^5$ cells/well during 24h, then 10 μ M of each synthesized cyclocoumarol derivatives was added. After 2h, LPS (10 ng/mL) was added in the culture medium during 24h. The PGE₂ levels were quantified in culture media supernatants from control cells by enzyme immunoassay using an EIA Kit (Cayman Chemical). The results were expressed by the standard deviation average of ± 8 independent experiences. NS-398, a well-known COX-2 selective inhibitor was used as reference.

Assay of COX-1 activity

The same protocol described before was used with the exception of the absence of LPS and deprivation of SVF (1%) to measure the COX-1 activity. The PGE₂ levels were quantified in culture media supernatants from control cells by enzyme immunoassay using an EIA Kit (Cayman Chemical). The results were expressed by the standard deviation average of ± 6 independent experiences.

Assay of dose-dependent response for **7d**

The same protocol described in Assay of PGE₂ production section was used with the exception of the concentration of the molecules (1-20 μ M). The PGE₂ levels were quantified in culture media supernatants from control cells by enzyme immunoassay using an EIA Kit (Cayman Chemical). The results were expressed by the standard deviation average of ± 6 independent experiences.

VI.3 Bioinformatique

VI.3.1 Databases used to obtain COX-2 inhibitors and structures

VI.3.1.1 PDB

The PDB [286] is a database comprising 120642 structures of proteins and nucleic acids from several species (22/07/2016). Structures have been essentially solved by X-ray cristallography and nuclear magnetic resonance (NMR). The protein structures are either co-crystallized with a ligand (« holo » structure) or without ligand (« apo » structure). PDB is freely available online: <http://www.rcsb.org/pdb/>

VI.3.1.2 ChEMBL

ChEMBL [287] is a database comprising more than 1.9 million compounds for 11019 targets and more than 13.9 million biological activities data (ChEMBL statistic, 22/07/2016). ChEMBL gathers information describing molecules, together with information focusing on the different biological tests achieved on these molecules [287]. ChEMBL is also freely available online: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>

We used this database to determine the K_i (inhibitory constant) and IC_{50} values of DUD_E and PDB ligands COX-2 to study their biological activity and their selectivity (voir partie 9.5.3.1).

VI.3.1.3 DUD_E

DUD_E (Directory of Useful Decoys_ Enhanced) [288] is a database encompassing active ligands and decoys for 102 targets. Decoys are defined as presumed inactive ligands : they have similar physico-chemical properties as active ligands (molecular weight, octanol/water partition coefficient, number of rotative bonds, number of hydrogen bonds acceptors or donors and net charge) but are structurally different. The 102 targets of this database represent

8 protein families with 66695 ligands, 9219 experimental decoys and 1411214 decoys extracted from Zinc database [288]. DUD_E is also freely available online: <http://dude.docking.org/>

Among the 102 targets, the COX-2 dataset includes 531 COX-2 inhibitors, 23405 decoys and 531 actives and one PDB structure (PDBID: 3LN1). Thereafter, only the 531 active ligands were used to extract highly selective COX-2 inhibitors that will be used to build COX-2 selective pharmacophores.

VI.3.1.4 Preparation of the different data sets used for pharmacophore generation

VI.3.1.4.1 Ligands included in the data sets

3 datasets have been used for this study: (a) cyclocoumarol derivatives, (b) COX-2 inhibitors co-crystallized in the PDB and (c) COX-2 inhibitors coming from DUD_E

(a) Cyclocoumarol derivatives: 7 compounds synthesized in the laboratory were used to construct this database.

(b) When the PDB data set was constructed, the PDB included 41 structures of COX-2, among which 38 were co-crystallized with an inhibitor. Some of these structures were co-crystallized with the same ligands, so only 27 different compounds were included in the PDB data set.

PDB code	Organism	Ligand	Resolution (Å)
1CVU	Mus musculus	ACD	2,4
1CX2	Mus musculus	S58	3,0
1DDX	Mus musculus	PGX	3,0
1PXX	Mus musculus	DIF	2,9
3HS5	Mus musculus	ACD	2,1
3HS6	Mus musculus	EPA	2,4
3HS7	Mus musculus	HXA	2,65
3KRK	Mus musculus	ACD	2,4
3LN0	Mus musculus	52B	2,2
3LN1	Mus musculus	CEL	2,4
3MDL	Mus musculus	1AG	2,2
3MQE	Mus musculus	416	2,8
3NTG	Mus musculus	D72	2,19
3NT1	Mus musculus	NPS	1,73
3NTB	Mus musculus	T1N	2,27
3OLT	Mus musculus	ACD	2,45
3OLU	Mus musculus	1AG	2,35
3PGH	Mus musculus	FLP	2,5
3QH0	Mus musculus	PLM	2,1
3QMO	Mus musculus	NS4	3,0
3Q7D	Mus musculus	NPX	2,4
3RR3	Mus musculus	FLR	2,84
3TZI	Mus musculus	ACD	2,15
4COX	Mus musculus	IMN	2,9
4E1G	Mus musculus	LNL	2,1
4FM5	Mus musculus	DF0	2,81
4M10	Mus musculus	ICD	2,01
4M11	Mus musculus	MXM	2,45
4OTJ	Mus musculus	IXP	2,11
4OTY	Mus musculus	LUR	2,35
4PH9	Mus musculus	IBP	1,81

4RRW	Mus musculus	LUR	2,57
4RRX	Mus musculus	LUR	2,78
4RRY	Mus musculus		2,43
4RRZ	Mus musculus	LUR	2,57
4RS0	Mus musculus	IBP	2,81
4RUT	Mus musculus	LM8	2,16
4Z0L	Mus musculus	4LA, N1B	2,29
5COX	Mus musculus		3,0
5FDQ	Mus musculus		1,9
6COX	Mus musculus	S58	2,8
5F1A	Homo sapiens	SAL	2,38
5F19	Homo sapiens		2,04
5IKV	Homo sapiens	FLF	2,51
5IKT	Homo sapiens	TLF	2,45
5IKR	Homo sapiens	ID8	2,34
5IKQ	Homo sapiens	JMS	2,41

Tableau : COX-2 structures available in the PDB (organism: mus musculus et homo sapiens)

(c) The COX-2 DUD-E dataset includes 531 compounds. Among these 531 molecules, 10 (ID ChEMBL : 563 (*4), 139, 154 (*2), 599, 521 (*2)) correspond to COX-2 inhibitors contained in the PDB data set. A compound is considered as COX-2 selective if its ratio $IC_{50}(COX-1)/IC_{50}(COX-2) > 1$ [29] and as highly selective [289] if its ratio is > 1000 . As our aim is to develop new COX-2 selective compounds, we decided to retain only the 85 molecules of the DUD_E with a ratio > 1000 . (voir tableau annexe)

These 85 compounds will be defined thereafter as « active ligands » and the 446 remaining compounds will be qualified as « decoys ». Among the 446 remaining DUD-E COX-2 inhibitors, the selectivity is between 500 and 1000 for 25 compounds, between 100 and 500 for 107 compounds and lower than 100 for 171 compounds.

Ratio IC ₅₀ COX-1/IC ₅₀ COX-2	<100	100≤IC ₅₀ ≤500	500≤IC ₅₀ <1000	≥1000
Nombre de molécules de la DUD_E	171	107	25	85
Nombre de molécules de la PDB	21	1	0	3

Tableau : Bibliographic study determining the selectivity of compounds contained in the PDB and in the DUD_E

VI.3.1.4.2 Data sets construction

For the datasets (a) and (b), 3D structures of the ligands were generated with Corina on line demo (ref), starting from SMILES files. OpenBabel [290] was used to calculate Gasteiger's partial atomic charges.

For the dataset (c), the ligands were directly obtained in .mol2 format from the DUD_E data sets.

Finally, these 3 data sets were converted in the LigandScout proper format, the .ldb format, using the idbgen tool provided with LigandScout with the omega-fast option .

VI.3.2 Pharmacophore generation

LigandScout. 3D pharmacophores were generated using the software LigandScout (version 4.0) in structure-based (SB) and ligand-based (LB) approaches.

Structure-based approach. 3D SB pharmacophores were automatically generated using the 38 COX-2 holo PDB structures available in the PDB. In this approach, the LigandScout algorithm tags the key features of the ligand that are interacting with the residues of the receptor: aromatic ring, hydrophobic area, hydrogen bond donor or acceptor, negative or positive ionisable atom and metal binding location. To complete the pharmacophore, an ensemble of exclusion volume spheres is generated to represent the shape of the active site.

Ligand-based approach. The ligand-based approach was used with the 85 COX-2 inhibitors coming from DUD_E. All ligands of the dataset were clustered with LigandScout [134, 135] using the Pharmacophore Alignment Score as similarity measure and a cluster distance threshold set to 0.4. For each cluster, a 3D LB pharmacophore was generated using a maximum number of conformations of 300 and the merged or shared feature pharmacophore approach. In all cases, the « merged pharmacophore » option was used for the construction of the pharmacophore, with the number of omitted features set to 4 and optional partially matching features threshold set to 10%. In cases where not all ligands of the cluster were retrieved with the merged option, the « shared pharmacophore » option was used to generate a second pharmacophore. . In the merged approach, all features observed in each ligand of the training datasets are identified, scored and removed according to the threshold number of omitted features. We chose to enable the creation of exclusion volume spheres around the alignment of ligands. Moreover, in some cases, we added manually exclusion volume spheres to remove decoys compounds since inactive compounds can map all the pharmacophore require features, their inactivity being explained by steric clashes with the binding site. For each pharmacophore, the ligands of the cluster used to generate this pharmacophore constituted the training set and the test set was formed by 85 selectives and 446 “less selectives” compounds. During the pharmacophore generation, the ligands of the training set were automatically aligned with the LigandScout pharmacophore-based alignment algorithm.

merged or shared feature pharmacophore approach .

Model optimization protocol. The generated 3D pharmacophores were used to screen the test sets. All of the ligands provided in MOL2 format were converted in .ldb format using the idbgen tool provided with LigandScout with the omega-fast option. Two databases were used for each screening, a database of active compounds (85 selective inhibitors) and a database of

decoys (446 less selective inhibitors). The model optimization protocol for this study is used to sequentially refine the pharmacophore models in order to obtain selective COX-2 pharmacophores. The model optimization protocol includes removing pharmacophore features and adding exclusion volume spheres. The protocol was applied for each pharmacophore until after screening only selective compounds and no decoy are retrieved. In this case, the pharmacophore was validated as a COX-2 selective pharmacophore.

VI.3.3 Seesar

SeeSAR is an interactive tool that is used to select and prioritize the most promising compounds to synthesize through binding affinity prediction of a ligand for a given target. SeeSAR proposes a great diversity of parameters to optimize compounds and could be integrate in the discovery strategies of new active molecules. This software is mainly characterized by a visual interface dedicated to lead optimization and atom-based affinity contributions evaluation: starting from a (hit) molecule located in the active site of a protein, SeeSAR indicates which parts of the molecule are favorable for the affinity and should be maintained (colored in green) and which parts are disadvantageous and should be optimized to enhance the affinity (colored in red). To accomplish this work, the HYDE (HYdrogen bond and DEhydration energies) scoring function is used. HYDE [291, 292] takes into account the favorable contributions of binding energy (hydrogen bonds, hydrophobic effects) and unfavorable contributions (hydrophile dehydration) participating to the complex protein-ligand formation.

$$\Delta G_{HYDE} = \sum_{atoms\ i} (\Delta G_{dehydration}^i + \Delta G_{H-bonds}^i)$$

Equation :Determination of the energy binding mode for each atome i (ΔG_{HYDE}) contributing to ligand-proteine interactions. ($\Delta G_{dehydration}$: dehydration energy et $\Delta G_{H-bonds}$: hydrogen bond energy). [291, 292]

HYDE returns a range of predicted affinity. Additionally, several other softwares are implemented in SeeSAR such as ReCore [293], FlexX [195, 294-298] and FlexS can also be used in the lead optimization process scaffold hopping through scaffold hopping, docking studies and ligand alignment respectively.

We applied the SeeSAR methodology to our research of new COX-2 selective inhibitors. In this way, we first evaluated the ability of SeeSAR to predict the binding affinity of our 7 compounds already synthesized and experimentally tested. In this step, we compared the SeeSAR outcomes obtained using two different protocols. The first protocol started with the generation of poses for the synthesized compounds using the docking software Surflex-dock, and the binding affinity prediction of the best ranked poses was achieved with SeeSAR. In the second protocol, the best ranked Surflex-Dock pose of cyclocoumarol was used as a template from which structural modifications were manually conducted to obtain the corresponding derivatives, and the binding affinity prediction of these new poses was achieved with SeeSAR. The manually protocol was the most efficient and we decided to apply it to the binding affinity prediction of new analogs of our synthesized compounds to prioritize the development of new compounds.

Bibliographie

1. LEEM. *Les grandes étapes de fabrication d'un médicament*. 2011; Available from: <http://www.leem.org/content/les-grandes-tapes-de-fabrication-dun-m-dicament>.
2. Hughes, J.P., Rees, S., Kalindjian, S.B., and Philpott, K.L., *Principles of early drug discovery*. Br. J. Pharmacol., 2011. **162**(6): p. 1239-1249.
3. LEEM. *Le parcours d'un médicament*. 2015; Available from: <http://www.leem.org/cycle-du-medicament>.
4. LEEM. *Fabrication du médicament*. 2011; Available from: <http://www.leem.org/de-fabrication-du-medicament-distribution>.
5. LEEM. *Quel est le cycle de vie du médicament*. 2014; Available from: <http://www.leem.org/article/quel-est-cycle-de-vie-du-medicament>.
6. Patrick, G.L., *Chimie Pharmaceutique*, ed. p. De Boeck. 2002.
7. Pina, A.S., Hussain, A., and Roque, A.C.A., *An historical overview of drug discovery*. Methods Mol. Biol. (Totowa, NJ, U. S.), 2010. **572**(Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery): p. 3-12.
8. Li, Y.Y. and Jones, S.J.M., *Drug repositioning for personalized medicine*. Genome Med., 2012. **4**(3): p. 27.
9. Wermuth, C.G. and Abraham, D.J., *Analog Design*, in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. 2003, John Wiley & Sons, Inc. p. 167-179.
10. Wermuth, C.G., *Selective optimization of side activities: the SOSA approach*. Drug Discovery Today, 2006. **11**(3 & 4): p. 160-164.
11. Wermuth, C.G., *Selective Optimization of Side Activities: Another Way for Drug Discovery*. J. Med. Chem., 2004. **47**(6): p. 1303-1314.
12. Sylla-Iyarreta Veitía, M., Siverio-Mota, D., Lerari, V., Marín, M., Giner, R.M., Dumas, F., Ferroud, C., Vicet-Muro, L., Rivero-Guerra, Y., De Witte, P.A.M., Crawford, A.D., Arán, V.J., and Marrero-Ponce, Y., *Fishing Anti-Inflammatories from Known Drugs: In Silico Repurposing, Design, Synthesis and Biological Evaluation of Bisacodyl Analogues as Potential Anti-Inflammatory Agents*. . Current topics in medicinal chemistry, 2016, submitted.
13. Celotti, F. and Laufer, S., *Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept*. Pharmacol. Res., 2001. **43**(5): p. 429-436.
14. El-Haggar, R. and Al-Wabli, R.I., *Anti-inflammatory screening and molecular modeling of some novel coumarin derivatives*. Molecules, 2015. **20**(4): p. 5374-5391.
15. Grover, J. and Jachak, S.M., *Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development*. RSC Adv., 2015. **5**(49): p. 38892-38905.
16. Claria, J., *Cyclooxygenase-2 biology*. Curr. Pharm. Des., 2003. **9**(27): p. 2177-2190.
17. Bergström, S., Danielsson, H., and Samuelsson, B., *The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32*. Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1964. **90**(1): p. 207-210.
18. Botting, R.M., *Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004)*. J. Therm. Biol., 2006. **31**(1-2): p. 208-219.
19. Griswold, D.E. and Adams, J.L., *Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date*. Med. Res. Rev., 1996. **16**(2): p. 181-206.
20. Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., and Browner, M.F., *Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2*. Nat. Struct. Biol., 1996. **3**(11): p. 927-933.

21. Marnett, L.J., Rowlinson, S.W., Goodwin, D.C., Kalgutkar, A.S., and Lanzo, C.A., *Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(33): p. 22903-22906.
22. Simmons, D.L., Botting, R.M., and Hla, T., *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. Pharmacol. Rev., 2004. **56**(3): p. 387-437.
23. Hall, A., Peace, S., and Swarbrick, M.E., *Agents acting on prostanoid and thromboxane receptors* in Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery, and Development, Seventh Edition, edited by Donald J. Abraham and David P. Rotella. 2010: John Wiley & Sons, Inc.
24. Kumar, A. and Gaur, A., *Remembering cyclooxygenases: a brief review*. Asian J. Pharm. Technol. Innovation, 2014. **2**(4): p. 1-8.
25. Al-Turki, D.A., Abou-Zeid, L.A., Shehata, I.A., and Al-Omar, M.A., *Therapeutic and toxic effects of new NSAIDs and related compounds: a review and prospective study*. Int. J. Pharmacol., 2010. **6**(6): p. 813-825.
26. Hilario, M.O.E., Terreri, M.T., and Len, C.A., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors*. J. Pediatr. (Rio J), 2006. **82**(5 Suppl): p. S206-12.
27. Patrono, C., *The PGH-Synthase System and Isozyme-selective Inhibition*. J. Cardiovasc. Pharmacol., 2006. **47**(Suppl. 1): p. S1-S6.
28. Carvalho, W.A., Carvalho, R.D.S., and Rios-Santos, F., *Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesics: therapeutic advances*. Rev. Bras. Anesthesiol., 2004. **54**(3): p. 448-464.
29. Jouzeau, J.-Y., Daouphars, M., Benani, A., and Netter, P., *Pharmacology and classification of cyclooxygenase inhibitors*. Gastroenterol. Clin. Biol., 2004. **28 Spec No 3**: p. C7-17.
30. Capone, M.L., Tacconelli, S., Di Francesco, L., Sacchetti, A., Sciulli, M.G., and Patrignani, P., *Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans*. Prostaglandins Other Lipid Mediators, 2007. **82**(1-4): p. 85-94.
31. Ricciotti, E. and FitzGerald, G.A., *Prostaglandins and Inflammation*. Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol., 2011. **31**(5): p. 986-1000.
32. Katori, M. and Majima, M., *Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors*. Inflammation Res., 2000. **49**(8): p. 367-392.
33. Vane, J.R., *The mechanism of action of anti-inflammatory drugs*. Ernst Schering Res. Found. Workshop, 2000. **31**(Advances in Eicosanoid Research): p. 1-23.
34. Chandrasekharan, N.V. and Simmons, D.L., *The cyclooxygenases*. Genome Biology, 2004. **5**(9): p. No pp. given.
35. Blobaum, A.L. and Marnett, L.J., *Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition*. J. Med. Chem., 2007. **50**(7): p. 1425-1441.
36. Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H.H., *Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G2*. Eur. J. Biochem., 1988. **171**(1/2): p. 321-8.
37. Golden, B.D. and Abramson, S.B., *Selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. Rheum. Dis. Clin. North. Am., 1999. **25**(2): p. 359-78.
38. Kaplan-Machlis, B. and Klostermeyer, B.S., *The cyclooxygenase-2 inhibitors: safety and effectiveness*. Ann. Pharmacother., 1999. **33**(9): p. 979-988.
39. Dannhardt, G. and Kiefer, W., *Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects*. Eur. J. Med. Chem., 2001. **36**(2): p. 109-126.
40. Pairet, M. and Engelhardt, G., *Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: Possible physiological and therapeutic implications*. Fundam. Clin. Pharmacol., 1996. **10**(1): p. 1-15.

41. Vane, J.R. and Botting, R.M., *Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Am. J. Med., 1998. **104**(3A): p. 2S-8S.
42. Vane, J.R., Bakhle, Y.S., and Botting, R.M., *Cyclooxygenases 1 and 2*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1998. **38**: p. 97-120.
43. Vane, J.R. and Botting, R.M., *Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action*. Inflammation Res., 1998. **47**(Suppl.2): p. S78-S87.
44. Black, W.C., *Selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. Annu. Rep. Med. Chem., 2004. **39**: p. 125-138.
45. Luo, C., He, M.-l., and Bohlin, L., *Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial*. Acta Pharmacol. Sin., 2005. **26**(8): p. 926-933.
46. Kam, P.C.A. and See, A.U.L., *Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role*. Anaesthesia, 2000. **55**(5): p. 442-449.
47. Picot, D., Loll, P.J., and Garavito, R.M., *The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1*. Nature, 1994. **367**(6460): p. 243-9.
48. Bovill, J.G., *Pharmacology and clinical action of COX-2 selective NSAIDs*. Adv. Exp. Med. Biol., 2003. **523**(Advances in Modelling and Clinical Application of Intravenous Anaesthesia): p. 201-214.
49. Hawkey, C.J., *COX-1 and COX-2 inhibitors*. Best Pract. Res., Clin. Gastroenterol., 2001. **15**(5): p. 801-820.
50. De Leval, X., Delarge, J., Somers, F., De Tullio, P., Henrotin, Y., Pirotte, B., and Dogne, J.-M., *Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition*. Curr. Med. Chem., 2000. **7**(10): p. 1041-1062.
51. Cryer, B. and Dubois, A., *The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review*. Prostaglandins Other Lipid Mediators, 1998. **56**(5-6): p. 341-361.
52. Praveen Rao, P.N. and Knaus, E.E., *Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond*. J. Pharm. Pharm. Sci., 2008. **11**(2): p. 81s-110s.
53. Flower, R.J., *The development of COX2 inhibitors*. Nat. Rev. Drug Discover., 2003. **2**(3): p. 179-191.
54. Botting, R.M. and Botting, J.H. *The discovery of COX-2*. 2004. Birkhaeuser Verlag.
55. Grosser, T., Fries, S., and FitzGerald, G.A., *Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: Therapeutic challenges and opportunities*. J. Clin. Invest., 2006. **116**(1): p. 4-15.
56. Marnett, L.J., *The COXIB experience: a look in the rearview mirror*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2009. **49**: p. 265-290.
57. Marnett, L.J., *Recent developments in cyclooxygenase inhibition*. Prostaglandins Other Lipid Mediators, 2002. **68-69**: p. 153-164.
58. DeWitt, D.L., *Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins*. Mol. Pharmacol., 1999. **55**(4): p. 625-631.
59. Jouzeau, J.-Y., Terlain, B., Abid, A., Nedelec, E., and Netter, P., *Cyclooxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Drugs, 1997. **53**(4): p. 563-582.
60. Wu, K.K.-Y., *Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Biochem. Pharmacol., 1998. **55**(5): p. 543-547.
61. Blain, H., Jouzeau, J.Y., Netter, P., and Jeandel, C., *Non-steroidal anti-inflammatory agents with selective inhibitory activity on cyclooxygenase-2. Interest and future prospects*. Rev Med Interne, 2000. **21**(11): p. 978-88.
62. Marnett, L.J. and Kalgutkar, A.S., *Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future*. Trends Pharmacol. Sci., 1999. **20**(11): p. 465-469.

63. Penglis, P.S., James, M.J., and Cleland, L.G., *Cyclooxygenase inhibitors: any reservations?* Intern. Med. J., 2001. **31**(1): p. 37-41.
64. Coruzzi, G., Venturi, N., and Spaggiari, S., *Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond.* Acta BioMed. Atenei Parmensis, 2007. **78**(2): p. 96-110.
65. Grosser, T., *The pharmacology of selective inhibition of COX-2.* Thromb. Haemostasis, 2006. **96**(4): p. 393-400.
66. Grosser, T., Yu, Y., and FitzGerald, G.A., *Emotion recollected in tranquility: lessons learned from the COX-2 saga.* Annu. Rev. Med., 2010. **61**: p. 17-33.
67. Richardson, C. and Emery, P., *The clinical implications of inhibition of the inducible form of cyclo-oxygenase.* Drug Saf., 1996. **15**(4): p. 249-260.
68. Smith, W.L. and Marnett, L.J., *Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis.* Biochim. Biophys. Acta, 1991. **1083**(1): p. 1-17.
69. Ouellet, M. and Percival, M.D., *Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms.* Arch. Biochem. Biophys., 2001. **387**(2): p. 273-80.
70. Boutaud, O., Aronoff, D.M., Richardson, J.H., Marnett, L.J., and Oates, J.A., *Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H2 synthases.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002. **99**(10): p. 7130-7135.
71. Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C., and Stallings, W.C., *Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents.* Nature 1996. **384**(6610): p. 644-648.
72. Christoph, T. and Buschmann, H. *Cyclooxygenase inhibition: From NSAIDs to selective COX-2 inhibitors.* 2002. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
73. Rome, L.H. and Lands, W.E.M., *Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1975. **72**(12): p. 4863-5.
74. Copeland, R.A., Williams, J.M., Giannaras, J., Nurnberg, S., Covington, M., Pinto, D., Pick, S., and Trzakos, J.M., *Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1994. **91**(23): p. 11202-6.
75. So, O.-Y., Scarafia, L.E., Mak, A.Y., Callan, O.H., and Swinney, D.C., *The dynamics of prostaglandin H synthases. Studies with prostaglandin H synthase 2 Y355F unmask mechanisms of time-dependent inhibition and allosteric activation.* J. Biol. Chem., 1998. **273**(10): p. 5801-5807.
76. Gierse, J.K., Koboldt, C.M., Walker, M.C., Seibert, K., and Isakson, P.C., *Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases.* Biochem. J., 1999. **339**(3): p. 607-614.
77. Lavecchia, A. and Giovanni, C.D., *Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review.* Curr. Med. Chem., 2013. **20**(23): p. 2839-2860.
78. Ekins, S., Mestres, J., and Testa, B., *In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling.* Br. J. Pharmacol., 2007. **152**(1): p. 9-20.
79. Tanrikulu, Y., Kruger, B., and Proschak, E., *The holistic integration of virtual screening in drug discovery.* Drug Discov. Today, 2013. **18**(7-8): p. 358-64.
80. Oprea, T.I. and Matter, H., *Integrating virtual screening in lead discovery.* Curr. Opin. Chem. Biol., 2004. **8**(4): p. 349-358.
81. Perez-Pineiro, R., Burgos, A., Jones, D.C., Andrew, L.C., Rodriguez, H., Suarez, M., Fairlamb, A.H., and Wishart, D.S., *Development of a Novel Virtual Screening Cascade*

- Protocol to Identify Potential Trypanothione Reductase Inhibitors*. J. Med. Chem., 2009. **52**(6): p. 1670-1680.
82. Ehrlich, P., *Über den jetzigen Stand der Chemotherapie*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1909. **42**(1): p. 17-47.
 83. Qing, X., Lee, X.Y., De Raeymaeker, J., Tame, J.R.H., Zhang, K.Y.J., De Maeyer, M., and Voet, A.R.D., *Pharmacophore modeling: advances, limitations, and current utility in drug discovery*. J. Recept., Ligand Channel Res., 2014. **7**: p. 81-92.
 84. Schueler, F.W., *Chemobiodynamics and Drug Design*. J.Pharm. Sci. Vol. 50. 1960: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. 638pp.
 85. Yang, S.-Y., *Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances*. Drug Discover. Today, 2010. **15**(11–12): p. 444-450.
 86. Güner, O.F. and Bowen, J.P., *Setting the Record Straight: The Origin of the Pharmacophore Concept*. J. Chem. Info. Model., 2014. **54**(5): p. 1269-1283.
 87. Wermuth, C.G., Ganellin, C.R., Lindberg, P., and Mitscher, L.A., *Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1998)*. Pure Appl. Chem., 1998. **70**(5): p. 1129-1143.
 88. Hessler, G. and Baringhaus, K.-H., *The scaffold hopping potential of pharmacophores*. Drug Discover.Today: Technol., 2010. **7**(4): p. E263-E269.
 89. Brown, N. and Jacoby, E., *On scaffolds and hopping in medicinal chemistry*. Mini-Rev. Med. Chem., 2006. **6**(11): p. 1217-1229.
 90. Laggner, C., Wolber, G., Kirchmair, J., Schuster, D., and Langer, T. *Pharmacophore-based virtual screening in drug discovery*. 2008. Royal Society of Chemistry.
 91. Renner, S. and Schneider, G., *Scaffold-Hopping Potential of Ligand-Based Similarity Concepts*. ChemMedChem, 2006. **1**(2): p. 181-185.
 92. Schuffenhauer, A., Floersheim, P., Acklin, P., and Jacoby, E., *Similarity Metrics for Ligands Reflecting the Similarity of the Target Proteins*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2003. **43**(2): p. 391-405.
 93. Durant, J.L., Leland, B.A., Henry, D.R., and Nourse, J.G., *Reoptimization of MDL Keys for Use in Drug Discovery*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2002. **42**(6): p. 1273-1280.
 94. Vilar, S., Uriarte, E., Santana, L., Lorberbaum, T., Hripcsak, G., Friedman, C., and Tatonetti, N.P., *Similarity-based modeling in large-scale prediction of drug-drug interactions*. Nat. Protoc., 2014. **9**(9): p. 2147-2163.
 95. Gillet, V.J., Downs, G.M., Ling, A., Lynch, M.F., Venkataram, P., Wood, J.V., and Dethlefsen, W., *Computer storage and retrieval of generic chemical structures in patents. 8. Reduced chemical graphs and their applications in generic chemical structure retrieval*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1987. **27**(3): p. 126-37.
 96. Barker, E.J., Buttar, D., Cosgrove, D.A., Gardiner, E.J., Kitts, P., Willett, P., and Gillet, V.J., *Scaffold Hopping Using Clique Detection Applied to Reduced Graphs*. J. Chem. Inf. Model., 2006. **46**(2): p. 503-511.
 97. Stiefl, N., Watson, I.A., Baumann, K., and Zaliani, A., *ErG: 2D Pharmacophore Descriptions for Scaffold Hopping*. J. Chem. Inf. Model., 2006. **46**(1): p. 208-220.
 98. Lengauer, T., Lemmen, C., Rarey, M., and Zimmermann, M., *Novel technologies for virtual screening*. Drug Discovery Today, 2004. **9**(1): p. 27-34.
 99. Rarey, M. and Dixon, J.S., *Feature trees: a new molecular similarity measure based on tree matching*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 1998. **12**(5): p. 471-490.
 100. Franke, L., Schwarz, O., Mueller-Kuhrt, L., Hoernig, C., Fischer, L., George, S., Tanrikulu, Y., Schneider, P., Werz, O., Steinhilber, D., and Schneider, G., *Identification of Natural-Product-Derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase Activity by Ligand-Based Virtual Screening*. J. Med. Chem., 2007. **50**(11): p. 2640-2646.

101. Dror, O., Shulman-peleg, A., Nussinov, R., and Wolfson, H.J., *Predicting molecular interactions in silico: I. A guide to pharmacophore identification and its applications to drug design*. *Curr. Med. Chem.*, 2004. **11**(1): p. 71-90.
102. Martin, Y.C., *DISCO : What We Did Right and What We Missed in Pharmacophore Perception, Development, and Use in Drug Design*, ed. O.F. Guner. 2000.
103. Dolata, D.P., Parrill, A.L., and Walters, W.P., *CLEW: the generation of pharmacophore hypotheses through machine learning*. *SAR QSAR Environ. Res.*, 1998. **9**(1-2): p. 53-81.
104. Li H., S.J., Hoffman R., *An Automated System for Generating 3D Predictive Pharmacophore in Pharmacophore Perception, Development, and Use in Drug Design*, ed. O.F. Guner. 2000. 537.
105. Finn, P.W., Kaviraki, L.E., Latombe, J.C., Motwani, R., Shelton, C., Venkatasubramanian, S., and Yao, A., *RAPID: Randomized pharmacophore identification for drug design*. *Computational Geometry*, 1998. **10**(4): p. 263-272.
106. Chen, X., Rusinko, A., III, Tropsha, A., and Young, S.S., *Automated pharmacophore identification for large chemical data sets*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1999. **39**(5): p. 887-896.
107. Jones, G., Willett, P., and Glen, R.C., *A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation*. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 1995. **9**(6): p. 532-49.
108. Handschuh, S., Wagener, M., and Gasteiger, J., *Superposition of Three-Dimensional Chemical Structures Allowing for Conformational Flexibility by a Hybrid Method*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1998. **38**(2): p. 220-232.
109. Holliday, J.D. and Willett, P., *Using a genetic algorithm to identify common structural features in sets of ligands*. *J. Mol. Graphics Modell.*, 1998. **15**(4): p. 221-232.
110. Bush, B.L. and Sheridan, R.P., *PATY: A programmable atom type and language for automatic classification of atoms in molecular databases*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1993. **33**(5): p. 756-62.
111. Greene, J., Kahn, S., Savoj, H., Sprague, P., and Teig, S., *Chemical Function Queries for 3D Database Search*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1994. **34**(6): p. 1297-308.
112. CATALYST, A.I., San Diego, CA, USA., Available from: www.accelrys.com.
113. Anna Lin, C.C.G.I. *Overview of Pharmacophore Applications in MOE*. Available from: <https://www.chemcomp.com/journal/ph4.htm>.
114. Environment, M.M.O. *Pharmacophore Discovery*. Available from: https://www.chemcomp.com/MOE-Pharmacophore_Discovery.htm.
115. Inc., A.D.a.E.S.C.C.G. *Ligand Scaffold Replacement using MOE Pharmacophore Tools*. 2007; Available from: Ligand Scaffold Replacement using MOE Pharmacophore Tools.
116. MOE, C.C.G., Montreal, QC, CA. Available from: www.chemcomp.com.
117. Dixon, S.L., Smondirev, A.M., Knoll, E.H., Rao, S.N., Shaw, D.E., and Friesner, R.A., *PHASE: A new design for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results*. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2006. **20**(10/11): p. 647-671.
118. Wang, T. and Zhou, J., *3DFS: A New 3D Flexible Searching System for Use in Drug Design*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1998. **38**(1): p. 71-77.
119. Pickett, S.D., Mason, J.S., and McLay, I.M., *Diversity Profiling and Design Using 3D Pharmacophores: Pharmacophore-Derived Queries (PDQ)*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1996. **36**(6): p. 1214-1223.

120. Vuorinen, A. and Schuster, D., *Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling*. Methods (Amsterdam, Neth.), 2015. **71**: p. 113-134.
121. Kunal Roy, S.K., Rudra Narayan Das, *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*. 2015. p 363.
122. Guner, O.F., *History and evolution of the pharmacophore concept in computer-aided drug design*. Curr. Top. Med. Chem., 2002. **2**(12): p. 1321-32.
123. Marshall, G.R., Barry, C.D., Bosshard, H.E., Dammkoehler, R.A., and Dunn, D.A., *The conformational parameter in drug design: the active analog approach*. ACS Symp. Ser., 1979. **112**(Comput.-Assisted Drug Des.): p. 205-26.
124. Lemmen, C. and Lengauer, T., *Computational methods for the structural alignment of molecules*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 2000. **14**(3): p. 215-232.
125. Todeschini, R. and Consonni, V., *Handbook of Molecular Descriptors*, ed. K.H. Mannhold R., Timmerman H. Vol. 11. 2008.
126. Clement, O.O. and Mehl, A.T., *HipHop : Pharmacophores Based on Multipl Common Feature Alignments, in Pharmacophore Perception, Development, and Use in Drug Design*, ed. G. O.F. 2000.
127. V.J., G., *Pharmacophores Models in Drug Design, in Physico-Chemical and Computational Approaches to Drug Discovery*. 2012.
128. Boehm, H.-J., *The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 1994. **8**(3): p. 243-56.
129. Carlson, H.A., Masukawa, K.M., Rubins, K., Bushman, F.D., Jorgensen, W.L., Lins, R.D., Briggs, J.M., and McCammon, J.A., *Developing a Dynamic Pharmacophore Model for HIV-1 Integrase*. J. Med. Chem., 2000. **43**(11): p. 2100-2114.
130. Sanders, M.P.A., McGuire, R., Roumen, L., de Esch, I.J.P., de Vlieg, J., Klomp, J.P.G., and de Graaf, C., *From the protein's perspective: the benefits and challenges of protein structure-based pharmacophore modeling*. MedChemComm, 2012. **3**(1): p. 28-38.
131. Artese, A., Cross, S., Costa, G., Distinto, S., Parrotta, L., Alcaro, S., Ortuso, F., and Cruciani, G., *Molecular interaction fields in drug discovery: recent advances and future perspectives*. Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci., 2013. **3**(6): p. 594-613.
132. Cross, S., Baroni, M., Carosati, E., Benedetti, P., and Clementi, S., *FLAP: GRID Molecular Interaction Fields in Virtual Screening. Validation using the DUD Data Set*. J. Chem. Inf. Model., 2010. **50**(8): p. 1442-1450.
133. Baroni, M., Cruciani, G., Sciabola, S., Perruccio, F., and Mason, J.S., *A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for ligands and proteins (FLAP): theory and application*. J. Chem. Inf. Model., 2007. **47**(2): p. 279-294.
134. Wolber, G. and Langer, T., *LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2005. **45**(1): p. 160-169.
135. Wolber, G., Dornhofer, A.A., and Langer, T., *Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 2006. **20**(12): p. 773-788.
136. Rella, M., Rushworth, C.A., Guy, J.L., Turner, A.J., Langer, T., and Jackson, R.M., *Structure-Based Pharmacophore Design and Virtual Screening for Novel Angiotensin Converting Enzyme 2 Inhibitors*. J. Chem. Inf. Model., 2006. **46**(2): p. 708-716.

137. Deng, Z., Chuaqui, C., and Singh, J., *Structural Interaction Fingerprint (SIFt): A Novel Method for Analyzing Three-Dimensional Protein-Ligand Binding Interactions*. J. Med. Chem., 2004. **47**(2): p. 337-344.
138. Wilson, G.L. and Lill, M.A., *Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design*. Future Med. Chem., 2011. **3**(6): p. 735-750.
139. Schneidman-Duhovny, D., Dror, O., Inbar, Y., Nussinov, R., and Wolfson, H.J., *PharmaGist: a webservice for ligand-based pharmacophore detection*. Nucleic Acids Res., 2008. **36**(Web Server issue): p. W223-8.
140. Liu, X., Ouyang, S., Yu, B., Liu, Y., Huang, K., Gong, J., Zheng, S., Li, Z., Li, H., and Jiang, H., *PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach*. Nucleic Acids Res., 2010. **38**(Web Server): p. W609-W614.
141. Koes, D.R. and Camacho, C.J., *ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database*. Nucleic Acids Res., 2012. **40**(W1): p. W409-W414.
142. Irwin, J.J. and Shoichet, B.K., *ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2005. **45**(1): p. 177-182.
143. Hoffmann, R.D. *Which conformations in Catalyst Databases?* . Available from: http://accelrys.com/resource-center/case-studies/archive/studies/catalystdb_full.html.
144. Moom, T.E., Henry, D.R., Ozkabak, A.G., and Alamgir, M., *Conformational searching in ISIS/3D databases*. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1994. **34**(1): p. 184-9.
145. Martin, Y.C., *Pharmacophores in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. . 2010.
146. Tschinke, V. and Cohen, N.C., *The NEWLEAD program: a new method for the design of candidate structures from pharmacophoric hypotheses*. J. Med. Chem., 1993. **36**(24): p. 3863-70.
147. Boehm, H.J., *The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 1992. **6**(1): p. 61-78.
148. Boehm, H.J., *LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 1992. **6**(6): p. 593-606.
149. Roe, D.C. and Kuntz, I.D., *BUILDER v.2: improving the chemistry of a de novo design strategy*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 1995. **9**(3): p. 269-82.
150. Sippl, W., *3D-QSAR – APPLICATIONS, RECENT ADVANCES, AND LIMITATIONS*, ed. L.J. Puzyn T, Cronin M.T.D. . 2010. 103-125.
151. Martin, Y.C., Bures, M.G., Danaher, E.A., DeLazzer, J., Lico, I., and Pavlik, P.A., *A fast new approach to pharmacophore mapping and its application to dopaminergic and benzodiazepine agonists*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 1993. **7**(1): p. 83-102.
152. Leach, A.R., Gillet, V.J., Lewis, R.A., and Taylor, R., *Three-Dimensional Pharmacophore Methods in Drug Discovery*. J. Med. Chem., 2010. **53**(2): p. 539-558.
153. Tiikkainen, P., Bellis, L., Light, Y., and Franke, L., *Estimating Error Rates in Bioactivity Databases*. J. Chem. Inf. Model., 2013. **53**(10): p. 2499-2505.
154. Oellien, F., Cramer, J., Beyer, C., Ihlenfeldt, W.-D., and Selzer, P.M., *The Impact of Tautomer Forms on Pharmacophore-Based Virtual Screening*. J. Chem. Inf. Model., 2006. **46**(6): p. 2342-2354.
155. Scior, T., Bender, A., Tresadern, G., Medina-Franco, J.L., Martinez-Mayorga, K., Langer, T., Cuanalo-Contreras, K., and Agrafiotis, D.K., *Recognizing Pitfalls in Virtual Screening: A Critical Review*. J. Chem. Inf. Model., 2012. **52**(4): p. 867-881.
156. Lagisetti, C., Pourpak, A., Jiang, Q., Cui, X., Goronga, T., Morris, S.W., and Webb, T.R., *Antitumor Compounds Based on a Natural Product Consensus Pharmacophore*. J. Med. Chem., 2008. **51**(19): p. 6220-6224.

157. Wang, H., Duffy, R.A., Boykow, G.C., Chackalamannil, S., and Madison, V.S., *Identification of novel cannabinoid CB1 receptor antagonists by using virtual screening with a pharmacophore model*. *J. Med. Chem.*, 2008. **51**(8): p. 2439-2446.
158. Dayam, R., Al-Mawsawi, L.Q., Zawahir, Z., Witvrouw, M., Debyser, Z., and Neamati, N., *Quinolone 3-carboxylic acid pharmacophore: design of second generation HIV-1 integrase inhibitors*. *J. Med. Chem.*, 2008. **51**(5): p. 1136-1144.
159. Markt, P., McGoochan, C., Walker, B., Kirchmair, J., Feldmann, C., De Martino, G., Spitzer, G., Distinto, S., Schuster, D., Wolber, G., Laggner, C., and Langer, T., *Discovery of Novel Cathepsin S Inhibitors by Pharmacophore-Based Virtual High-Throughput Screening*. *J. Chem. Inf. Model.*, 2008. **48**(8): p. 1693-1705.
160. Deng, X.-Q., Wang, H.-Y., Zhao, Y.-L., Xiang, M.-L., Jiang, P.-D., Cao, Z.-X., Zheng, Y.-Z., Luo, S.-D., Yu, L.-T., Wei, Y.-Q., and Yang, S.-Y., *Pharmacophore modelling and virtual screening for identification of new Aurora-A kinase inhibitors*. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2008. **71**(6): p. 533-539.
161. Lucas, S., Heim, R., Negri, M., Antes, I., Ries, C., Schewe, K.E., Bisi, A., Gobbi, S., and Hartmann, R.W., *Novel Aldosterone Synthase Inhibitors with Extended Carbocyclic Skeleton by a Combined Ligand-Based and Structure-Based Drug Design Approach*. *J. Med. Chem.*, 2008. **51**(19): p. 6138-6149.
162. Kaserer, T., Beck, K.R., Akram, M., Odermatt, A., and Schuster, D., *Pharmacophore models and pharmacophore-based virtual screening: concepts and applications exemplified on hydroxysteroid dehydrogenases*. *Molecules*, 2015. **20**(12): p. 22799-22832.
163. LigandScout, *LigandScout 4.0 User Manual*.
164. Sottriffer, C., *Virtual Screening: Principles, Challenges, and Practical Guidelines*, ed. H.K. R. Mannhold, G. Folkers. 2011. 1-536.
165. Seidel, T., Ibis, G., Bendix, F., and Wolber, G., *Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening*. *Drug Discovery Today: Technol.*, 2010. **7**(4): p. E221-E228.
166. Krovat, E.M., Fruehwirth, K.H., and Langer, T., *Pharmacophore Identification, in Silico Screening, and Virtual Library Design for Inhibitors of the Human Factor Xa*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2005. **45**(1): p. 146-159.
167. Barreca, M.L., De Luca, L., Iraci, N., Rao, A., Ferro, S., Maga, G., and Chimirri, A., *Structure-Based Pharmacophore Identification of New Chemical Scaffolds as Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*. *J. Chem. Inf. Model.*, 2007. **47**(2): p. 557-562.
168. Karaboga, A.S., Planesas, J.M., Petronin, F., Teixido, J., Souchet, M., and Perez-Nueno, V.I., *Highly Specific and Sensitive Pharmacophore Model for Identifying CXCR4 Antagonists. Comparison with Docking and Shape-Matching Virtual Screening Performance*. *J. Chem. Inf. Model.*, 2013. **53**(5): p. 1043-1056.
169. Krautscheid, Y., Senning, C.J.A., Sartori, S.B., Singewald, N., Schuster, D., and Stuppner, H., *Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and in Vitro Testing Reveal Haloperidol, Eprazinone, and Fenbutrazate as Neurokinin Receptors Ligands*. *J. Chem. Inf. Model.*, 2014. **54**(6): p. 1747-1757.
170. Sottriffer, C., Klebe, G., Stahl, M., and Böhm, H.-J., *Docking and Scoring Functions/Virtual Screening in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery.*, ed. I. John Wiley & Sons. 2003. 281-331.
171. Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., and Bajorath, J., *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications*. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2004. **3**(11): p. 935-949.
172. N, O.B. *Protein-Ligand Docking*. 2010; Available from: <http://fr.slideshare.net/baoilleach/proteinligand-docking>.

173. Spyraakis, F., Cozzini, P. and Kellogg, G. E. , *Docking and Scoring in Drug Discovery in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. . 2010. 601–684.
174. Lichtenthaler, F.W., *100 Years "Schlüssel-Schloss-Prinzip": What Made Emil Fischer Use this Analogy?* Angew. Chem. Int. Ed., 1995. **33**(23-24): p. 2364-2374.
175. Kuntz, I.D., Blaney, J.M., Oatley, S.J., Langridge, R., and Ferrin, T.E., *A geometric approach to macromolecule-ligand interactions*. J. Mol. Biol., 1982. **161**(2): p. 269-288.
176. Brooijmans, N. and Kuntz, I.D., *Molecular recognition and docking algorithms*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2003. **32**: p. 335-373.
177. Jain, A.N., *Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine*. J Med Chem, 2003. **46**(4): p. 499-511.
178. DesJarlais, R.L., Sheridan, R.P., Dixon, J.S., Kuntz, I.D., and Venkataraghavan, R., *Docking flexible ligands to macromolecular receptors by molecular shape*. J. Med. Chem., 1986. **29**(11): p. 2149-53.
179. Abagyan, R., Totrov, M., and Kuznetsov, D., *ICM - a new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation*. J. Comput. Chem., 1994. **15**(5): p. 488-506.
180. Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P., and Shenkin, P.S., *Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. method and assessment of docking accuracy*. J. Med. Chem., 2004. **47**(7): p. 1739-1749.
181. Lameijer, E.-W., Baeck, T., Kok, J.N., and Ijzerman, A.P., *Evolutionary algorithms in drug design*. Nat. Comput., 2005. **4**(3): p. 177-243.
182. Sousa, S.F., Fernandes, P.A., and Ramos, M.J., *Protein-ligand docking: current status and future challenges*. Proteins: Struct., Funct., Bioinf., 2006. **65**(1): p. 15-26.
183. Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., Leach, A.R., and Taylor, R., *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. J. Mol. Biol., 1997. **267**(3): p. 727-748.
184. Westhead, D.R., Clark, D.E., and Murray, C.W., *A comparison of heuristic search algorithms for molecular docking*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 1997. **11**(3): p. 209-228.
185. Baxter, C.A., Murray, C.W., Clark, D.E., Westhead, D.R., and Eldridge, M.D., *Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity*. Proteins: Struct., Funct., Genet., 1998. **33**(3): p. 367-382.
186. Di Nola, A., Roccatano, D., and Berendsen, H.J.C., *Molecular dynamics simulation of the docking of substrates to proteins*. Proteins: Struct., Funct., Genet., 1994. **19**(3): p. 174-82.
187. Barril, X. and Fradera, X., *Incorporating protein flexibility into docking and structure-based drug design*. Expert Opin. Drug Discovery, 2006. **1**(4): p. 335-349.
188. Carlson, H.A. and McCammon, J.A., *Accommodating protein flexibility in computational drug design*. Mol. Pharmacol., 2000. **57**(2): p. 213-218.
189. Oda, A., Tsuchida, K., Takakura, T., Yamaotsu, N., and Hirono, S., *Comparison of Consensus Scoring Strategies for Evaluating Computational Models of Protein-Ligand Complexes*. J. Chem. Inf. Model., 2006. **46**(1): p. 380-391.
190. Charifson, P.S., Corkery, J.J., Murcko, M.A., and Walters, W.P., *Consensus Scoring: A Method for Obtaining Improved Hit Rates from Docking Databases of Three-Dimensional Structures into Proteins*. J. Med. Chem., 1999. **42**(25): p. 5100-5109.

191. Huang, S.-Y., Grinter, S.Z., and Zou, X., *Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2010. **12**(40): p. 12899-12908.
192. Hawkins, P.C.D., Warren, G.L., Skillman, A.G., and Nicholls, A., *How to do an evaluation: pitfalls and traps*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 2008. **22**(3-4): p. 179-190.
193. Davis, A.M., Teague, S.J., and Kleywegt, G.J., *Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design*. Angew. Chem., Int. Ed., 2003. **42**(24): p. 2718-2736.
194. Raymer, M.L., Sanschagrin, P.C., Punch, W.F., Venkataraman, S., Goodman, E.D., and Kuhn, L.A., *Predicting conserved water-mediated and polar ligand interactions in protein using a K-nearest-neighbors genetic algorithm*. J. Mol. Biol., 1997. **265**(4): p. 445-464.
195. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., and Klebe, G., *A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm*. J. Mol. Biol., 1996. **261**(3): p. 470-489.
196. Marrero-Ponce, Y., Siverio-Mota, D., Galvez-Llompарт, M., Recio, M.C., Giner, R.M., Garcia-Domenech, R., Torrens, F., Aran, V.J., Cordero-Maldonado, M.L., Esguera, C.V., de Witte, P.A.M., and Crawford, A.D., *Discovery of novel anti-inflammatory drug-like compounds by aligning in silico and in vivo screening: The nitroindazolinone chemotype*. Eur. J. Med. Chem., 2011. **46**(12): p. 5736-5753.
197. MINISTRES, C.D.L.E.C.D. *RELATIVE À LA CLASSIFICATION DES MÉDICAMENTS DONT LA DÉLIVRANCE EST SOUMISE À ORDONNANCE*. 1988; Available from:
<https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=0900001680509f75>.
198. Barar, F.S.K., *Essentials of Pharmacotherapeutics*. 2000: S. Chand Publishing. 606.
199. Gordon, P.C. *Anticoagulants In The Treatment Of Myocardial Infarction — A Review (p14-22)*. Available from:
<http://dalspace.library.dal.ca/bitstream/handle/10222/51598/DMJ.1954.7.1.a05.gordon.pdf?sequence=4&isAllowed=y>.
200. Arshad, A., Osman, H., Bagley, M.C., Lam, C.K., Mohamad, S., and Zahariluddin, A.S.M., *Synthesis and antimicrobial properties of some new thiazolyl coumarin derivatives*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(9): p. 3788-94.
201. Singh, D., Pathak, D.P., and Anjali, *Coumarins: an overview of medicinal chemistry. Potential for new drug molecules*. Int. J. Pharm. Sci. Res., 2016. **7**(2): p. 482-504.
202. Montagner, C., de Souza, S.M., Groposo, C., Delle Monache, F., Smania, E.F.A., and Smania, A., Jr., *Antifungal activity of coumarins*. Z. Naturforsch., C: J. Biosci., 2008. **63**(1/2): p. 21-28.
203. Sandhu, S., Bansal, Y., Silakari, O., and Bansal, G., *Coumarin hybrids as novel therapeutic agents*. Bioorg. Med. Chem., 2014. **22**(15): p. 3806-3814.
204. Ostrov, D.A., Prada, J.A.H., Corsino, P.E., Finton, K.A., Le, N., and Rowe, T.C., *Discovery of novel DNA gyrase inhibitors by high-throughput virtual screening*. Antimicrob. Agents Chemother., 2007. **51**(10): p. 3688-3698.
205. Nakada, N., Shimada, H., Hirata, T., Aoki, Y., Kamiyama, T., Watanabe, J., and Arisawa, M., *Biological characterization of cyclothialidine, a new DNA gyrase inhibitor*. Antimicrob. Agents Chemother., 1993. **37**(12): p. 2656-61.
206. Martin-Aragon, S., Benedi, J.M., and Villar, A.M., *Effects of the antioxidant (6,7-dihydroxycoumarin) esculetin on the glutathione system and lipid peroxidation in mice*. Gerontology (Basel), 1998. **44**(1): p. 21-25.

207. Whang, W.K., Park, H.S., Ham, I.H., Oh, M., Namkoong, H., Kim, H.K., Hwang, D.W., Hur, S.Y., Kim, T.E., Park, Y.G., Kim, J.-R., and Kim, J.W., *Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress*. *Exp. Mol. Med.*, 2005. **37**(5): p. 436-446.
208. Venugopala, K.N., Rashmi, V., and Odhav, B., *Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity*. *BioMed Res. Int.*, 2013: p. 963248, 14 pp.
209. Bezwada, R.S. *Chemistry of Coumarins*. 2008; Available from: http://indofinechemical.com/media/white_papers/white_papers.aspx.
210. João Matos, M.J., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O.A., Molina, E., and Guardado Yordi, E. *Coumarins — An Important Class of Phytochemicals*. 2015; Available from: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/48076.pdf>.
211. Jung, J.-C. and Park, O.-S., *Synthetic approaches and biological activities of 4-hydroxycoumarin derivatives*. *Molecules*, 2009. **14**(11): p. 4790-4803.
212. Pingaew, R., Saekee, A., Mandi, P., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., and Prachayasittikul, V., *Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel chalcone-coumarin hybrids as anticancer and antimalarial agents*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014. **85**: p. 65-76.
213. Kontogiorgis, C., Detsi, A., and Hadjipavlou-Litina, D., *Coumarin-based drugs: a patent review (2008 - present)*. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2012. **22**(4): p. 437-454.
214. Katsori, A.-M. and Hadjipavlou-Litina, D., *Coumarin derivatives: an updated patent review (2012 - 2014)*. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2014. **24**(12): p. 1323-1347.
215. Chiang, C.-C., Cheng, M.-J., Peng, C.-F., Huang, H.-Y., and Chen, I.-S., *A Novel Dimeric Coumarin Analog and Antimycobacterial Constituents from *Fatoua pilosa**. *Chem. Biodiversity*, 2010. **7**(7): p. 1728-1736.
216. Anand, P., Singh, B., and Singh, N., *A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012. **20**(3): p. 1175-1180.
217. Zhao, H., Neamati, N., Hong, H., Mazumder, A., Wang, S., Sunder, S., Milne, G.W.A., Pommier, Y., and Burke, T.R., Jr., *Coumarin-Based Inhibitors of HIV Integrase*. *J. Med. Chem.*, 1997. **40**(2): p. 242-249.
218. Musa, M.A., Cooperwood, J.S., and Khan, M.O.F., *A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer*. *Curr. Med. Chem.*, 2008. **15**(26): p. 2664-2679.
219. Lacy, A. and O'Kennedy, R., *Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer*. *Curr. Pharm. Des.*, 2004. **10**(30): p. 3797-3811.
220. Zheng, Y.M., Lu, A.X., Shen, J.Z., Kwok, A.H.Y., and Ho, W.S., *Imperatorin exhibits anticancer activities in human colon cancer cells via the caspase cascade*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(4): p. 1995-2002.
221. Upadhyay, K., Bavishi, A., Thakrar, S., Radadiya, A., Vala, H., Parekh, S., Bhavsar, D., Savant, M., Parmar, M., Adlakha, P., and Shah, A., *Synthesis and biological evaluation of 4-styrylcoumarin derivatives as inhibitors of TNF- α and IL-6 with anti-tubercular activity*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011. **21**(8): p. 2547-2549.
222. Grimm, E.L., Brideau, C., Chauret, N., Chan, C.-C., Delorme, D., Ducharme, Y., Ethier, D., Falguyret, J.-P., Friesen, R.W., Guay, J., Hamel, P., Riendeau, D., Soucy-Breau, C., Tagari, P., and Girard, Y., *Substituted coumarins as potent 5-lipoxygenase inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006. **16**(9): p. 2528-2531.
223. Grover, J., Kumar, V., Sobhia, M.E., and Jachak, S.M., *Synthesis, biological evaluation and docking analysis of 3-methyl-1-phenylchromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-ones as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014. **24**(19): p. 4638-4642.

224. Akhter, M., Akhter, N., Alam, M.M., Zaman, M.S., Saha, R., and Kumar, A., *Synthesis and biological evaluation of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole derivatives with both COX and LOX inhibitory activity*. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2011. **26**(6): p. 767-776.
225. Abdou, M.M., El-Saeed, R.A., and Bondock, S., *Recent advances in 4-hydroxycoumarin chemistry. Part 2: Scaffolds for heterocycle molecular diversity*. Arabian J. Chem., 2015: p. Ahead of Print.
226. Medina, F.G., Marrero, J.G., Macias-Alonso, M., Gonzalez, M.C., Cordova-Guerrero, I., Teissier Garcia, A.G., and Osegueda-Robles, S., *Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity*. Nat. Prod. Rep., 2015. **32**(10): p. 1472-1507.
227. Dyachenko, V.D. and Chernega, A.N., *Aliphatic aldehydes in multicomponent syntheses of 4-alkyl-substituted partially hydrogenated quinolines, fused 4H-pyrans, and 2-amino-4-ethyl-5-methylbenzene-1,3-dicarbonitrile*. Russ. J. Org. Chem., 2006. **42**(4): p. 567-576.
228. Seidman, M. and Link, K.P., *4-Hydroxycoumarins. XI. Cyclic ketals of 3-(α -acetonylbenzyl)-4-hydroxycoumarin*. J. Am. Chem. Soc., 1952. **74**: p. 1885-6.
229. Mahmoud, M.R., El-Bassiouny, F.A., Azab, M.E., El-Kady, M.Y., and Rashed, H.M., *Heteroannulation of chromene derivatives. Synthesis of chromeno[4,3-*e*]indazolone, chromeno[4,3-*f*]quinazoline and pyrano[3,2-*c*]chromene derivatives*. J. Chem. Res., 2009(1): p. 41-45.
230. Nesterov, V.N., Wiedenfeld, D., Nesterova, S.V., and Daniels, L.M., *Synthesis and X-ray structural investigations of 2-amino-7-methyl-4-(1-naphthyl)-5-oxo-4H,5H-pyran[4,3-*b*]pyran-3-carbonitrile and 2-amino-4-(1-naphthyl)-5-oxo-4H,5H-pyran[3,2-*c*]chromene-3-carbonitrile*. J. Chem. Crystallogr., 2005. **35**(11): p. 917-922.
231. Dyachenko, V.D. and Rusanov, E.B., *Isopropylidenemalononitrile in the synthesis of 2-amino-4,6,6-trimethylcyclohexa-2,4-diene-1,1,3-tricarbonitrile, 6-amino-2-(4-methoxybenzoylmethylsulfanyl)-4,4-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbonitrile, and fused 2-aminopyrans via Michael reactions*. Russ. J. Org. Chem., 2006. **42**(9): p. 1374-1379.
232. Dyachenko, V.D., *Isovaleric Aldehyde in the Synthesis of 4-Isobutyl-Substituted Pyridine-2(1H)-thiones, 4H-Pyrans, and 1,3-Cyclohexadiene*. Russ. J. Gen. Chem., 2005. **75**(3): p. 440-446.
233. Obach, R.S. and Kaminsky, L.S., *Synthesis of four tritium-labeled aminowarfarin methyl ketal regioisomers*. J. Label. Compd. Radiopharm., 1992. **31**(10): p. 763-74.
234. Bush, E. and Trager, W.F., *High-yield synthesis of warfarin and its phenolic metabolites: new compounds*. J. Pharm. Sci., 1983. **72**(7): p. 830-1.
235. Ikawa, M., Stahmann, M.A., and Link, K.P., *4-Hydroxycoumarins. V. Condensation of α,β -unsaturated ketones with 4-hydroxycoumarin*. J. Am. Chem. Soc., 1944. **66**: p. 902-6.
236. Stahmann, M.A., Ikawa, M., and Link, K.P., *3,4-Dihydropyranocoumarins*. 1947, Wisconsin Alumni Research Foundation .
237. Drake, N.L. and Allen, P., Jr., *Benzalacetone*. Org. Synth., 1923. **III**: p. 17-9.
238. Kumar, J.A., Saidachary, G., Mallesham, G., Sridhar, B., Jain, N., Kalivendi, S.V., Rao, V.J., and Raju, B.C., *Synthesis, anticancer activity and photophysical properties of novel substituted 2-oxo-2H-chromenylpyrazolecarboxylates*. Eur. J. Med. Chem., 2013. **65**: p. 389-402.
239. Nolan, K.A., Doncaster, J.R., Dunstan, M.S., Scott, K.A., Frenkel, A.D., Siegel, D., Ross, D., Barnes, J., Levy, C., Leys, D., Whitehead, R.C., Stratford, I.J., and Bryce,


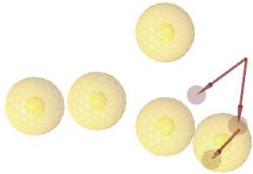
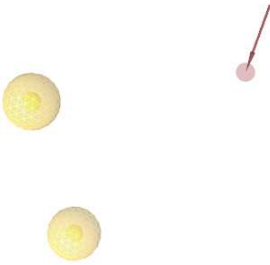



- R.A., *Synthesis and Biological Evaluation of Coumarin-Based Inhibitors of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase-1 (NQO1)*. J. Med. Chem., 2009. **52**(22): p. 7142-7156.
240. Knoelker, H.J. and Bauermeister, M., *Transition metal-diene complexes in organic synthesis. Iron-mediated total synthesis of carbazomycin A and B*. Helv. Chim. Acta, 1993. **76**(7): p. 2500-14.
241. Timonen, J.M., Nieminen, R.M., Sareila, O., Goulas, A., Moilanen, L.J., Haukka, M., Vainiotalo, P., Moilanen, E., and Aulaskari, P.H., *Synthesis and anti-inflammatory effects of a series of novel 7-hydroxycoumarin derivatives*. Eur. J. Med. Chem., 2011. **46**(9): p. 3845-3850.
242. Nishiwaki, N., Mori, Y., Fukuoka, E., Asahara, H., Hirao, S., Sawayama, J., Saigo, K., Konishi, T., and Shimoda, M., *Facilitation of the reduction of Pd(II) by the glass surface - Development of a glass-supported palladium catalyst*. Chem. Phys. Lett., 2014. **608**: p. 340-343.
243. Lewis, J.D., Van de Vyver, S., and Roman-Leshkov, Y., *Acid-Base Pairs in Lewis Acidic Zeolites Promote Direct Aldol Reactions by Soft Enolization*. Angew. Chem., Int. Ed., 2015. **54**(34): p. 9835-9838.
244. Zhang, W., Li, Z., Gu, H., Li, Y., Zhang, G., Zhang, F., and Fan, X., *L-proline covalently anchored on graphene oxide as an effective bifunctional catalyst for ketene forming reaction*. Chem. Eng. Sci., 2015. **135**: p. 187-192.
245. Pal, R., Sarkar, T., and Khasnobis, S., *Amberlyst-15 in organic synthesis*. ARKIVOC (Gainesville, FL, U. S.), 2012(1): p. 570-609.
246. Wang, Z., *Claisen-Schmidt Condensation*, in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. 2010, John Wiley & Sons, Inc.
247. Nielsen, A.T. and Houlihan, W.J., *The Aldol Condensation*, in *Organic Reactions*. 2004, John Wiley & Sons, Inc.
248. Mestres, R., *A green look at the aldol reaction*. Green Chem., 2004. **6**(12): p. 583-603.
249. Nakano, T., Irifune, S., Umamo, S., Inada, A., Ishii, Y., and Ogawa, M., *Cross-condensation reactions of cycloalkanones with aldehydes and primary alcohols under the influence of zirconocene complexes*. J. Org. Chem., 1987. **52**(11): p. 2239-44.
250. Huang, D., Wang, J.-X., Hu, Y., Zhang, Y., and Tang, J., *A new solvent-free synthesis of α,β -unsaturated ketones from acetals with aryl ketones under microwave irradiation*. Synth. Commun., 2002. **32**(7): p. 971-979.
251. Kad, G.L., Kaur, K.P., Singh, V., and Singh, J., *Microwave induced rate enhancement in aldol condensation*. Synth. Commun., 1999. **29**(15): p. 2583-2585.
252. Piste, P.B., *Synthesis of chalcones by grindstone chemistry as an intermediate in organic synthesis*. Int. J. Curr. Sci., 2014(Oct.): p. 62-66.
253. Rahman, A.F.M.M., Ali, R., Jahng, Y., and Kadi, A.A., *A facile solvent free Claisen-Schmidt reaction: synthesis of α,α' -bis-(substituted-benzylidene)cycloalkanones and α,α' -bis-(substituted-alkylidene)cycloalkanones*. Molecules, 2012. **17**: p. 571-583.
254. Rayar, A., Veitia, M.S.-I., and Ferroud, C., *An efficient and selective microwave-assisted Claisen-Schmidt reaction for the synthesis of functionalized benzalacetones*. SpringerPlus, 2015. **4**(1): p. 1-5.
255. Laboratory, O.C. and CHEM 334L, C., eds. *The Aldol Condensation-Preparation of 4-Methoxybenzalacetone*
256. Rosengren, A.M. and Karlsson, B.C.G., *Spectroscopic evidence for the presence of the cyclic hemiketal form of warfarin in aqueous solution: Consequences for bioavailability*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011. **407**(2): p. 318-320.
257. Porter, W.R., *Warfarin: history, tautomerism and activity*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 2010. **24**(6-7): p. 553-573.

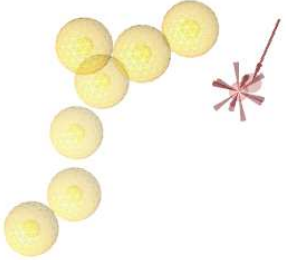
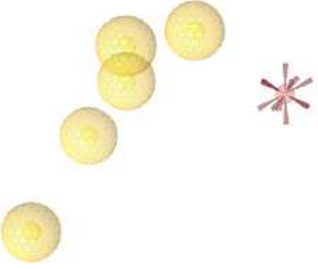





258. Dong, J. and Du, D.-M., *Highly enantioselective synthesis of Warfarin and its analogs catalysed by primary amine-phosphinamide bifunctional catalysts*. *Org. Biomol. Chem.*, 2012. **10**(40): p. 8125-8131.
259. Hirsh, J., Fuster, V., Ansell, J., and Halperin, J.L., *American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003. **41**(9): p. 1633-1652.
260. Manolov, I. and Danchev, N.D., *Synthesis, toxicological and pharmacological assessment of some 4-hydroxycoumarin derivatives*. *Eur. J. Med. Chem.*, 1995. **30**(6): p. 531-5.
261. Manolov, I. and Danchev, N.D., *Synthesis and Pharmacological Investigations of Some 4-Hydroxycoumarin Derivatives*. *Archiv der Pharmazie*, 2003. **336**(2): p. 83-94.
262. Barker, W.M., Hermodson, M.A., and Link, K.P., *4-Hydroxycoumarins. Synthesis of the metabolites and some other derivatives of warfarin*. *J. Med. Chem.*, 1971. **14**(2): p. 167-9.
263. Demir, A.S., Tanyeli, C., Gulbeyaz, V., and Akgun, H., *Enantioselective synthesis of 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenyl butyl)-2H-1-benzopyran-2-one (Warfarin)*. *Turk. J. Chem.*, 1996. **20**(2): p. 139-145.
264. Kim, H., Yen, C., Preston, P., and Chin, J., *Substrate-Directed Stereoselectivity in Vicinal Diamine-Catalyzed Synthesis of Warfarin*. *Org. Lett.*, 2006. **8**(23): p. 5239-5242.
265. Halland, N., Hansen, T., and Jorgensen, K.A., *Organocatalytic asymmetric Michael reaction of cyclic 1,3-dicarbonyl compounds and α,β -unsaturated ketones - A highly atom-economic catalytic one-step formation of optically active warfarin anticoagulant*. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003. **42**(40): p. 4955-4957.
266. Kischel, J., Michalik, D., Zapf, A., and Beller, M., *FeCl₃-catalyzed addition of 1,3-dicarbonyl compounds to aromatic olefins*. *Chem. - Asian J.*, 2007. **2**(7): p. 909-914.
267. Cravotto, G., Nano, G.M., Palmisano, G., and Tagliapietra, S., *An asymmetric approach to coumarin anticoagulants via hetero-Diels-Alder cycloaddition*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001. **12**(5): p. 707-709.
268. Chavan, A.P., *Microwave assisted synthesis of 4-aryl/alkylaminocoumarins*. *J. Chem. Res.*, 2006(3): p. 179-181.
269. Cravotto, G., Nano, G.M., Palmisano, G., Pilati, T., and Tagliapietra, S., *A library of pyranocoumarin derivatives via a one-pot three-component hetero Diels-Alder reaction*. *J. Heterocycl. Chem.*, 2001. **38**(4): p. 965-971.
270. Seidman, M., Robertson, D.N., and Link, K.P., *4-Hydroxycoumarins. X. Acylation of 3-(α -phenyl- β -acetyloethyl)-4-hydroxycoumarin*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950. **72**: p. 5193-5.
271. Shahzadi, S., Ali, S., Asif, I., Ashraf, R., and Jin, G.-X., *The mechanism and crystal structure of 2-methoxy-2-methyl-4-phenyl-3,4,4a,10b-tetrahydro-2H,5H-pyrano[3,2-c]chromen-5-one. Acetal of warfarin acid*. *Turk. J. Chem.*, 2006. **30**(6): p. 703-709.
272. Krstic, L.J., Sukdolak, S., and Solujic, S., *An efficient synthesis of warfarin acetals on montmorillonite clay K-10 with microwaves*. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2002. **67**(5): p. 325-329.
273. Singh, R., Rani, M., and Rani, S., *Condensation of warfarin with alcohols in dry media under microwave irradiation (Part-1)*. *Mater. Sci. Res. India*, 2007. **4**(1): p. 209-210.
274. Valente, E.J., Lingafelter, E.C., Porter, W.R., and Trager, W.F., *Structure of warfarin in solution*. *J. Med. Chem.*, 1977. **20**(11): p. 1489-93.
275. Jonathan Clayden, S.W., Nick Greeves, Peter Wothers. *Chimie organique*. 2002; ed. De Boeck Supérieur, Available from:

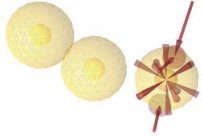




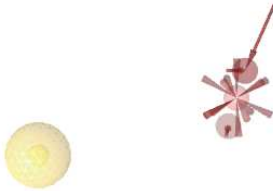



- https://books.google.fr/books?id=NXwf8ggMJiYC&pg=PA1361&lpg=PA1361&dq=effet+anom%C3%A8re+glucose&source=bl&ots=KP2NOF4Ph8&sig=u6XjPpvMEk9lLEDea_pVC9sWXTo&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwiEm_7X2t7PAhUJORoKHe1FAIMQ6AEIUTAH#v=onepage&q=effet%20anom%C3%A8re%20glucose&f=false
276. Bertrand, J., Liagre, B., Ghezali, L., Beneytout, J.-L., and Leger, D. Y., *Cyclooxygenase-2 positively regulates Akt signalling and enhances survival of erythroleukemia cells exposed to anticancer agents*. *Apoptosis*, 2013. **18**(7): p. 836-850.
277. Michaux, C., de Leval, X., Julemont, F., Dogne, J.-M., Pirotte, B., and Durant, F., *Structure-based pharmacophore of COX-2 selective inhibitors and identification of original lead compounds from 3D database searching method*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2006. **41**(12): p. 1446-1455.
278. Temml, V., Kaserer, T., Kutil, Z., Landa, P., Vanek, T., and Schuster, D., *Pharmacophore modeling for COX-1 and -2 inhibitors with LigandScout in comparison to Discovery Studio*. *Future Med. Chem.*, 2014. **6**(17): p. 1869-1881.
279. Tseng, T.-S., Chuang, S.-M., Hsiao, N.-W., Chen, Y.-W., Lee, Y.-C., Lin, C.-C., Huang, C., and Tsai, K.-C., *Discovery of a potent cyclooxygenase-2 inhibitor, S4, through docking-based pharmacophore screening, in vivo and in vitro estimations*. *Mol. BioSyst.*, 2016. **12**(8): p. 2541-2551.
280. Lokwani, D., Shah, R., Mokale, S., Shastry, P., and Shinde, D., *Development of energetic pharmacophore for the designing of 1,2,3,4-tetrahydropyrimidine derivatives as selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2012. **26**(3): p. 267-277.
281. Ali, A.M., Saber, G.E., Mahfouz, N.M., El-Gendy, M.A., Radwan, A.A., and El-Hamid, M.A., *Synthesis and three-dimensional qualitative structure selectivity relationship of 3,5-disubstituted-2,4-thiazolidinedione derivatives As COX2 inhibitors*. *Arch. Pharmacol. Res.*, 2007. **30**(10): p. 1186-1204.
282. Palomer, A., Cabre, F., Pascual, J., Campos, J., Trujillo, M.A., Entrena, A., Gallo, M.A., Garcia, L., Mauleon, D., and Espinosa, A., *Identification of Novel Cyclooxygenase-2 Selective Inhibitors Using Pharmacophore Models*. *J. Med. Chem.*, 2002. **45**(7): p. 1402-1411.
283. Manetti F, B.M., Tafi A, *Application of Pharmacophore Models in Medicinal Chemistry.*, ed. H.R. Langer T, editors. *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*. 32. WILEY-VCH; 2006.
284. Laggner C, W.G., Kirchmair J, Schuster D, Langer T. , *Pharmacophore-based Virtual Screening in Drug Discovery.*, ed. T.A. Varnek A, editors. *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening*. Royal Society of Chemistry. 2008.
285. Ben Nasr, N., Guillemain, H., Lagarde, N., Zagury, J.-F., and Montes, M., *Multiple Structures for Virtual Ligand Screening: Defining Binding Site Properties-Based Criteria to Optimize the Selection of the Query*. *J. Chem. Inf. Model.*, 2013. **53**(2): p. 293-311.
286. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E., *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Res.*, 2000. **28**(1): p. 235-242.
287. Gaulton, A., Bellis, L.J., Bento, A.P., Chambers, J., Davies, M., Hersey, A., Light, Y., McGlinchey, S., Michalovich, D., Al-Lazikani, B., and Overington, J.P., *ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery*. *Nucleic Acids Res.*, 2012. **40**(D1): p. D1100-D1107.

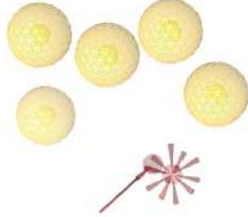

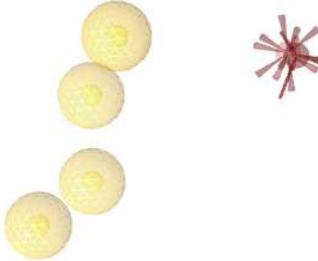
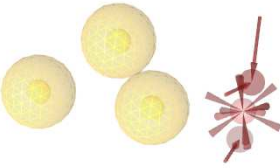


288. Mysinger, M.M., Carchia, M., Irwin, J.J., and Shoichet, B.K., *Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking*. J. Med. Chem., 2012. **55**(14): p. 6582-6594.
289. Froelich, J.C., *A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes*. Trends Pharmacol. Sci., 1997. **18**(1): p. 30-34.
290. O'Boyle, N.M., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T., and Hutchison, G.R., *Open Babel: an open chemical toolbox*. J. Cheminf., 2011. **3**: p. 33.
291. Schneider, N., Hindle, S., Lange, G., Klein, R., Albrecht, J., Briem, H., Beyer, K., Claussen, H., Gastreich, M., Lemmen, C., and Rarey, M., *Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 2012. **26**(6): p. 701-723.
292. Schneider, N., Lange, G., Hindle, S., Klein, R., and Rarey, M., *A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 2013. **27**(1): p. 15-29.
293. Maass, P., Schulz-Gasch, T., Stahl, M., and Rarey, M., *Recore: A Fast and Versatile Method for Scaffold Hopping Based on Small Molecule Crystal Structure Conformations*. J. Chem. Inf. Model., 2007. **47**(2): p. 390-399.
294. Seesar. *FlexX*. Available from: <https://www.biosolveit.de/FlexX/>.
295. Rarey, M., Kramer, B., and Lengauer, T., *The particle concept: placing discrete water molecules during protein-ligand docking predictions*. Proteins: Struct., Funct., Genet., 1999. **34**(1): p. 17-28.
296. Rarey, M., Kramer, B., and Lengauer, T., *Docking of hydrophobic ligands with interaction-based matching algorithms*. Bioinformatics, 1999. **15**(3): p. 243-250.
297. Kramer, B., Rarey, M., and Lengauer, T., *Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking*. Proteins: Struct., Funct., Genet., 1999. **37**(2): p. 228-241.
298. Rarey, M., Wefing, S., and Lengauer, T., *Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins*. J. Comput.-Aided Mol. Des., 1996. **10**(1): p. 41-54.







Annexes

Entrée	Code PDB	Description	Représentation
1	1CVU	3HBA, 5H	
2	1CX2	3HBA, 5H	
3	1DDX	1HBA, 2H	
4	1PXX	2HBA, 4H	
5	3HS5	2HBA, 1NI, 5H	
6	3HS6	2HBA, 6H	

7	3HS7	1HBA, 1NI, 7H	
8	3KRK	1NI, 5H	
9	3LN0	3HBA, 3H	
10	3LN1	2HBA, 2HBD, 5H	
11	3MDL	1H	
12	3MQE	2HBA, 3H	
13	3NTG	1HBA, 1NI, 5H	

14	3NT1	3HBA, 1NI, 3H	
15	3NTB	3HBA, 1NI, 4H	
16	3OLT	3HBA, 1NI, 5H	
17	3OLU	1H	
18	3PGH	1HBA, 1NI, 4H	
19	3QH0	3HBA, 1NI, 1H	
20	3QMO	2HBA, 1HBD, 1H	
21	3Q7D	3HBA, 1NI, 3H	
22	3RR3	3HBA, 1NI, 4H	

23	3TZI	1HBA, 1NI, 5H	
24	4COX	4HBA, 1NI, 4H	
25	4E1G	2HBA, 1NI, 4H	
26	4FM5	3HBA, 1NI, 3H	
27	4M10	4HBA, 3H	
28	4M11	3HBA, 2H	

29	4OTJ	4HBA, 1HBD, 4H	
30	4OTY	3HBA, 5H	
31	4PH9	3HBA, 1NI, 3H	
32	4RRW	2HBA, 5H	
33	4RRX	3HBA, 5H	
34	4RRZ	2HBA, 5H	


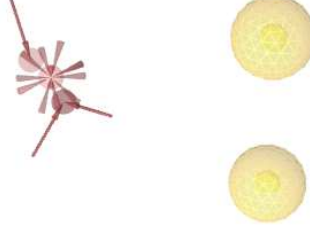



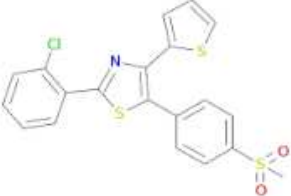

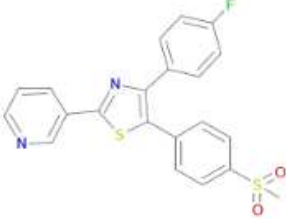
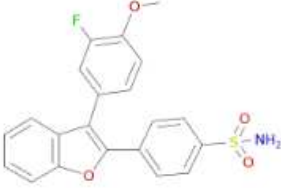

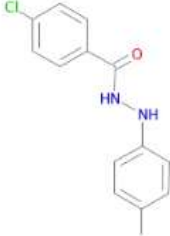
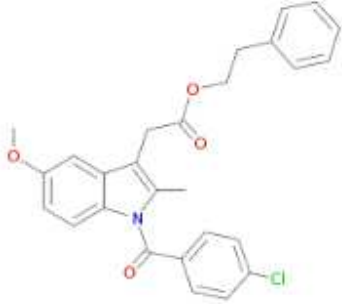

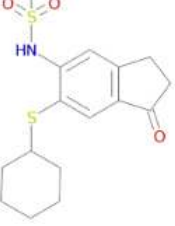
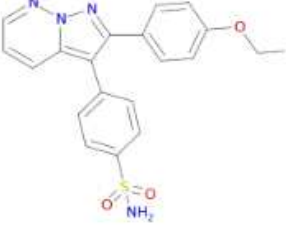
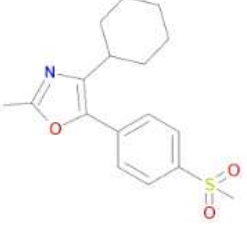
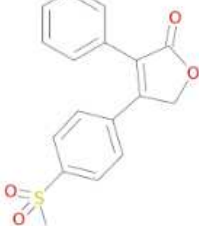
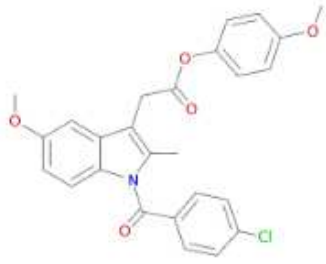
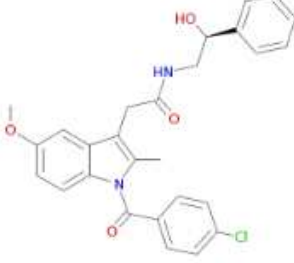
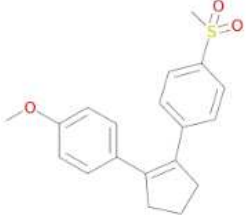
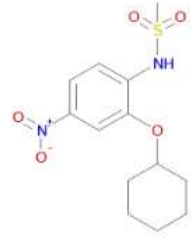
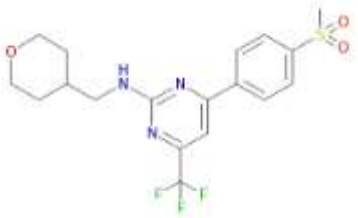




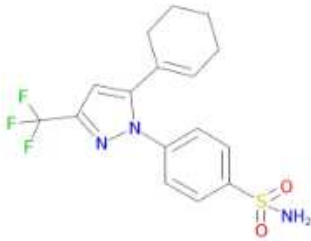
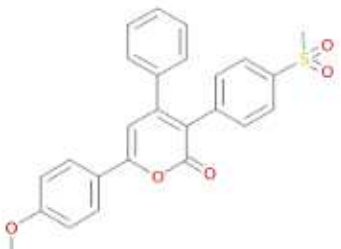
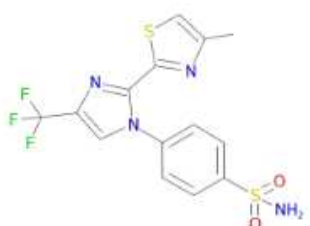
35	4RS0	3HBA, 1NI, 3H	
36	4RUT	3HBA, 1NI, 2H	
37a	4Z0L (ligand 4LA706)	3HBA, 3H	
37b	4Z0L (ligand N1B707)	2HBA, 3H	
38	6COX	2HBA, 1HBD, 5H	

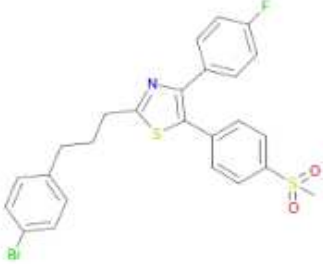
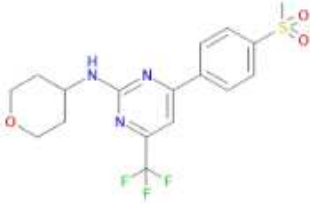
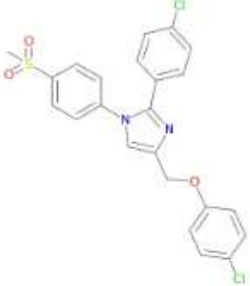


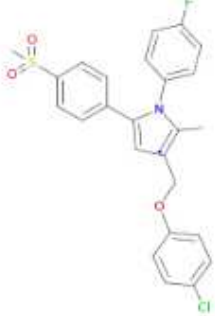
Tableau 23 : 38 pharmacophores « structure-based » issues des structures de COX-2 disponibles dans la PDB.



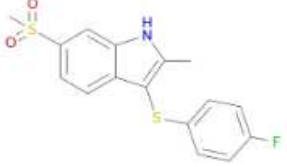
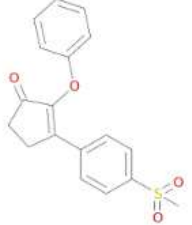
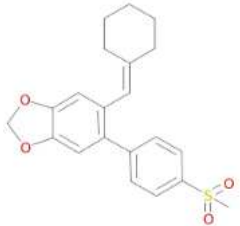
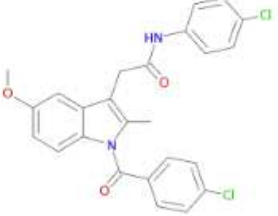
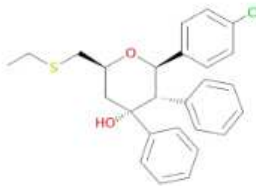
Entrée	ID ChEMBL	Représentation
1	17069	
2	144728	
3	275843	
4	76692	
5	52020	
6	154373	

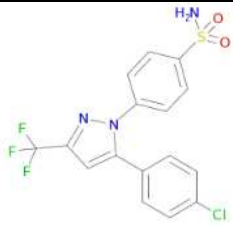
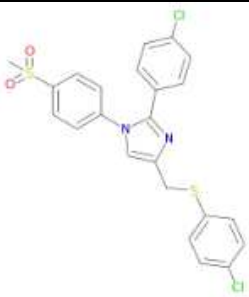
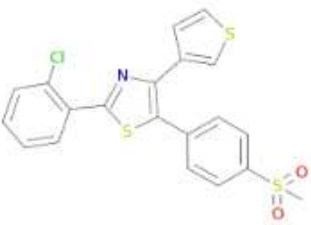
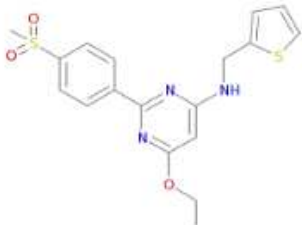

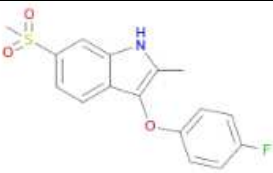
7	95643	
8	278492	
9	144787	
10	186632	
11	161677	
12	122	

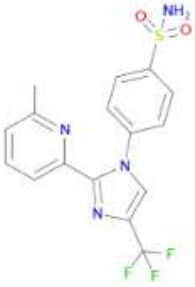

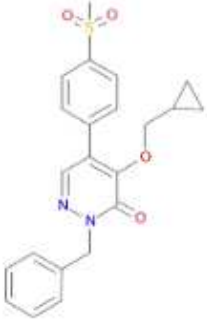
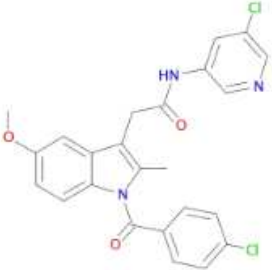
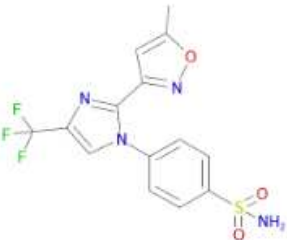
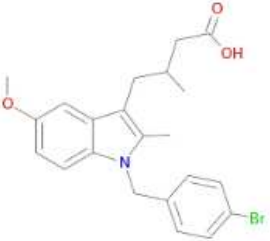
13	316866	
14	441769	
15	108201	
16	7162	
17	563322	
18	270294	

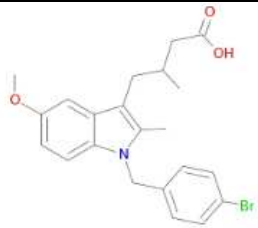


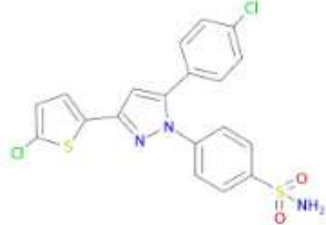
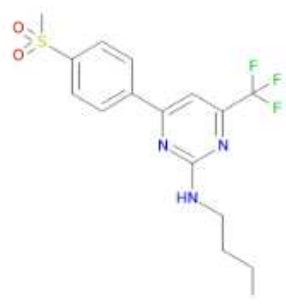
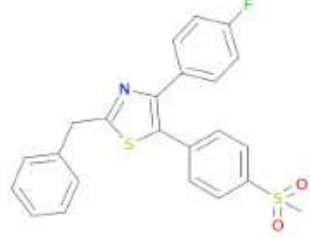
19	423576	
20	371477	
21	401947	
22	30091	
23	187137	
24	109017	

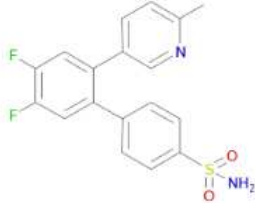
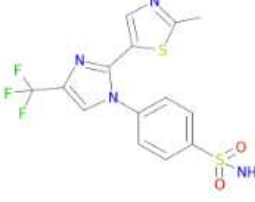

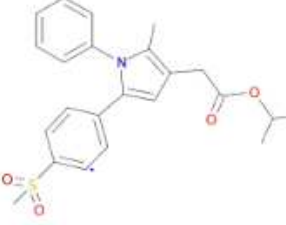
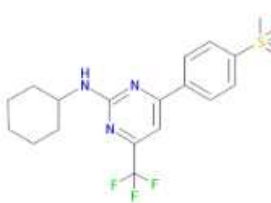
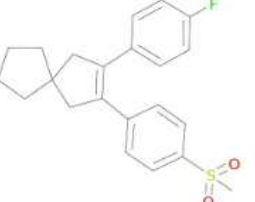
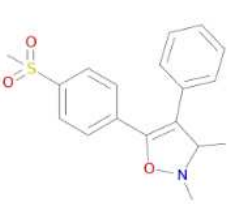
25	16516	
26	559886	
27	441236	
28	298729	
29	24687	
30	44152	


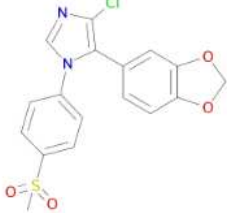
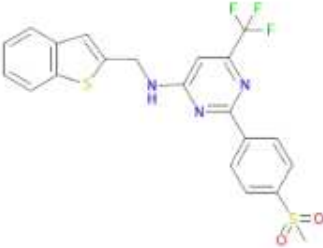
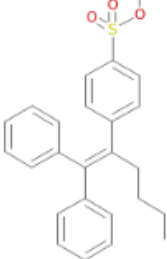

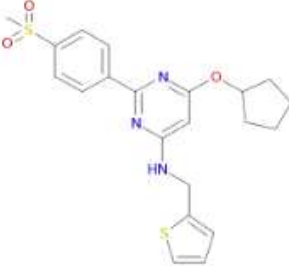
31	257054	
32	257054	
33	362290	
34	23649	
35	347720	
36	265078	
37	1096723	


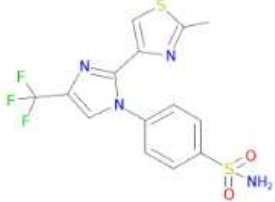

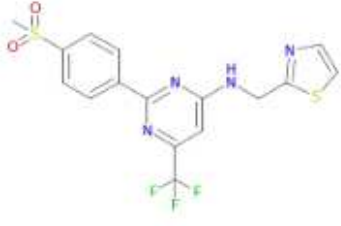

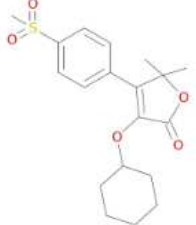

38	282093	
39	298084	
40	17179	
41	271173	
42	559613	
43	362093	

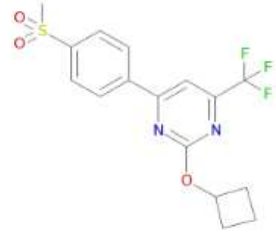


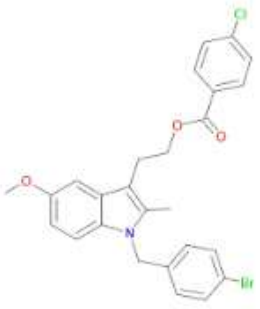
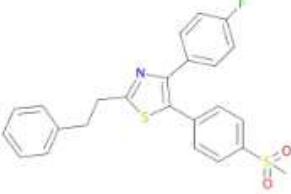
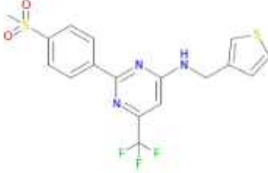
44	110331	
45	550473	
46	155898	
47	98514	
48	110660	
49	352174	

50	352174	
51	110382	
52	279552	
53	283633	
54	549393	
55	17276	

56	292413	
57	320926	
58	564729	
59	605820	
60	561891	
61	327900	
62	444805	

63	444805	
64	326335	
65	273118	
66	369609	
67	271932	
68	271348	

69	286490	
70	109143	
71	270730	
72	405123	
73	409468	
74	70104	
75	16689	

76	562791	
77	324312	
78	254377	
79	404107	
80	277385	
81	272627	

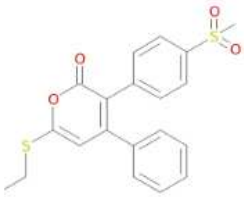

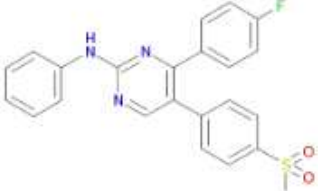

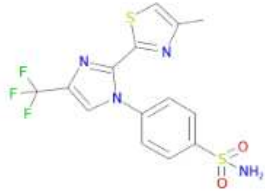
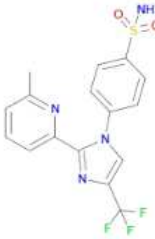
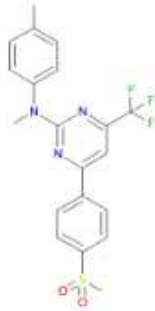
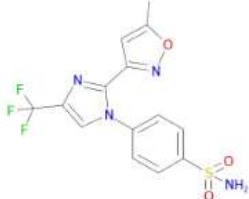
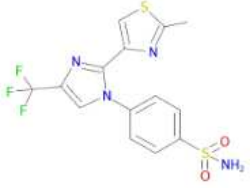
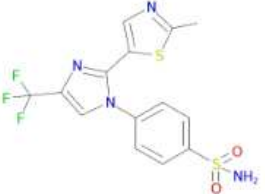

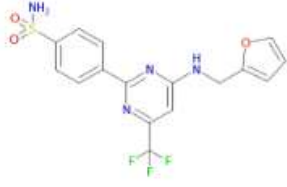

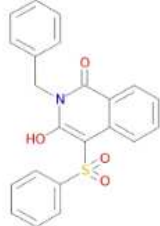
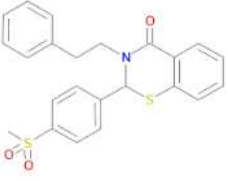




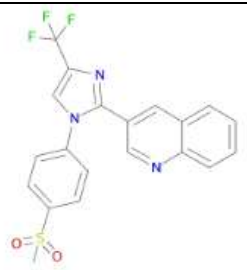
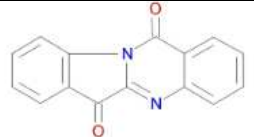
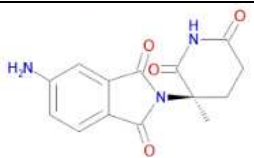
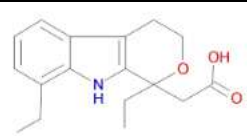
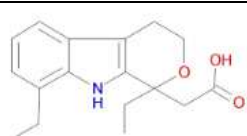

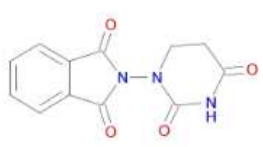
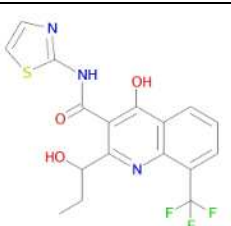


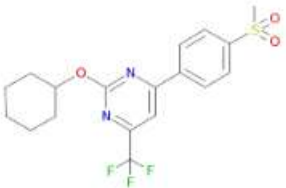
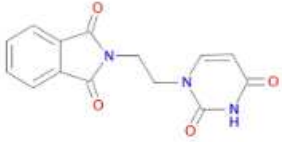
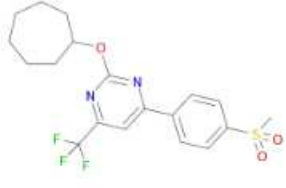
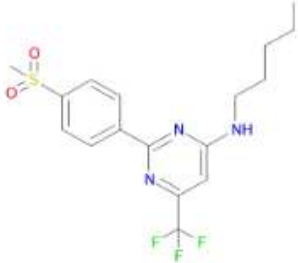
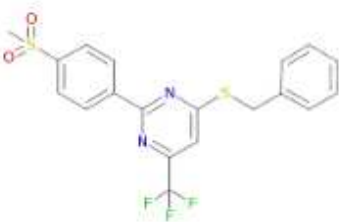
82	71833	
83	551829	
84	564962	
85	147580	

Tableau 24 : Représentation des 85 molécules de la DUD_E hautement sélectives (ratio IC_{50} > 1000)

Entrée	Molécules (ID ChEMBL) A / D	Sélectivité	Représentation
1	109017 (A)	≥ 1000	
2	110331(A)	≥ 1000	
3	559613(A)	≥ 1000	
4	110660(A)	≥ 1000	
5	109143(A)	≥ 1000	
6	320926(A)	≥ 1000	

7	405123(A)	≥ 1000	
8	409468(A)	≥ 1000	
9	18020	< 100	
10	276052	< 100	
11	557909	$100 \leq (\text{COX-1} / \text{COX-2}) < 500$	
12	64396	< 100	
13	527	< 100	
14	224400	< 100	

15	1097558	<100	
16	110446	$100 \leq (\text{COX-1/COX-2}) < 500$	
17	306946	<100	
18	9197	<100	
19	622	<100	
20	622	<100	
21	271763	$100 \leq (\text{COX-1/COX-2}) < 500$	
22	9123	<100	
23	287336	<100	

24	287336	<100	
25	287336	<100	
26	552081	$100 \leq (\text{COX-1/ COX-2}) < 500$	
27	8998	<100	
28	561005	$100 \leq (\text{COX-1/ COX-2}) < 500$	
29	257491	<100	
30	270723	$100 \leq (\text{COX-1/ COX-2}) < 500$	



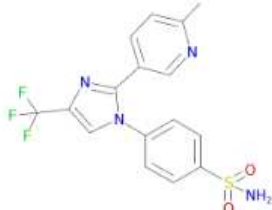
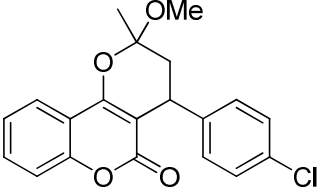
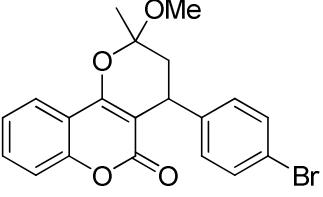
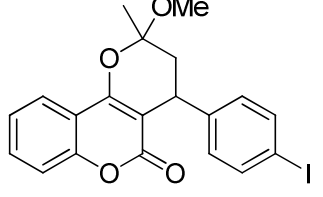
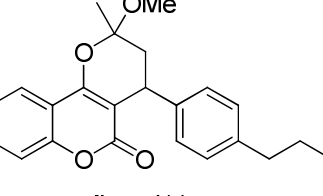
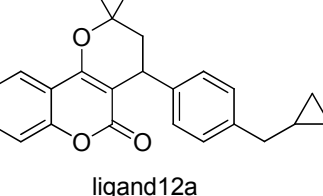
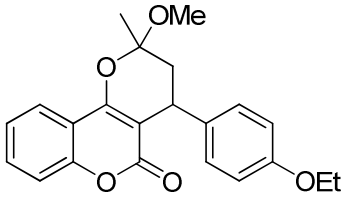
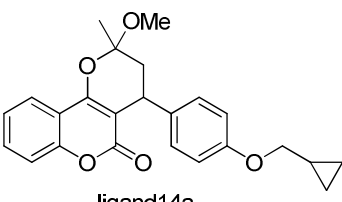
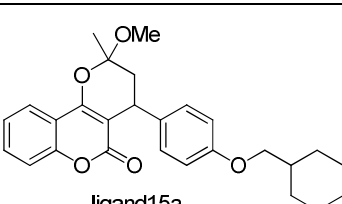
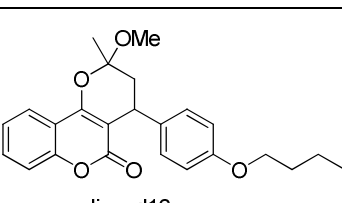
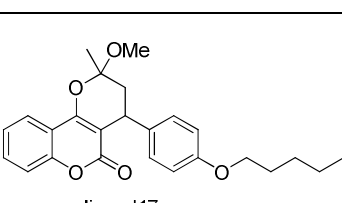
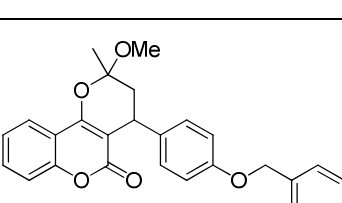
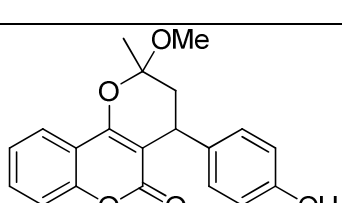
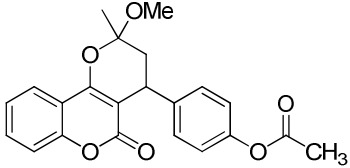
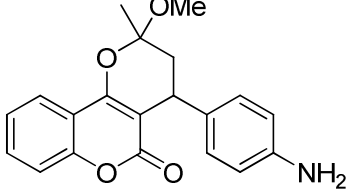
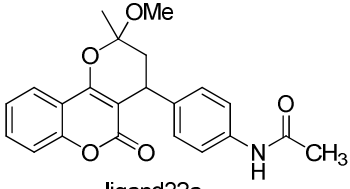
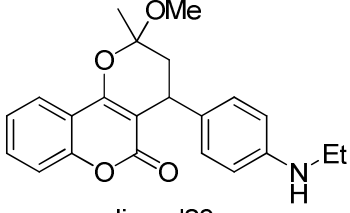
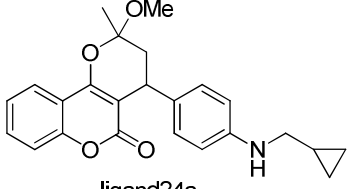
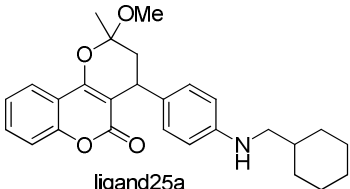
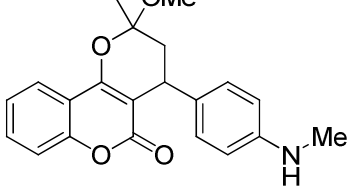
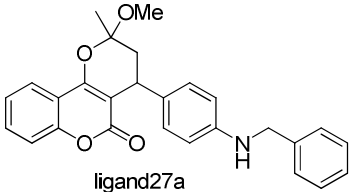
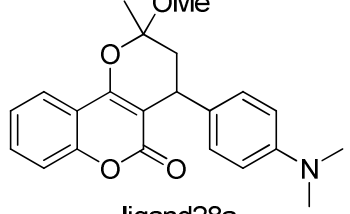
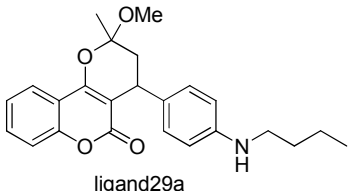
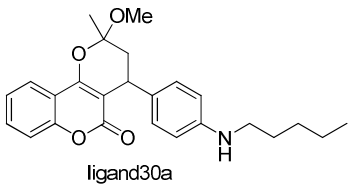
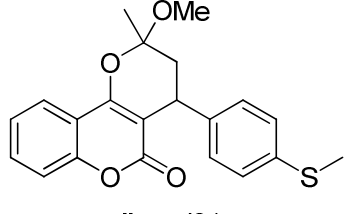
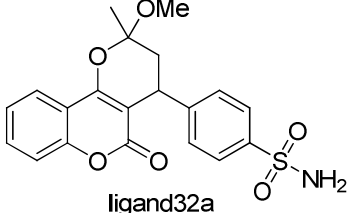
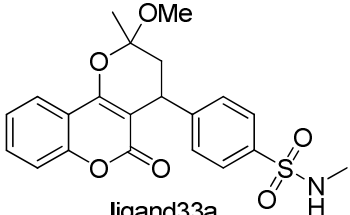
31	350729	<100	
32	551418	$100 \leq (\text{COX-1/ COX-2}) < 500$	
33	108936	$100 \leq (\text{COX-1/ COX-2}) < 500$	

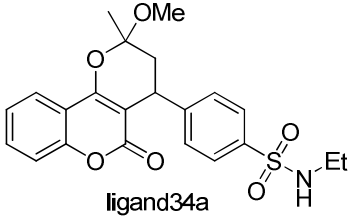
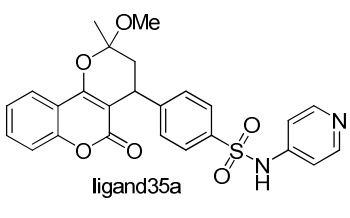
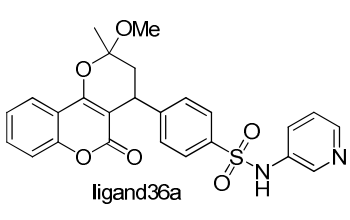
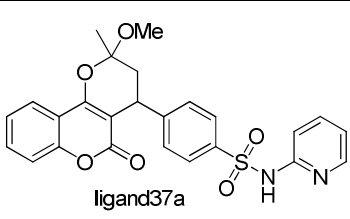
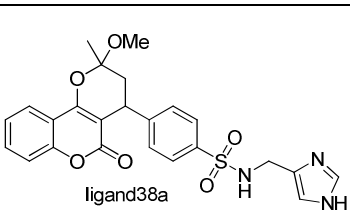
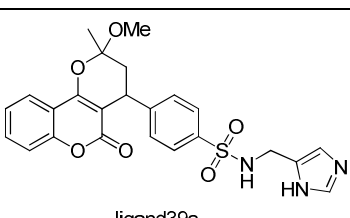
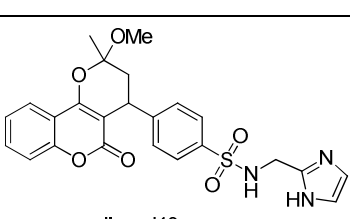
Tableau 25 : Molécules partageant le pharmacophore commun avec les dérivés du cyclocoumarol (A = Actives, D = Decoys).

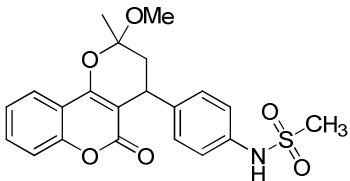
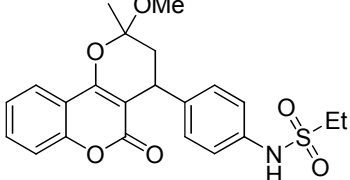
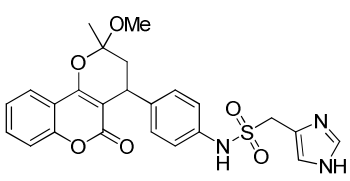
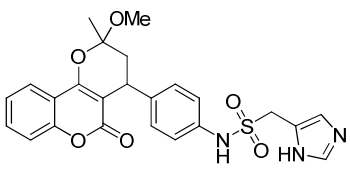
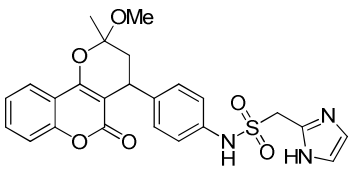
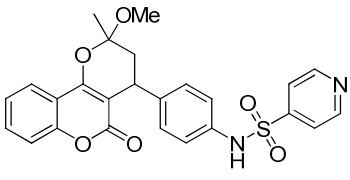
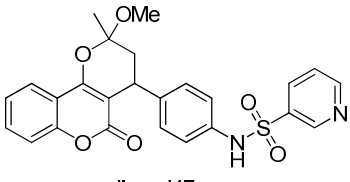
Molécules à prédire_a	Pymol Liaisons H (nb total de liaison H évaluée d'après la pose redessinée sur Seesar (cyclo4H+3ln0))	Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar
 <p>ligand8a</p>	Ser499, Ser322, (2)	nM
 <p>ligand9a</p>	X	Clash
 <p>ligand10a</p>	X	Clash
 <p>ligand11a</p>	Ser322, Ser499, (2)	pM-nM
 <p>ligand12a</p>	Ser499, (2)	nM

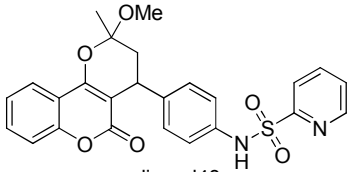
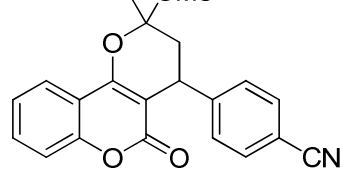
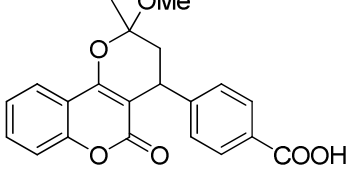
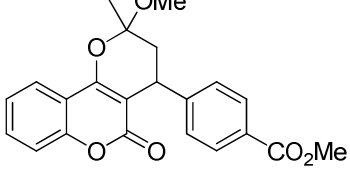
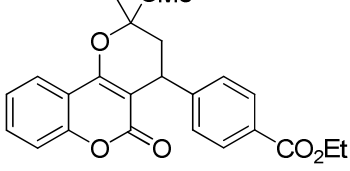
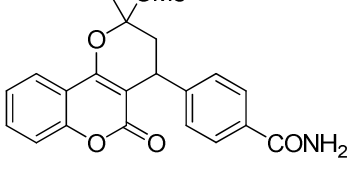
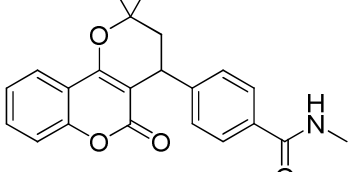
 <p>ligand13a</p>	X	Clash
 <p>ligand14a</p>	X	Clash
 <p>ligand15a</p>	X	Clash
 <p>ligand16a</p>	X	Clash
 <p>ligand17a</p>	X	Clash
 <p>ligand18a</p>	X	Clash
 <p>ligand19a</p>	X	Clash

 <p>ligand20a</p>	X	Clash
 <p>ligand21a</p>	X	Clash
 <p>ligand22a</p>	X	Clash
 <p>ligand23a</p>	X	Clash
 <p>ligand24a</p>	X	Clash
 <p>ligand25a</p>	X	Clash
 <p>ligand26a</p>	X	Clash

 <p>ligand27a</p>	X	Clash
 <p>ligand28a</p>	X	Clash
 <p>ligand29a</p>	X	Clash
 <p>ligand30a</p>	X	Clash
 <p>ligand31a</p>	X	Clash
 <p>ligand32a</p>	Ser499, Arg89, (2)	nM- μ M
 <p>ligand33a</p>	X	Clash

 <p>ligand34a</p>	X	Clash
 <p>ligand35a</p>	X	Clash
 <p>ligand36a</p>	X	Clash
 <p>ligand37a</p>	X	Clash
 <p>ligand38a</p>	X	Clash
 <p>ligand39a</p>	X	Clash
 <p>ligand40a</p>	X	Clash

 <p>ligand41a</p>	X	Clash
 <p>ligand42a</p>	X	Clash
 <p>ligand43a</p>	X	Clash
 <p>ligand44a</p>	X	Clash
 <p>ligand45a</p>	X	Clash
 <p>ligand46a</p>	X	Clash
 <p>ligand47a</p>	X	Clash

 <p>ligand48a</p>	X	Clash
 <p>ligand49a</p>	X	Clash
 <p>ligand50a</p>	Ser499, Arg89 (2)	μM
 <p>ligand51a</p>	Ser499, Arg89 (2)	nM- μM
 <p>ligand52a</p>	Ser499, Arg89 (2)	nm- μM
 <p>ligand53a</p>	Ser499, Arg89, Val 85 (5)	μM -mM
 <p>ligand54a</p>	Ser499, Arg89 (4)	μM

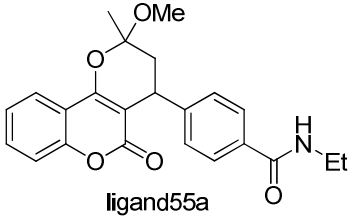
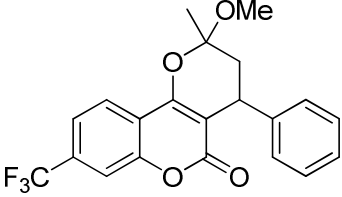
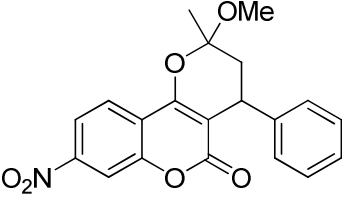
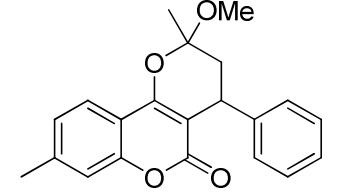
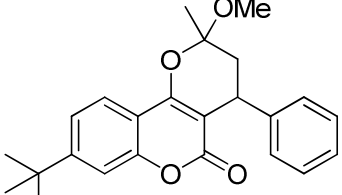
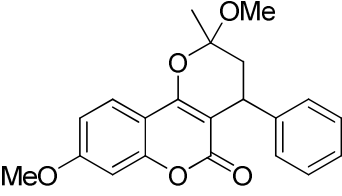
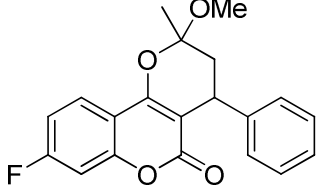
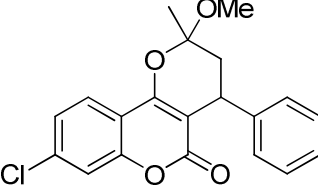
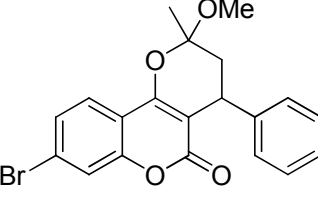
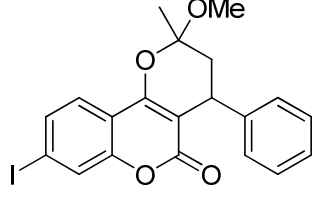
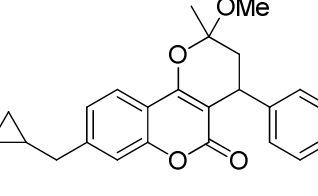
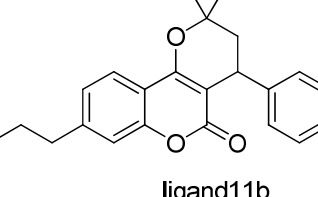
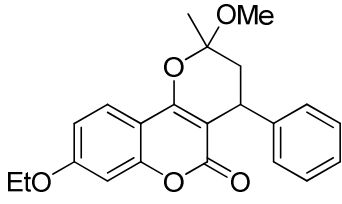
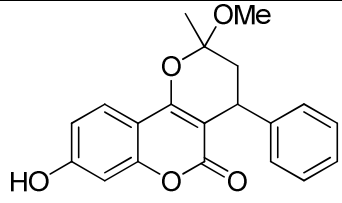
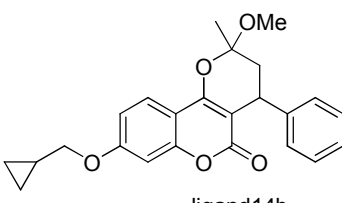
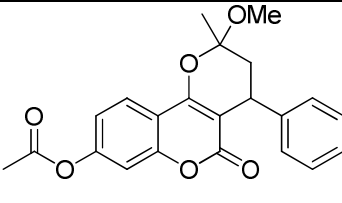
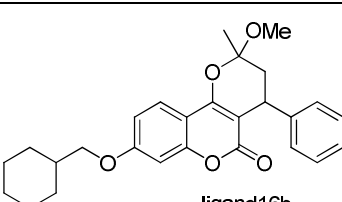
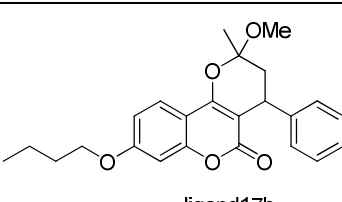
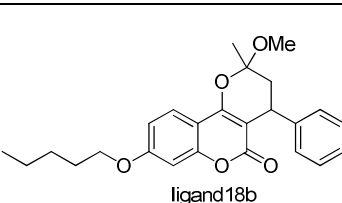
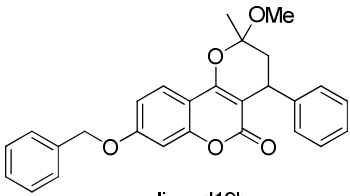
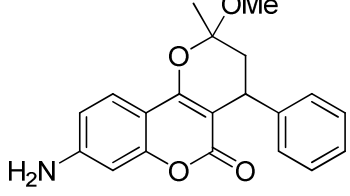
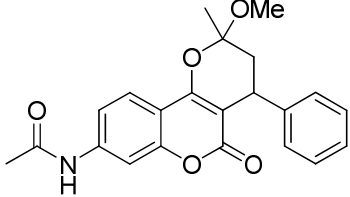
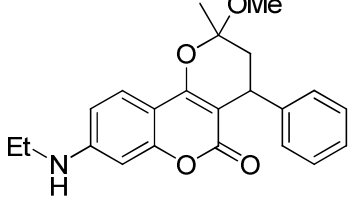
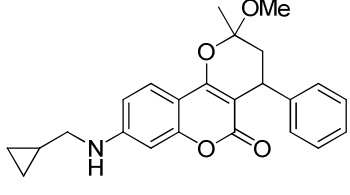
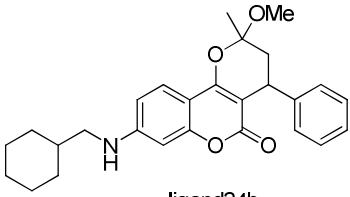
 <p>ligand55a</p>	<p>Ser499, Arg89 (3)</p>	<p>nm-μM</p>
--	------------------------------	-----------------------------

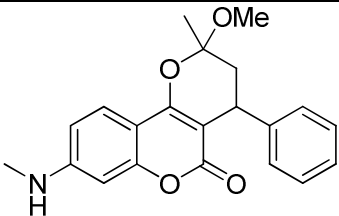
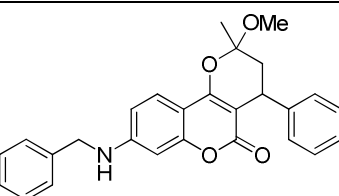
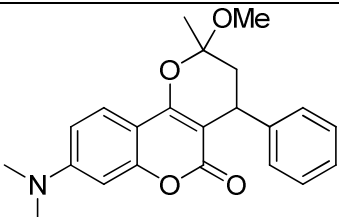
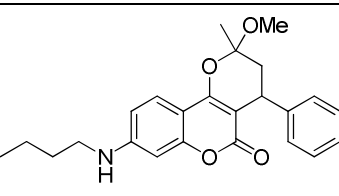
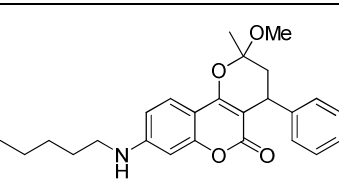
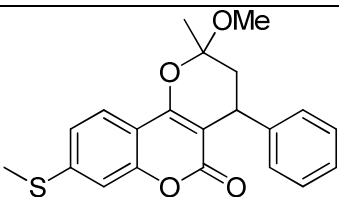
Tableau 26 : Série ligands_a

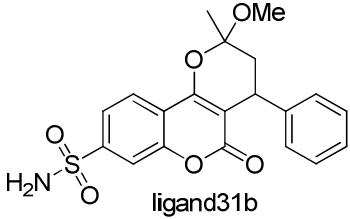
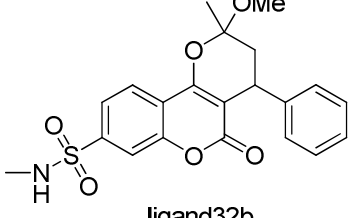
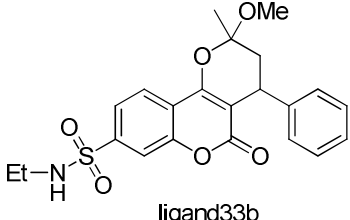
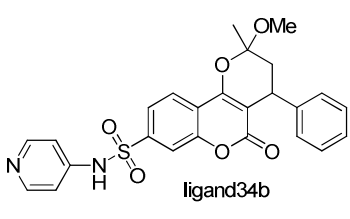
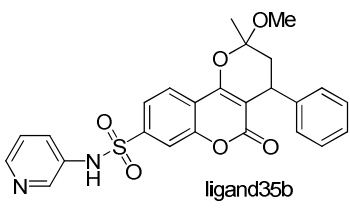
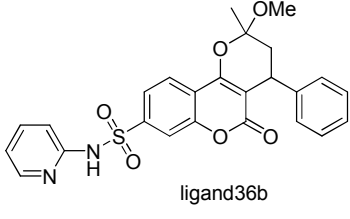
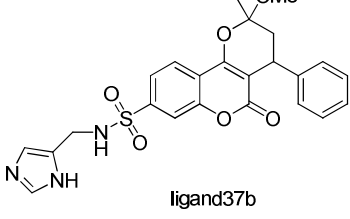
Molécules à prédire_b	Pymol Liaisons H (nb total de liaison H) Pose redessinée Seesar 3ln0+cyclo4H	Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar
 <p>ligand1b</p>	X	clash
 <p>ligand2b</p>	Ser 499, Trp 356, (2)	nM-μM
 <p>ligand3b</p>	Ser 499 (1)	nM
 <p>ligand4b</p>	X	clash
 <p>ligand5b</p>	Ser 499 (1)	nM-μM

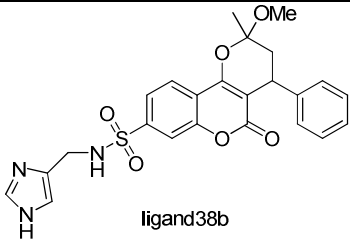
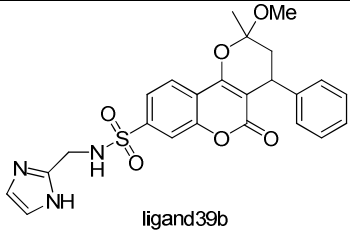
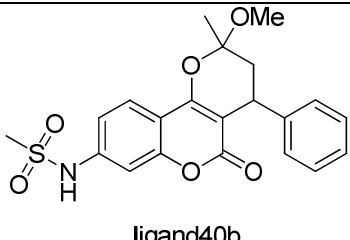
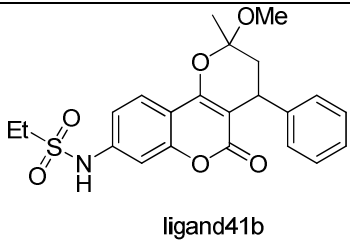
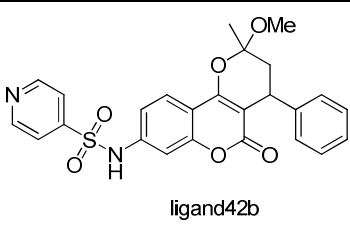
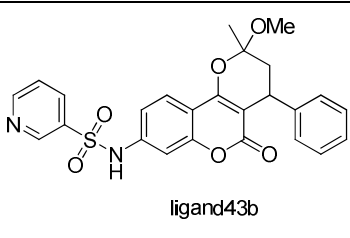
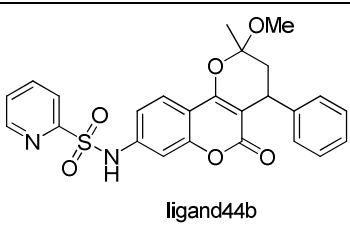
 <p>ligand6b</p>	Ser 499 (1)	nM
 <p>ligand7b</p>	Ser 499 (1)	nM
 <p>ligand8b</p>	Ser 499 (1)	nM
 <p>ligand9b</p>	X	clash
 <p>ligand10b</p>	X	clash
 <p>ligand11b</p>	X	clash

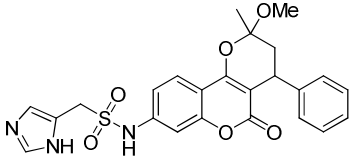
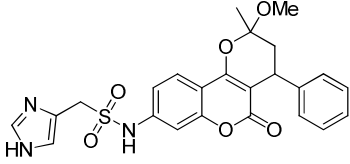
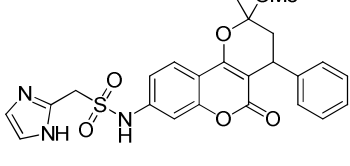
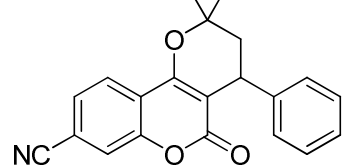
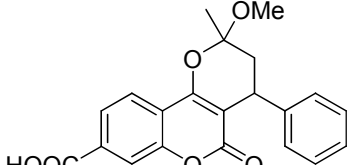
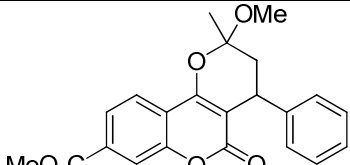
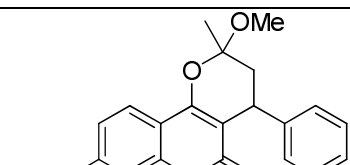
 <p>ligand12b</p>	X	clash
 <p>ligand13b</p>	Ser 499 (1)	nM- μ M
 <p>ligand14b</p>	X	clash
 <p>ligand15b</p>	X	clash
 <p>ligand16b</p>	X	clash
 <p>ligand17b</p>	X	clash
 <p>ligand18b</p>	X	clash

 <p>ligand19b</p>	X	clash
 <p>ligand20b</p>	Ser499 (1)	nM- μ M
 <p>ligand21b</p>	X	clash
 <p>ligand22b</p>	X	clash
 <p>ligand23b</p>	X	clash
 <p>ligand24b</p>	X	clash

 <p>ligand25b</p>	Ser499 (1)	nM- μ M
 <p>ligand26b</p>	X	clash
 <p>ligand27b</p>	X	clash
 <p>ligand28b</p>	X	clash
 <p>ligand29b</p>	X	clash
 <p>ligand30b</p>	X	clash

 <p>ligand31b</p>	X	clash
 <p>ligand32b</p>	X	clash
 <p>ligand33b</p>	X	clash
 <p>ligand34b</p>	X	clash
 <p>ligand35b</p>	X	clash
 <p>ligand36b</p>	X	clash
 <p>ligand37b</p>	X	clash

 <p>ligand38b</p>	X	clash
 <p>ligand39b</p>	X	clash
 <p>ligand40b</p>	X	clash
 <p>ligand41b</p>	X	clash
 <p>ligand42b</p>	X	clash
 <p>ligand43b</p>	X	clash
 <p>ligand44b</p>	X	clash

 <p>ligand45b</p>	X	clash
 <p>ligand46b</p>	X	clash
 <p>ligand47b</p>	X	clash
 <p>ligand48b</p>	Ser499, Ser322 (2)	nM- μ M
 <p>ligand49b</p>	Ser 499 (1)	μ M
 <p>ligand50b</p>	X	clash
 <p>ligand51b</p>	X	clash

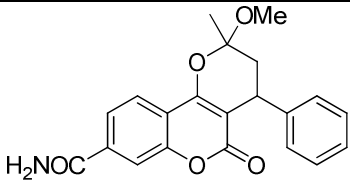
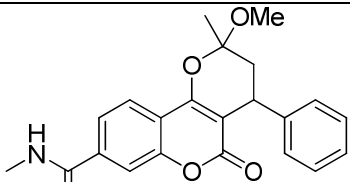
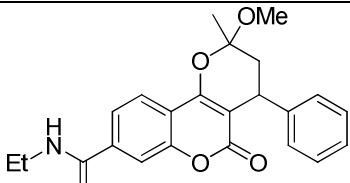
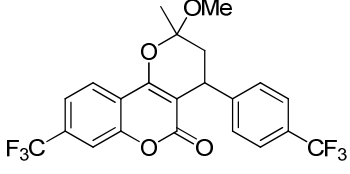
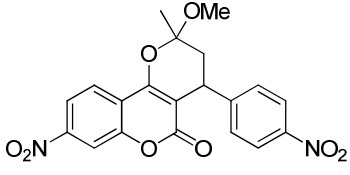
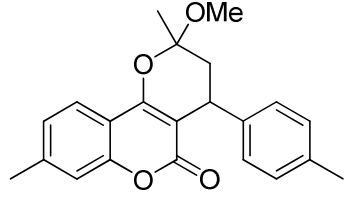
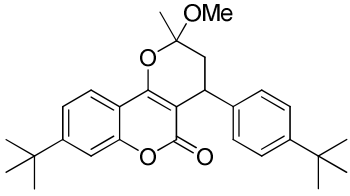
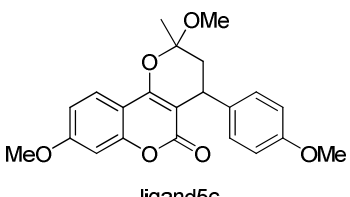
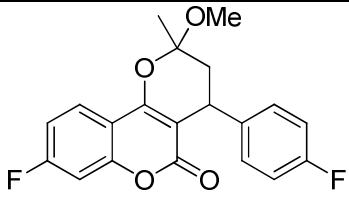
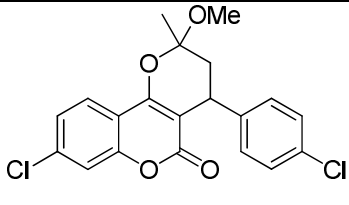
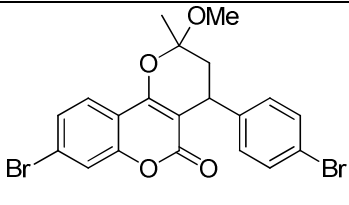
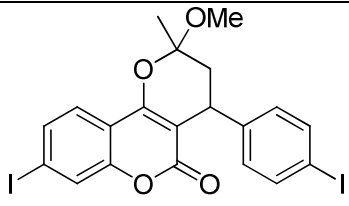
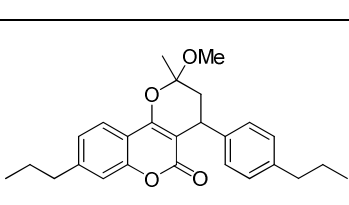
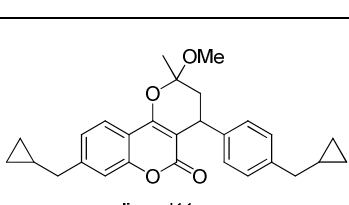
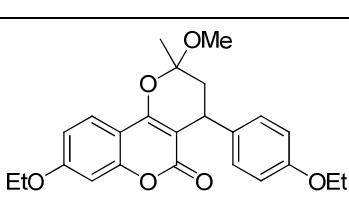
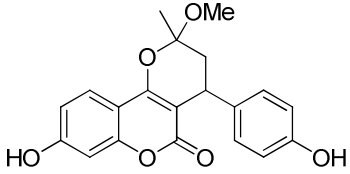
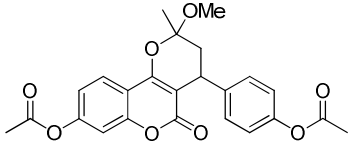
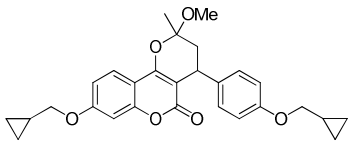
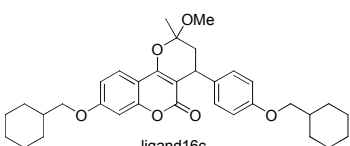
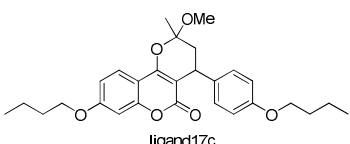
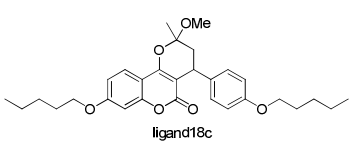
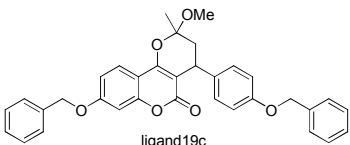
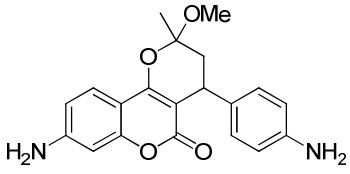
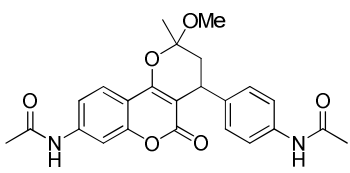
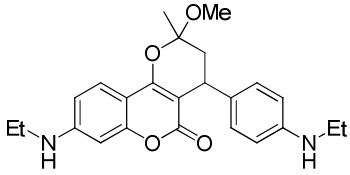
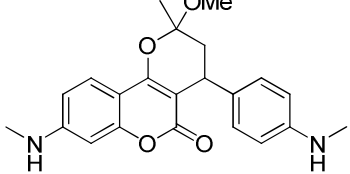
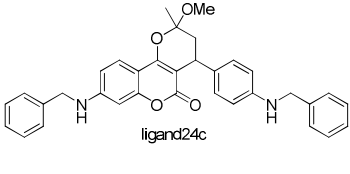
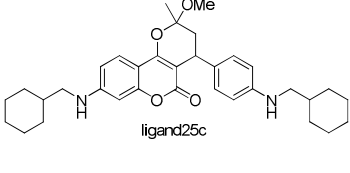
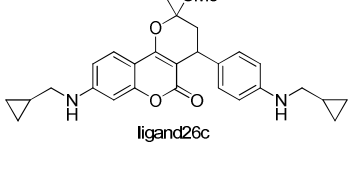
 <p>ligand52b</p>	X	clash
 <p>ligand53b</p>	X	clash
 <p>ligand54b</p>	X	clash

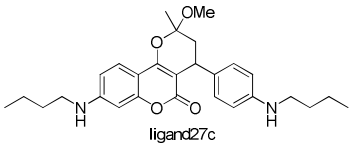
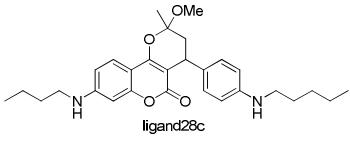
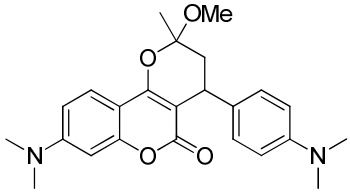
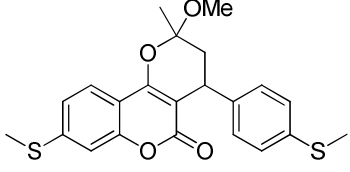
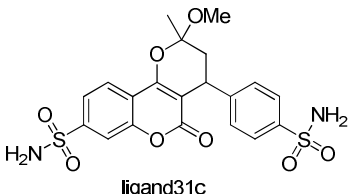
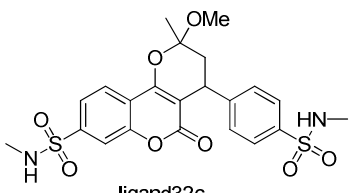
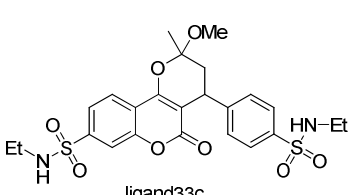
Tableau 27 : Série des ligands b

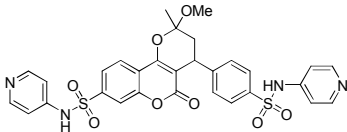
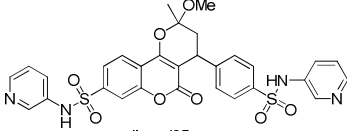
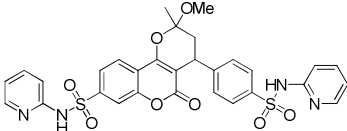
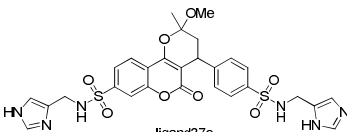
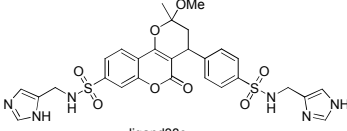
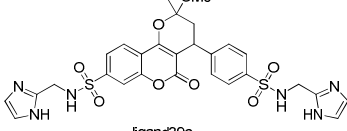
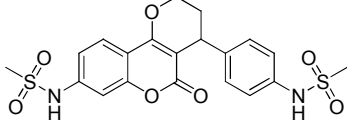
Molécules à prédire_c	Pymol Liaisons H (nb total de liaison H) Pose redessinée Seesar 3ln0+cyclo4H	Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar
 <p>ligand1c</p>	X	clash
 <p>ligand2c</p>	X	clash
 <p>ligand3c</p>	Ser499, Ser322 (2)	nM
 <p>ligand4c</p>	X	clash
 <p>ligand5c</p>	X	clash

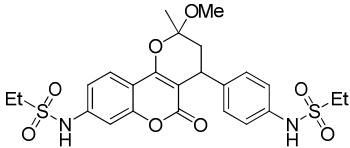
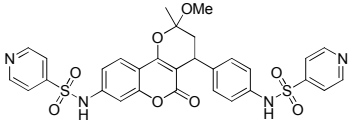
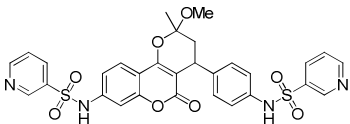
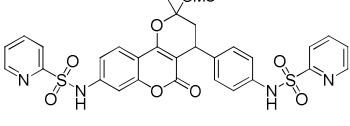
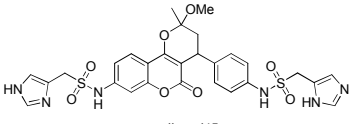
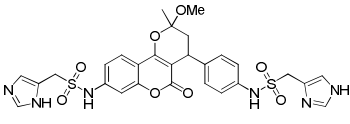
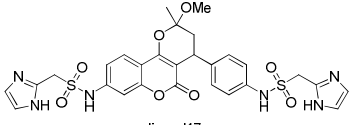
 <p>ligand6c</p>	Ser499, Ser322 (2)	nM
 <p>ligand7c</p>	X	clash
 <p>ligand8c</p>	X	clash
 <p>ligand9c</p>	X	clash
 <p>ligand10c</p>	X	clash
 <p>ligand11c</p>	X	clash
 <p>ligand12c</p>	X	clash

 <p>ligand13c</p>	X	clash
 <p>ligand14c</p>	X	clash
 <p>ligand15c</p>	X	clash
 <p>ligand16c</p>	X	clash
 <p>ligand17c</p>	X	clash
 <p>ligand18c</p>	X	clash
 <p>ligand19c</p>	X	clash

 <p>ligand20c</p>	X	clash
 <p>ligand21c</p>	X	clash
 <p>ligand22c</p>	X	clash
 <p>ligand23c</p>	X	clash
 <p>ligand24c</p>	X	clash
 <p>ligand25c</p>	X	clash
 <p>ligand26c</p>	X	clash

 <p>ligand27c</p>	X	clash
 <p>ligand28c</p>	X	clash
 <p>ligand29c</p>	X	clash
 <p>ligand30c</p>	X	clash
 <p>ligand31c</p>	X	clash
 <p>ligand32c</p>	X	clash
 <p>ligand33c</p>	X	clash

 <p>ligand34c</p>	X	clash
 <p>ligand35c</p>	X	clash
 <p>ligand36c</p>	X	clash
 <p>ligand37c</p>	X	clash
 <p>ligand38c</p>	X	clash
 <p>ligand39c</p>	X	clash
 <p>ligand40c</p>	X	clash

 <p>ligand41c</p>	X	clash
 <p>ligand42c</p>	X	clash
 <p>ligand43c</p>	X	clash
 <p>ligand44c</p>	X	clash
 <p>ligand45c</p>	X	clash
 <p>ligand46c</p>	X	clash
 <p>ligand47c</p>	X	clash

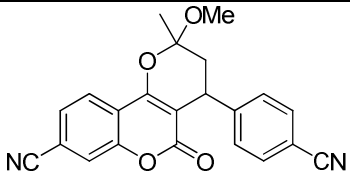
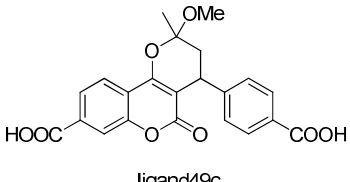
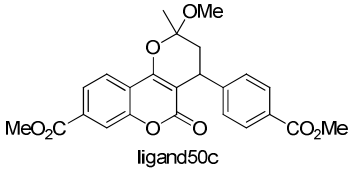
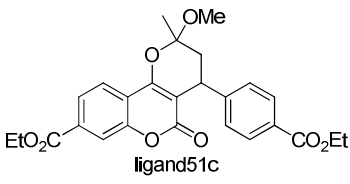
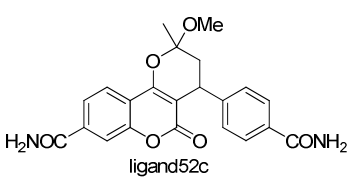
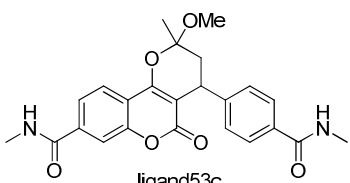
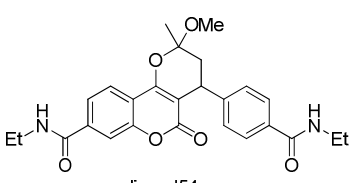
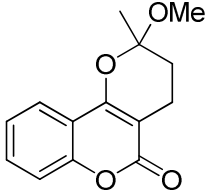
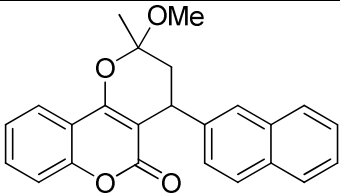
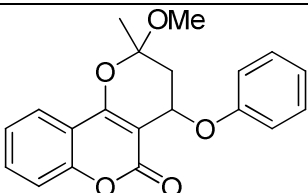
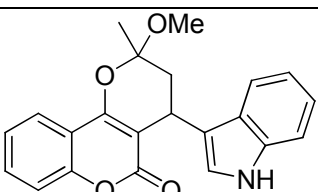
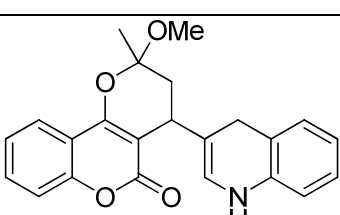
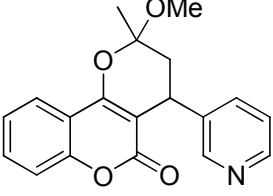
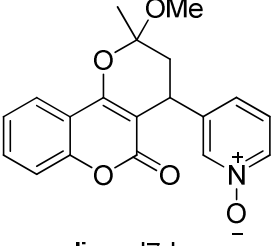
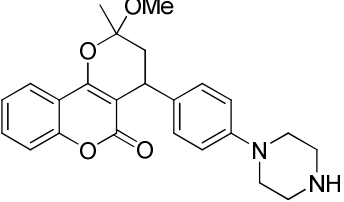
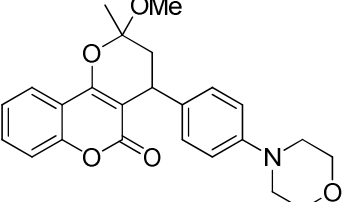
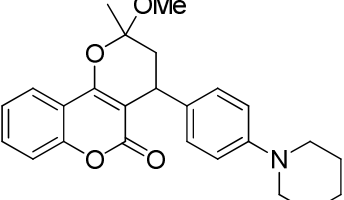
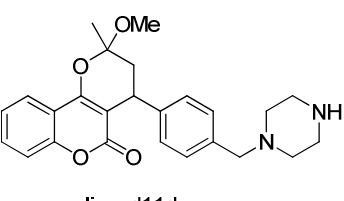
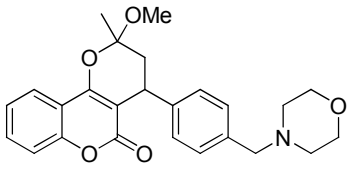
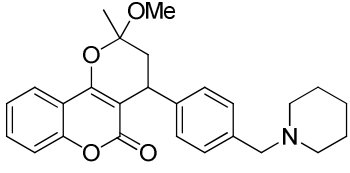
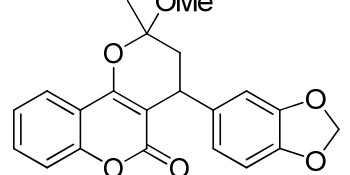
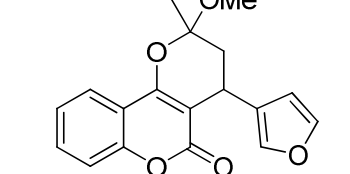
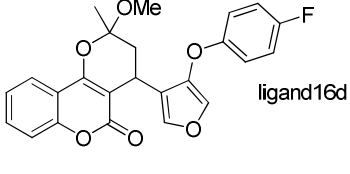
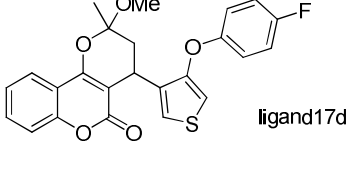
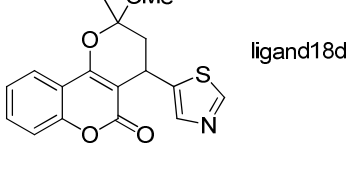
 <p>ligand48c</p>	X	clash
 <p>ligand49c</p>	X	clash
 <p>ligand50c</p>	X	clash
 <p>ligand51c</p>	X	clash
 <p>ligand52c</p>	X	clash
 <p>ligand53c</p>	X	clash
 <p>ligand54c</p>	X	clash

Tableau 28 : Série des ligands c

Molécules à prédire_d	Pymol Liaisons H (nb total de liaison H) Pose redessinée Seesar 3ln0+cyclo4H	Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar
 <p>ligand1d</p>	Ser499, Ser322 (2)	μM-mM
 <p>ligand2d</p>	X	clash
 <p>ligand3d</p>	Ser499 (1)	μM-mM
 <p>ligand4d</p>	X	clash
 <p>ligand5d</p>	X	clash

 <p>ligand6d</p>	X	clash
 <p>ligand7d</p>	X	clash
 <p>ligand8d</p>	X	clash
 <p>ligand9d</p>	X	clash
 <p>ligand10d</p>	X	clash
 <p>ligand11d</p>	X	clash

 <p>ligand12d</p>	X	clash
 <p>ligand13d</p>	X	clash
 <p>ligand14d</p>	X	clash
 <p>ligand15d</p>	Ser499 (1)	nM- μ M
 <p>ligand16d</p>	X	clash
 <p>ligand17d</p>	X	clash
 <p>ligand18d</p>	Ser499 (1)	nM- μ M

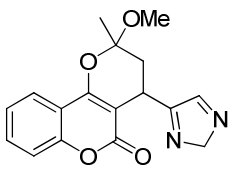
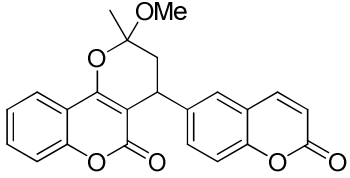
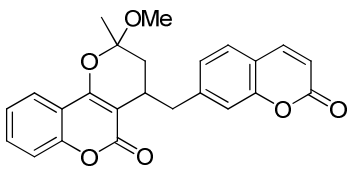
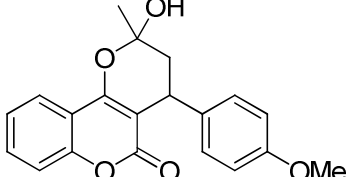
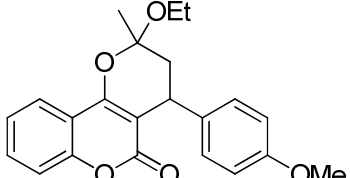
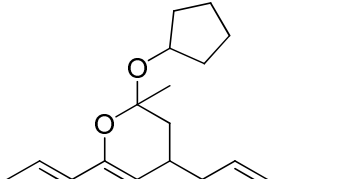
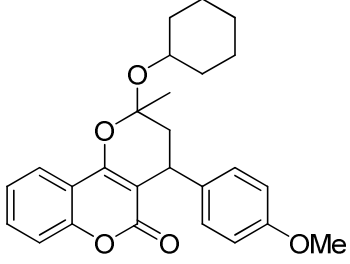
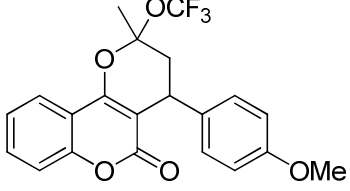
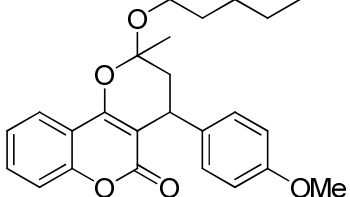
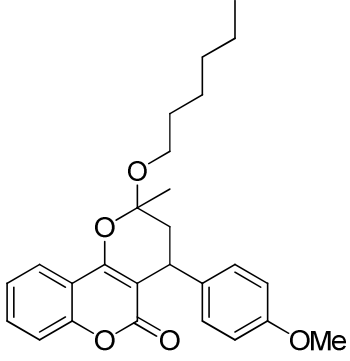
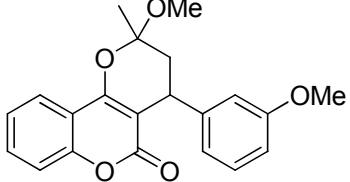
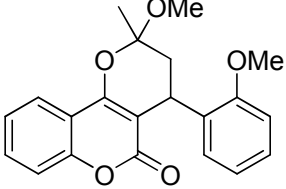
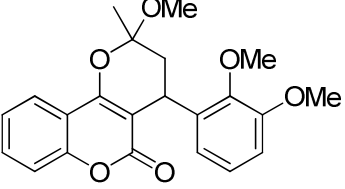
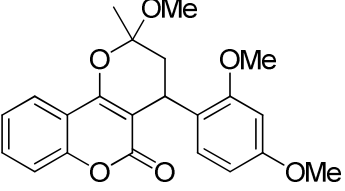
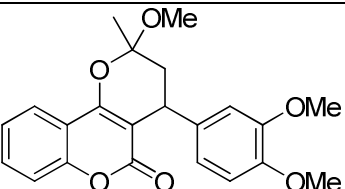
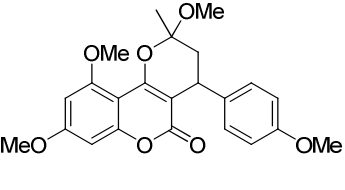
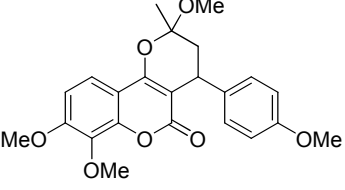
 <p>ligand19d</p>	Ser499 (1)	μM
--	------------	---------------

Tableau 29 : Série des ligands_d

Molécules à prédire_e_f	Pymol Liaisons H (nb total de liaison H) Pose redessinée Seesar 3ln0+cyclo4H	Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar
 <p>ligand1e</p>	X	clash
 <p>ligand2e</p>	X	clash
 <p>ligand1f</p>	Arg89, Ser 499, Ser 322 (3)	nM-μM
 <p>ligand2f</p>	X	clash
 <p>ligand3f</p>	X	clash

 <p>ligand4f</p>	X	clash
 <p>ligand5f</p>	X	clash
 <p>ligand6f</p>	X	clash
 <p>ligand7f</p>	X	clash
 <p>ligand8f</p>	Ser 499, Ser 322 (2)	$\mu\text{M-nM}$

 <p>ligand9f</p>	Ser 499, Ser 322 (2)	nM
 <p>ligand10f</p>	X	clash
 <p>ligand11f</p>	X	clash
 <p>ligand12f</p>	Arg89, Ser 499, Ser 322 (3)	pM-nM
 <p>ligand13f</p>	X	clash
 <p>ligand14f</p>	X	clash

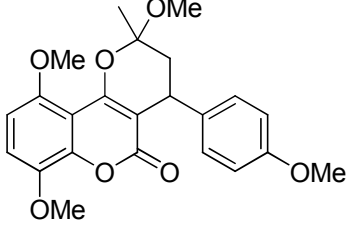
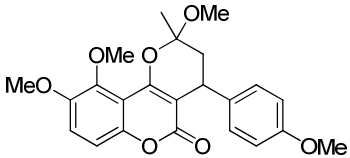
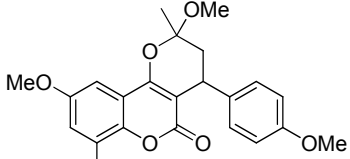
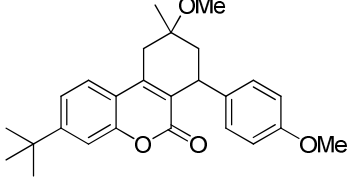
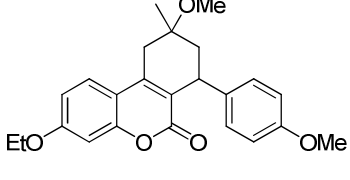
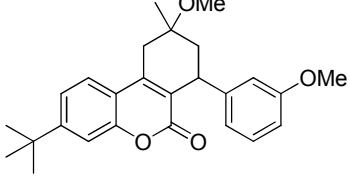
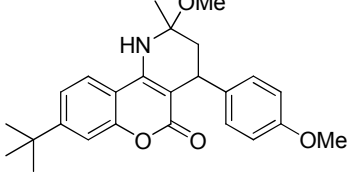
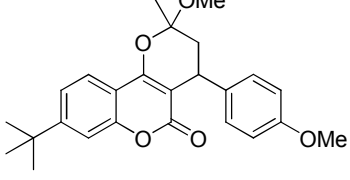
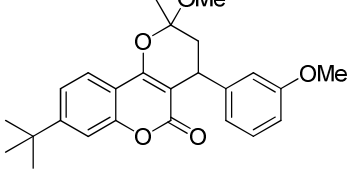
 <p>ligand15f</p>	X	clash
 <p>ligand16f</p>	X	clash
 <p>ligand17f</p>	X	clash

Tableau 30 : Série des ligands_f

Molécules à prédire	Pymol Liaisons H (nb total de liaison H) Pose redessinée Seesar 3ln0+cyclo4OMe	Prédiction d'affinité des molécules dessinées sur Seesar
 <p>ligand 12fa</p>	Ser499, Tyr 317, Tyr 354, Tyr 324 (4)	nM-μM
 <p>ligand 12ia</p>	Ser499, Tyr 317, Tyr 354, His 58, Tyr 324 (5)	nM-μM
 <p>ligand 13fa</p>	Ser499, Tyr 324 (2)	nM-μM
 <p>ligand 9fa</p>	Ser499, Tyr 317, Tyr 354, Tyr 324 (5)	nM-μM
 <p>ligand 6fa</p>	Ser499, Tyr 317, Tyr 354, Tyr 324 (4)	nM-μM
 <p>ligand 7fa</p>	Ser499, Tyr 324 (2)	nM-μM

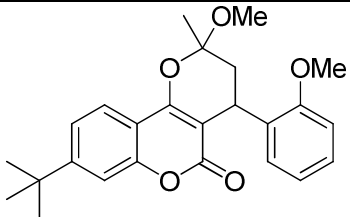
 <p>ligand 8fa</p>	<p>Ala 496, Tyr 324, Ser 499 (3)</p>	<p>nM-μM</p>
---	--	-----------------------------

Tableau 31: Série des ligands_4-OMebis

Liste des publications

5. Development of an *in Silico* Model of DPPH• Free Radical Scavenging Capacity: Prediction of Antioxidant Activity of Coumarin Type Compounds, Elizabeth Goya Jorge, **Anita Marie Rayar**, Stephen J. Barigye, María Elisa Jorge Rodríguez and Maité Sylla-Iyarreta Veitía, *International Journal of Molecular Sciences*, **2016**, *17*, (881), 1-10.
4. DPPH• free radical scavenging activity of coumarin derivatives. *In silico* and *in vitro* approach, Elizabeth Goya Jorge, **Anita Marie Rayar**, Stephen Jones Barigye, María Elisa Jorge Rodríguez and Maite Sylla Iyarreta Veitía, *Mol2Net*, **2015**, *1* (Section B), pages 1-6, *Proceedings*.
3. Microwave activated synthesis of benzalacetones and study of their potential antioxidant activity using artificial neural networks method, **Anita Marie Rayar**, Elizabeth Goya Jorge Stephen Jones Barigye, María Elisa Jorge Rodríguez, Clotilde Ferroud and Maite Sylla Iyarreta Veitía, *Mol2Net*, **2015**, *1* (Section B), pages 1-8, *Proceedings*.
2. An efficient and selective microwaves assisted Claisen-Schmidt reaction for the synthesis of functionalized benzalacetones; **Anita Rayar**, Maité Sylla-Iyarreta Veitía, Clotilde Ferroud. *SpringerPlus*, **2015**, *4* (1), 1-5.
1. Iodine(III)-mediated diazidation and azido-oxyamination of enamides, Sophie Nocquet-Thibault, **Anita Rayar**, Pascal Retailleau, Kevin Cariou, Robert H. Dodd, *Chemistry-A European Journal*, **2015**, *21* (40), 14205-10.

Liste des publications en preparation :

2. Synthesis, characterization and biological evaluation of new COX-2 inhibitors related with cyclocoumarol, **Anita-Marie Rayar**, Nathalie Lagarde, Frédérique Martin, Clotilde Ferroud, Jean-François Zagury, Bertrand Liagre, Maité Sylla-Iyarreta Veitía and Matthieu Montes. *In preparation for Bioorg.Med.Chem*.
1. Update on COX-2 selective inhibitors: chemical classification, side effects and their use in cancers and neuronal diseases, **Anita-Marie Rayar**, Nathalie Lagarde, Clotilde Ferroud, Jean-François Zagury, Matthieu Montes, Maité Sylla-Iyarreta Veitía, submitted in *Current topics in Medicinal Chemistry*

Liste des communications orales

2. *In silico* drug design and medicinal chemistry: development of new heterocycles compounds targeting the cyclooxygenase-2 (COX-2). 20^{ème} Journée de Chimie Organique et Chimie Organique Biologique de la Montagne Sainte-Geneviève. 31 may, **2016**, Institut Curie, Paris, France. *Oral Communication*

1. *In silico* drug design and medicinal chemistry: development of new unusual structures targeting the cyclooxygenase-2. 23^{ème} journées de Jeunes Chercheurs de la SCT. International Symposium. 15 -17 february, **2016**, Lille, France. *Flash poster presentation*

Posters

6. Development of original selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Pharmacophores design, Docking and Synthesis. 20^{ème} Journée de Chimie Organique , 7-9 septembre, **2016**, Palaiseau, France.

5. Development of original selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Pharmacophores design and Synthesis. 20^{ème} Journée de Chimie Organique et Chimie Organique Biologique de la Montagne Sainte-Geneviève. 31 mai, **2016**, Institut Curie, Paris, France

4. *In silico* drug design and medicinal chemistry: development of new unusual structures targeting the cyclooxygenase-2. 23^{ème} Journées de Jeunes Chercheurs de la SCT. 15 -17 février, **2016**, Lille, France.

3. Methods *in silico* and therapeutic chemistry: discovery of new original anti-inflammatories molecules. Journée des doctorants SMI de seconde année. 24-25 juin, **2015**, Ecole Nationale Supérieure d'Arts et Métiers, France.

2. An easy access to functionalized benzalacetones using microwaves assisted synthesis. 22^{ème} Journées de Jeunes Chercheurs de la SCT. 4-6 février, **2015**, Romainville, France.

1. An easy access to functionalized benzalacetones using microwaves assisted synthesis. 5^{ème} Symposium Franco-Tchèque "Vltava" de Chimie. 8 -9 septembre, **2014**, Gif-sur-Yvette, France

Anita-Marie RAYAR

In silico drug design et chimie médicinale : développement de nouvelles molécules coumariniques, sélectives de la cyclooxygénase-2.

Résumé

L'inflammation est un phénomène affectant des millions de personnes à travers le monde. Il existe une grande variété de médiateurs inflammatoires impliqués dans différentes fonctions biologiques, dont la cyclooxygénase-2. Bien que de nombreux inhibiteurs sélectifs de la COX-2 aient été développés et commercialisés, ceux-ci présentent des effets secondaires dont la gravité a entraîné, dans certains cas, l'arrêt de leur commercialisation.

De nos jours, les méthodes *in silico* sont de plus en plus employées dans les stratégies de découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Au cours de ce projet, nous nous sommes appuyés sur les modèles pharmacophoriques et les méthodes de docking afin de guider et de prioriser la synthèse de molécules de structures diverses et originales, susceptibles de présenter les meilleures affinités pour la cible étudiée. Ainsi, des prédictions réalisées avec le logiciel TOMOCOMD-CARDD combinées à des tests biologiques, ont permis d'identifier le cyclocoumarol comme une molécule potentiellement anti-inflammatoire.

Dans le cadre de ces travaux nous nous sommes intéressés à la synthèse et l'étude d'analogues du cyclocoumarol en tant qu'inhibiteurs sélectifs de la COX-2. La pharmacomodulation autour du cyclocoumarol et la mise en place de stratégies de synthèse judicieuses ont permis d'obtenir une série d'analogues. Divers outils bioinformatiques ont été utilisés : le logiciel LigandScout a permis de construire des pharmacophores sélectifs de la COX-2 et les études de docking ont permis de comprendre les modes de liaisons des différents composés. Enfin, le logiciel SeeSAR, a permis de prédire l'affinité des molécules les plus susceptibles d'inhiber sélectivement la COX-2. Les tests biologiques ont confirmé leur activité inhibitrice envers la COX-2 avec une inhibition non significative vis-à-vis de COX-1. Parmi les molécules synthétisées, le 4-OMe cyclocoumarol a démontré une activité et une sélectivité très intéressantes, comparables au NS-398, un inhibiteur sélectif connu de la COX-2.

A partir des résultats biologiques obtenus, un travail de pharmacomodulation autour de ces dérivés du cyclocoumarol a été réalisé en utilisant des outils *in silico* dans le but de prédire l'affinité de nouveaux composés et de découvrir de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la COX-2.

Mots clés : cyclocoumarol, benzalacétones, warfarines, pharmacophores, docking, criblage virtuel, COX-2, repositionnement

Summary

Inflammation is a phenomenon affecting millions of people throughout the world. There is a broad range of inflammatory mediators implied in different biological functions including the cyclooxygenase-2. Although many selective inhibitors selective of COX-2 have been developed and marketed, they have displayed diverse side effects leading, in some cases, to their withdrawal from the market.

Nowadays, *in silico* methods are more and more used in the drug discovery process. In this project, we have used pharmacophoric models and docking methods to guide and prioritize the synthesis of molecules, presenting different and original structures, with enhanced affinity for the biological target. Thus, predictions realized with the TOMOCOMD-CARDD software together with biological tests enable to identify the cyclocoumarol as a potential anti-inflammatory molecule.

As part of these works, the synthesis of and the study of cyclocoumarol analogues as selective inhibitors of COX-2 have been realized. Pharmacomodulation of cyclocoumarol and development of synthesis strategies led to a serie of cyclocoumarol analogues. Several bioinformatics tools have been used: selective COX-2 pharmacophores were elucidated using LigandScout and docking studies (Surflex) were conducted to understand the binding mode of different compounds. Finally, SeeSAR enabled to predict the affinity of the molecules the most susceptible to inhibit selectively COX-2. Biological tests confirmed their inhibitory activity against COX-2 and showed no significant inhibition for COX-1. Among the synthesized molecules, the 4-OMe cyclocoumarol has demonstrated an activity and a selectivity very interesting, similar to NS-398, a known selective COX-2 inhibitor.

Based on the biological results obtained, a pharmacomodulation study of cyclocoumarol derivatives has been realized using *in silico* tools in order to predict the affinity of new compounds and to discover new selective inhibitors of COX-2.

Keywords : cyclocoumarol, benzalacetones, warfarines, pharmacophores, docking, virtual screening, COX-2, repositioning