

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université d'EL-Oued
Faculté des Sciences Exacte



Mémoire de fin d'étude

Présentée pour l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE

En : CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique Analytique

Par : M^{me} Laouar Iman

Thème

**Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas des
inhibiteurs de l'acétylcholinestérase**

Directeur de mémoire : M^{me} S. BOUCHAGRA, MAA, Université d'EL-Oued

Devant un jury:

R. AHMEDI	M.C.B	Université d'EL-Oued	Président
B. SOUYEI	MAA	Université d'EL-Oued	Examinatrice
S. ZOUARI AHMED	MAA	Université d'EL-Oued	Examineur

Année Universitaire : 2014-2015

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier ALLAH, nos créateurs pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

Au terme de ce travail nous te nous à remercier en premier lieu

Dr : **BOUCHAGRA SAMEH**, pour son aide précieuse, pour ses remarques pertinentes et surtout pour le temps qu'elle nous a accordée et ceci malgré ses nombreuses charges.

Et mes frères : Laouar Bachir et Laouar Oussama pour ses remarques pertinentes.

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

Nous remercier également tous les enseignants du département Génie électrique pour leur contribution à cette formation.

Merci à tous ceux qui nous ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de mémoire.

Résumé :

La maladie d'Alzheimer est une affection dégénérative du cerveau qui associe des troubles prédominants de la mémoire, des troubles cognitifs et/ou du comportement ayant un retentissement sur la vie quotidienne des patients.

Dans notre travail, nous sommes focalisés sur le traitement d'Alzheimer basé sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Une enzyme sert à la régulation de la transmission de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine.

En faisant appel aux méthodes de modélisation moléculaire plus particulièrement le docking par le programme Molegro Virtuel Docker, nous avons évalué l'activité inhibitrice de trois inhibiteurs décrits par la littérature comme inhibiteurs potentiels de l'acétylcholinestérase. Il s'agit de : la Tacrine, la Galanthamine, le Donepezil. La Galanthamine présentant l'IC₅₀ le plus bas ($IC_{50} = 0,007\mu M$) a donné par simulation avec MVD la meilleure affinité d'interaction. Les interactions qui gouvernent la stabilité des différents complexes sont de type hydrophobiques et liaisons hydrogènes.

Ensuite nous allons étudier le mécanisme d'inhibition mis en place par le Linalol : un inhibiteur naturel appartenant à la classe des monoterpènes. Dans la mesure où aucune étude préalable de modélisation par docking moléculaire de ce composé n'a été réalisée.

Dans une dernière partie, en nous appuyant sur les résultats précédents, nous avons tenté de modéliser de nouveaux inhibiteurs, dérivé de Linalol, pouvant inhiber plus fortement l'acétylcholinestérase.

L'approche in silico par MVD s'avère donc une méthode fiable pouvant contribuer de manière efficace au développement de nouveaux inhibiteurs d'une enzyme donnée.

Mots clés : Molegro Virtuel Docker ; Docking moléculaire; Inhibiteur Acétylcholinestérase; Interaction hydrophobique ; Liaison hydrogène ;

Abstract

Alzheimer disease is a degenerative affection of the brain which associates prevalent disorders of the memory, cognitive disorders and/or behavior having a repercussion on patients everyday life.

In our work, we focused ourselves on the treatment of Alzheimer based on the inhibition of the acétylcholinestérase. An enzyme is used for the regulation of the transmission of the nerve impulse by ensuring the fast hydrolysis of acetylcholine.

By calling upon the methods of molecular modeling more particularly the docking by Virtual the Molegro program Docker, we evaluated the inhibiting activity of three inhibitors described w' literature as potential inhibitors of the acétylcholinestérase. It is about: Tacrine, Galanthamine, Donepezil. Galanthamine presenting the IC₅₀ low (IC₅₀ = 0,007 μ M) gave by simulation using MVD the best affinity of interaction.

All complexes were governed by hydrophobic interactions and hydrogen bonds.

Then we will study the mechanism of inhibition set up by Linalol: a natural inhibitor pertaining to the class of monoterpenes. Insofar as no preliminary study of molecular modeling by docking of this compound were carried out.

In the last part, by supporting us on the preceding results, we tried to model new inhibitors, derived from Linalol, being able more strongly to inhibit the acétylcholinestérase.

The approach in silico by MVD thus proves a reliable method being able to contribute efficiently to the development of new inhibitors of a given enzyme.

Keywords: Virtual Molegro Docker; Molecular Docking; Acetylcholinesterase; inhibitor; Hydrophobic interaction; Hydrogen bond;

الملخص :

مرض الزهايمر هو عبارة عن انتكاس في الدماغ وهو مرتبط مع اضطرابات سائدة في الذاكرة ، اضطرابات معرفية أو سلوكية ولها تأثير على الحياة اليومية للمريض. في بحثنا هذا سلطنا الضوء على علاج مرض الزهايمر الذي يعتمد على تثبيط الأسيتيل كولين استراز . يستخدم هذا الإنزيم في تنظيم انتقال السيالة العصبية من خلال التحلل السريع للأسيتيل كولين.

باستخدام طريقة (docking) بواسطة برنامج 'Molegro Virtuel Docke' , قمنا بتقييم نشاط التثبيط لثلاث مثبطات مشهورة، وهي : Tacrine ، Galantamine ، Donepezil . يعتبر "Donepezil" المثبط الأكثر فاعلية ($IC_{50} = 0,007\mu M$) مما يتوافق مع طاقة الربط المحسوبة باستعمال البرنامج. اغلب الروابط التي تعمل علي استقرار هذه المثبطات ذات طبيعة هيدروفوبية (hydrophobiques) وروابط هيدروجينية. بعد ذلك قمنا بدراسة آلية التثبيط لمركب 'Linalol' هو عبارة عن مثبط طبيعي من فئة "monoterpène" حيث انه لا توجد اي دراسة سابقة لهذا المركب باستعمال "Docking". في المرحلة الأخيرة وبالإستعانة بالنتائج السابقة حاولنا إيجاد مثبطات جديدة مشتقة من Linalol و اكثر فعالية منه. طريقة "Docking" تعتبر من أفضل التقنيات المستعملة حالياً لتطوير و عرض مثبطات أكثر فعالية لإنزيم معين.

الكلمات المفتاحية : Molegro Virtuel Docker ; Docking ; مثبط الأسيتيل كولين استراز ; روابط هيدروفوبية (hydrophobiques) ; وروابط هيدروجينية

Liste des Symboles

Symboles	Nomenclature
E	Enzyme
S	substrat
ES	complexe
P	produit
k_1	les constantes de vitesse des réactions.
k_2	
k_3	
k_4	
K_m	la constante de MICHAELIS et s'exprime en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.
V_M	La vitesse de la réaction est maximale
Ser	Serine
Glu	Glutamine
His	Histidine
Gly	Glycine
Ala	Alanine
Trp	Tryptophane
Phe	Phénylalanine
Cys	Cystéine
Leu	Leucine
Ile	Isoleucine
Tyr	Tyrosine
Met	Methionine
I	Inhibiteur
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
MVD	Molegro Virtuel Docker
RMSD	root mean square deviation
nRotB	le nombre de liaisons rotatives
E_{inter}	Energie d'interaction protéine-ligand.
E_{intra}	Energie interne de ligand

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure (I.1)	Structure tertiaire d'une protéine.	20
Figure (I.2)	Complémentarité stérique.	21
Figure (I.3)	Ajustement induite	22
Figure (I.4)	Inhibition compétitive	27
Figure (I.5)	Inhibition incompétitive.	28
Figure (II.6)	Structure tridimensionnelle de la l'acétylcholinestérase.	33
Figure (II.7)	Vue détaillée du site actif de l' AChE.	34
Figure (II.8)	Structures chimiques de la Tacrine	39
Figure (II.9)	Structure chimique de la Donépézil	40
Figure (II.10)	Structure chimique de la Galanthamine	40
Figure (II.11)	Structure chimique du Huperzine	41
Figure (II.12)	Structure chimique de la Rivastigmine	41
Figure (II.13)	Unités d'isoprène	42
Figure (II.14)	Structures des Monoterpènes connus.	42
Figure(III.15)	Représentation schématique du cycle évolutif d'un algorithme évolutif	53
Figure (IV.16)	Cavités détectées dans le récepteur 1ACJ.	59
Figure (IV.17)	Structure 3D du ligand (EBW) : les liaisons rotatives sont représentées en vert.	63
Figure (IV.18)	Structure 3D de ligand (MF2) : les liaisons rotatives sont représentées en vert.	64
Figure (IV.19)	Structure 3D du ligand (DME) : les liaisons rotatives sont représentées en vert.	64
Figure (IV.20)	Superposition des géométries de l'inhibiteur Tacrine donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec MVD (coloré en vert).	65
Figure (IV.21)	Superposition des géométries de l'inhibiteur Galanthamine donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec MVD (coloré en vert).	65
Figure (IV.22)	Comparaison de la conformation expérimentale de l'inhibiteur Donepezil (colorée par type d'atome) et sa	66

	conformation optimale simulée par MVD (colorée en vert).	
Figure (IV.23)	Superposition spatiale entre la pose du ligand CPO calculée par MVD (coloré en vert) et la conformation dans le complexe expérimentale 1U65 (coloré par type d'atome).	66
Figure (IV.24)	Superposition des géométries de ligand HUP donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec MVD (coloré en vert).	67
Figure (IV.25)	Superposition du modèle du ligand ACH simulé par MVD (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation déterminée expérimentalement (coloré par type d'atome).	67
Figure (IV.26)	Superposition des géométries de ligand EDR donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec MVD (coloré en vert).	68
Figure (IV.27)	Structure 2D de la Tacrine	69
Figure (IV.28)	Positionnement du ligand THA (coloré par type d'atomes) au sein de la cavité 1 (coloré en vert)	70
Figure (IV.29)	Représentation des interactions Tacrine-AChE	70
Figure (IV.30)	Structure chimique de la Galanthamine	71
Figure (IV.31)	Positionnement du ligand (GNT) (coloré par type d'atomes) au sein de la cavité 1 (coloré en vert)	72
Figure (IV.32)	Représentation des interactions Galanthamine –AChE les liaisons hydrogène présentées par un trait bleu discontinu.	72
Figure (IV.33)	Structure chimique de la Donépézil	73
Figure (IV.34)	Positionnement du ligand (E20) (coloré par type d'atomes) au sein de la cavité1 (coloré en vert).	73
Figure (IV.35)	Représentation des interactions Donepezil–AChE : les liaisons hydrogène présentées par un trait bleu discontinu .	74
Figure (IV.36)	Structure 2D de linalol.	75
Figure (IV.37)	Similarité de la taille du linalol (coloré en rouge) à celle de la Tacrine (coloré en vert).	76
Figure (IV.38)	Positionnement du linalol (coloré par type d'atomes) au sein du site actif.	76
Figure (IV.39)	Représentation des interactions linalol–AChE : les liaisons hydrogène présentées par un trait bleu discontinu.	77
Figure (IV.40)	Structures développées des dérivés de linalol.	82

Figure (IV.41)	Positionnement du Neohancoside A (coloré par type d'atomes) au sein du site actif.	83
Figure (IV.42)	Représentation des interactions Neohancoside A –AChE : les liaisons hydrogène présentées par un trait bleu discontinue.	84

Liste des Schéma

N°	Titre	Page
Schéma (I.1)	L'énergie d'activation d'une réaction chimique	19
Schéma (I.2)	Représentation de Michaelis	25
Schéma (I.3)	Représentation de Lineweaver et Burk.	26
Schéma (II.4)	Hydrolyse de l'acétylcholine	32
Schéma (II.5)	Mécanisme général d'hydrolyse par une sérine hydrolase.	35
Schéma (II.6)	Mécanisme d'action d'un organophosphate sur l'activité de l'AChE .	39

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau (I.1)	Les six classes des enzymes	22
Tableau (IV.2)	Résolution des structures étudiées.	58
Tableau (IV.3)	Valeurs de RMSD des dix complexes de l'AChE étudiés.	62
Tableau (IV.4)	Valeurs du nRotB des dix ligands étudiés.	62
Tableau (IV.5)	Energie d'interaction des dix complexes AChE-linalol étudiés.	75
Tableau (IV.6)	Résultats des interactions de dérivés de linalol.	78

Tables des matières

REMERCEMENTS
RESUME
LISTE DES Symboles
LISTE DES FIGURES
LISTE DES SCHÉMA
LISTE DES TABLEAUX
TABLES DES MATIERES
INTRODUCTION GENERALE

PARTIE I

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES ENZYMES

Introduction	19
1. Catalyse enzymatique	19
2. Structure des enzymes et fonction	20
3. Classification des enzymes	22
4. Cinétique enzymatique	23
4.1. Modèle de Michaëlis-Menten	23
4.1.1. Équation de MICHAELIS-MENTEN	23
4.1.2. La constante de MICHAELIS	24
4.2. Représentation de LINEWEAVER-BURK	25
5. Inhibition enzymatique	26
5.1. Inhibiteur compétitif	26
5.2. Inhibiteur incompétitif	27
5.3. Inhibiteur non compétitif	28
5.4. Inhibition irréversible, inhibition « suicide »	29
Conclusion	30

CHAPITRE II : L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE ET CES INHIBITEURS

Introduction	32
1. Structure de l'acétylcholinestérase	32
2. Le site actif et la triade catalytique	33
3. Mécanisme catalytique	34
4. Implication de l'AChE dans la maladie d'Alzheimer	36
5. La maladie d'Alzheimer	36

5 .1. Les facteurs conduisant à la maladie d'Alzheimer	36
5.2. Les symptômes de la maladie d'Alzheimer	36
5.3. Traitement de la maladie d'Alzheimer	37
6. Les Inhibiteurs de L'acétylcholinestérase	38
6.1. Inhibiteurs irréversibles	38
6.2. Les inhibiteurs réversibles	39
6.2.1. Tacrine (Cognex)	39
6.2.2. Donépézil (Aricept)	39
6.2.3. Galanthamine (Reminyl)	40
6.2 .4. Huperzine	40
6.2.5. Rivastigmine	41
6 .2.6. Les monoterpènes	41
Conclusion	44

CHAPITRE III : Docking moléculaire

Introduction	46
1. Présentation de la méthode du docking moléculaire	46
1.1. Principes	46
1.1.1. L'approche combinatoire	46
1.1.2. L'approche stochastique	47
1.1.3 L'approche déterministe	47
1.2. Obtention des structures	48
1.3. Applications	48
1.4. Le processus de scoring	48
1.4.1. Principe	48
1.4.2. Familles de fonctions de scoring	49
a- Les fonctions de scoring empiriques	49
b- Les fonctions de type knowledge-based	50
1.4.3. Description des fonctions de scoring	50
a- La fonction de scoring DOCK	50
b- La fonction de scoring GOLD	50
c- La fonction de scoring FlexX	51
d- La fonction de scoring Chemscore	51
e – La fonction MolDock Score	51
1. 5. Interaction protéine-ligand	52
1.6. Logiciels utilisés	52

PARTIE II**CHAPITRE IV : I .MATERIELS ET METHODE****II. RESULTAT ET DISCUSSION**

I .MATERIELS ET METHODE	58
1. Préparation du récepteur	58
2. Préparation du ligand	59
3. Détection des cavités	59
4. Docking	59
5. Analyse des résultats	59
II. RESULTAT ET DISCUSSION	61
1. Tests de fiabilité du programme de docking	61
1.1. L'écart quadratique moyen (RMSD)	61
1.2. La superposition des ligands	64
2. Etude des interactions Tacrine-AChE	68
3. Etude des interactions Galanthamine –AChE	71
4 . Etude des interactions Donepezil-AChE	73
5. Etude des interactions Linalol-AChE	74
5.1. Le choix de récepteur	74
5.2. L'Analyse visuel des interactions	76
6. Proposition de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	78
Conclusion et perspectives	86
Référence introduction	89
Référence partie I	89
Référence partie II	93

Introduction générale

Introduction générale

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

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

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en oeuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales mentionnées ci-dessus. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont des petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée. Ce travail de thèse se termine d'ailleurs par des applications du docking dans la conception de nouvelles molécules actives.¹

C'est dans ce contexte général que s'inscrit notre travail. Il concerne l'étude des interactions entre l'acétylcholinestérase et divers ligands, pour but de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette enzyme afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs en faisant appel aux approches *in silico* de modélisation des interactions enzyme-inhibiteur par docking moléculaire.

Le choix de cette enzyme est dicté par son rôle dans la régulation de la transmission de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques.²

Le déficit en Acétylcholine chez les malades d'Alzheimer est aggravé par l'action de l'Acétylcholinestérase (AChE), qui décompose rapidement l'Acétylcholine. Les traitements liés à la Galanthamine, la Tacrine, le Donepezil, ont pour but d'inhiber l'AChE pendant un temps suffisamment long pour que le taux d'Acétylcholine puisse se relever.

Dans notre travail de recherche, nous avons en premier temps tester la performance du programme de docking moléculaire Molegro Virtuel Docker utilisé dans cette étude.

Dans un deuxième temps, nous avons pu élucider les mécanismes d'interaction entre l'acétylcholinestérase et des inhibiteurs connus (Tacrine, Galanthamine, Donepezil), ces derniers, sont actuellement les seuls médicaments disponibles dans le traitement symptomatique des formes légères à modérées la maladie d'Alzheimer.

Ensuite nous allons étudier le mécanisme d'inhibition mis en place par le Linalol : un inhibiteur naturel appartenant à la classe des monoterpènes. Dans la mesure où aucune étude préalable de modélisation par docking moléculaire de ce composé n'a été réalisée.

Dans une dernière partie, en nous appuyant sur les résultats précédents, nous essayons de contribuer, à la développement de nouveaux inhibiteurs, dérivé de Linalol, en faisant appel aux approches *in silico* de modélisation des interactions enzyme-inhibiteur par docking moléculaire. nous avons concentré notre étude sur les composés à base de monoterpènes, qui sont des produits naturels. Ce choix est justifié par le succès marqué par ces produits naturels comme drogues.

Dans une première partie, nous consacrerons un premier chapitre à une étude bibliographique sur l'enzyme. Ensuite, nous présenterons la structure tridimensionnelle de l'acétylcholinestérase ainsi ces inhibiteurs connus. Cette partie est terminée par une présentation du divers aspect du Docking moléculaire.

La deuxième partie. sera consacrée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus ainsi qu'à la description des différentes méthodes menées au cours de ce travail.

La présentation générale de notre travail sera la suivante :

Chapitre 1. Généralités sur les enzymes.

Chapitre 2. L'acétylcholinestérase et ces inhibiteurs.

Chapitre 3. Le docking moléculaire.

Chapitre 4 : I. Matériels et méthode ; II. Résultats et discussion

Conclusion générale.

PARTIE I

Chapitre I

Généralités sur les enzymes

Introduction

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires^{1,2,3}.

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées⁴; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée⁵.

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner Les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés⁶.

1. Catalyse enzymatique⁷

Les enzymes ont la capacité d'abaisser l'énergie d'activation pour des réactions spécifiques, cette énergie est une barrière essentielle puisqu'elle prévient la dégradation spontanée des macromolécules cellulaire riche en énergie.

Dans une réaction chimique les enzymes permettent d'atteindre très rapidement l'état d'équilibre, donc la réaction se retrouve accélérée par rapport à la réaction non catalysée (schéma I.1).

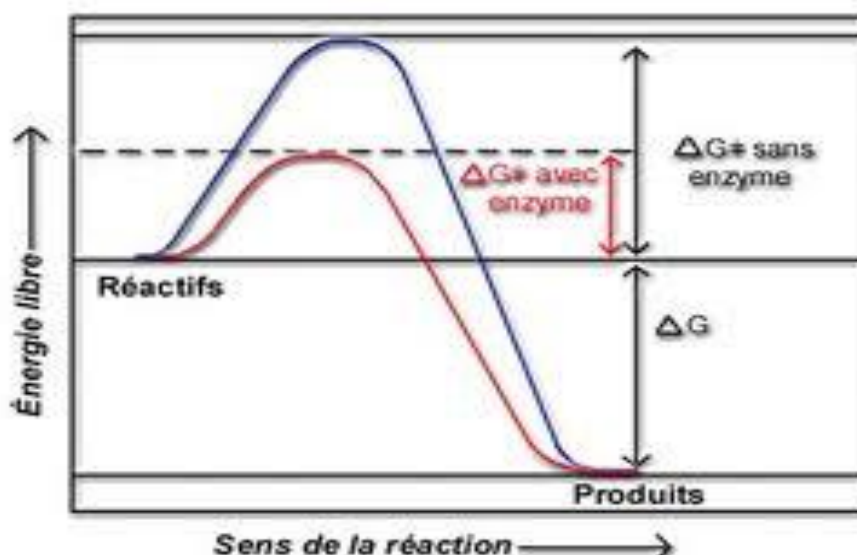


Schéma (I.1) : L'énergie d'activation d'une enzymatique

2. Structure des enzymes et fonction :

Comme toute protéine l'enzyme est constituée d'enchaînement d'acides aminés, qui sont reliés les uns aux autres par des liaisons peptidiques qui se forment entre le groupement carboxylique du premier acide aminé et le groupement aminé suivant.



Cette chaîne d'acides aminés détermine la structure primaire de l'enzyme. La structure secondaire des protéines est classiquement définie par le repliement de la chaîne polypeptide en hélice α ou en feuillet β .

La structure tertiaire est due à la formation de différentes liaisons et interactions, dont les ponts disulfures, les liaisons hydrogène, liaisons ioniques et les interactions hydrophobes⁸ (Figure I.1).

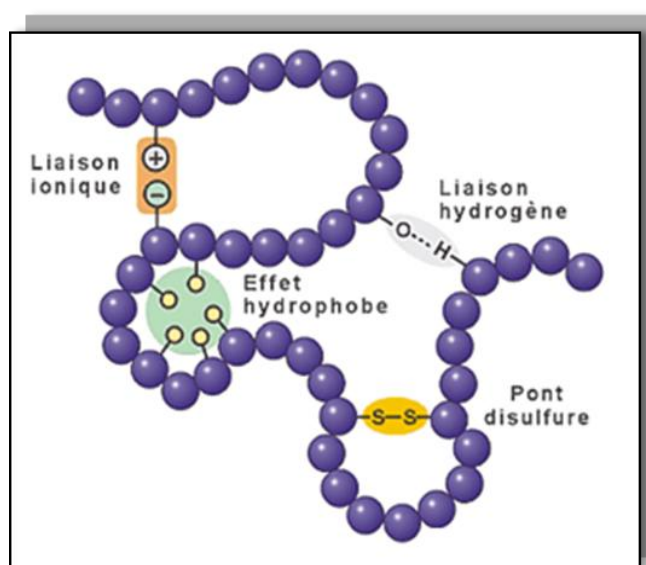


Figure (I.1) : Structure tertiaire d'une protéine.

Beaucoup de protéines sont constituées par l'association de sous-unités ayant déjà une structure tertiaire stable. L'arrangement spatial de ces sous-unités est ce qu'on appelle la structure quaternaire d'une protéine.

Le principal élément de stabilisation des structures quaternaires est l'interaction hydrophobe entre les acides aminés non polaires : les parties hydrophobes des monomères s'agglutinent de manière à minimiser leur surface exposée au solvant (attraction hydrophobe). Des forces électrostatiques peuvent aussi stabiliser la structure ainsi que des liaisons hydrogène. On peut

observer dans des rares cas des ponts disulfures reliant entre elles deux sous-unités, comme c'est le cas de l'insuline⁹.

❖ **Notion de site actif :**

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif. Schématiquement, il a la forme d'une cavité ou d'un sillon dans lequel vont se fixer les substrats grâce à plusieurs liaisons chimiques. Une fois fixes, les substrats vont réagir et se transformer en produit.

Le site actif est subdivisé en deux parties : le site de liaison (qui reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique à l'enzyme) et le site catalytique (qui est responsable de la fixation de l'enzyme sur le substrat).

La spécificité des enzymes peut être expliquée par les deux modèles suivants:

- Modèle clé-serrure : la forme du site actif est complémentaire à celle du substrat

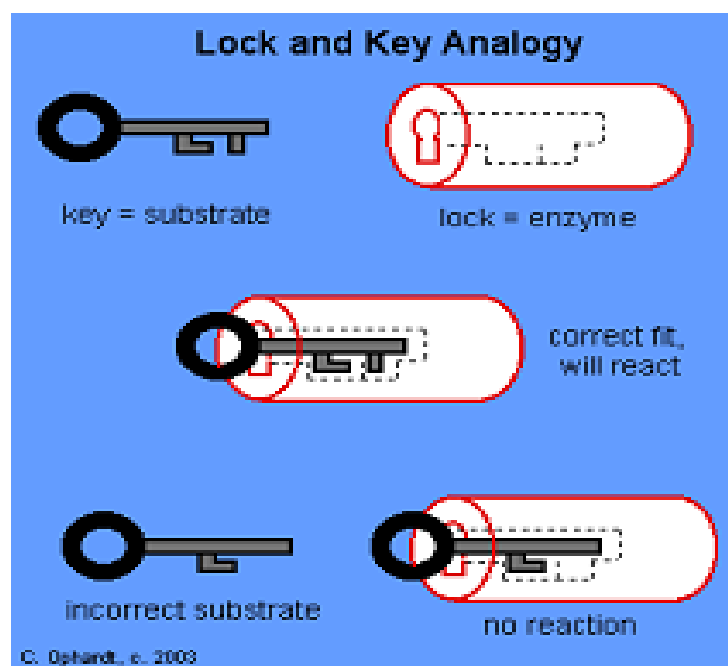


Figure (I.2) : Complémentarité stérique.

- Modèle forme induite : l'enzyme modifie sa conformation pour s'adapter à celle du substrat :

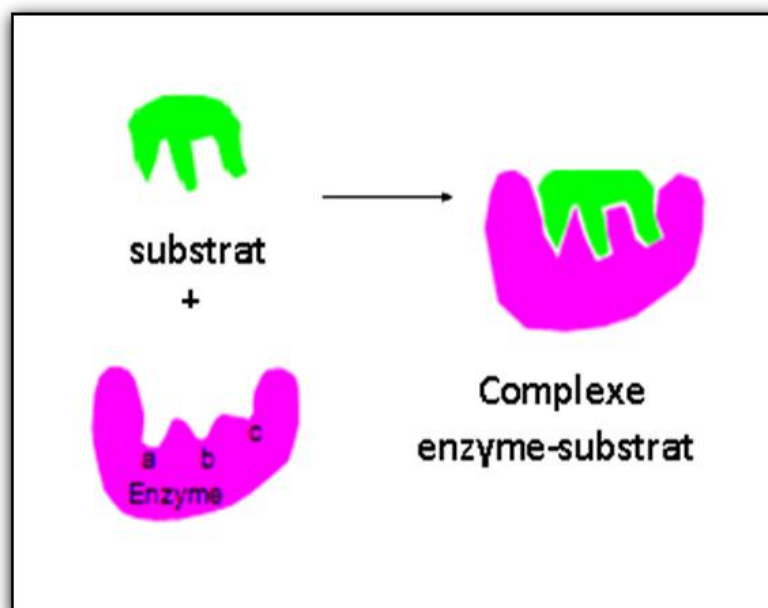


Figure (I.3) : Ajustement induite.

3. Classification des enzymes :

Selon la commission de l'Union Internationale de Biochimie¹⁰, les enzymes se répartissent en six classes (Tableau I.1). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases^{11,12}.

Tableau (I.1) : Les six classes des enzymes.

Classes	Réactions catalytiques
Qxydoréductases (EC 1)	Réactions de transfert d'électrons (ou d' atome d' hydrogène)
Transférases (EC 2)	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases (EC 3)	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases (EC 4)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérases (EC 5)	Réactions d'isomérisation (réaction ou un composé est transformé en un de ses isomères)
Ligases (EC 6)	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP

4. Cinétique enzymatique ⁹ :

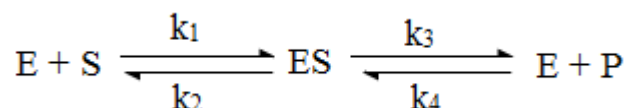
La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques, catalysées par les enzymes, en étudiant leur vitesse c'est-à-dire leur évolution en fonction du temps.

4.1. Modèle de Michaëlis-Menten :

L'équation de MICHAELIS-MENTEN (ou de MICHAELIS-MENTEN-HENRI) permet de décrire la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme agissant sur un substrat unique pour donner un produit. Elle relie la vitesse de la réaction à la concentration de substrat et à des paramètres constants, caractéristiques de l'enzyme. Elle est adaptée à de nombreuses enzymes, mais ne permet cependant pas de rendre compte de comportements complexes, comme la multiplicité des substrats ou l'existence de plusieurs sites actifs présentant des comportements coopératifs ou anticoopératifs (allostérie).

4.1.1. Équation de MICHAELIS-MENTEN :

Le modèle de base de la cinétique enzymatique est présenté sous la forme suivante:

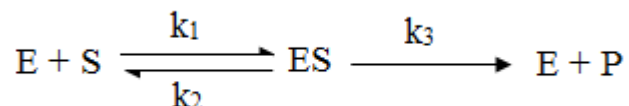


Avec k_1 , k_2 , k_3 , k_4 les constantes de vitesse des réactions. L'analyse de MICHAELIS-MENTEN se fait en considérant ces réactions comme des réactions d'ordre 1 et sous deux hypothèses simplificatrices:

Hypothèse de la vitesse initiale : on se place dans des conditions initiales où il n'y a pas de produit P dans le test enzymatique. On analyse la vitesse initiale de la réaction, avant que le produit ait le temps de s'accumuler. La catalyse est alors très déplacée dans le sens de la synthèse des produits, la réaction inverse dont la vitesse est $k_4[E][P]$ est alors pratiquement inexistante, puisque $[P] \simeq 0$.

Hypothèse de l'état stationnaire : on suppose que le premier équilibre dans l'équation ci-dessus, dépendant des constantes cinétiques k_1 et k_2 est très rapide devant l'étape de catalyse proprement dite, déterminée par k_3 , qui est en général limitant. Ceci revient à dire qu'à tout instant on a $d[ES]/dt = 0$.

Le système se simplifie alors de la manière suivante :



- la vitesse de formation du complexe [ES] est $V = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$;
- la vitesse d'élimination du complexe [ES] est $V = (k_2 + k_3) \cdot [ES]$;
- pendant la phase stationnaire, la concentration du complexe enzyme-substrat[ES] est constante.

Donc la vitesse de formation de ce complexe [ES] doit être égale à celle de dissociation :

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_2 + k_3) \cdot [ES]$$

$$\frac{[E] [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

4.1.2. La constante de MICHAELIS

Le rapport des constantes k_1 , k_2 et k_3 est aussi une constante, cette dernière est définie comme la constante de MICHAELIS : K_m .

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

K_m a la dimension d'une concentration et s'exprime en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Comme [ES] est difficile à déterminer expérimentalement, on cherche à s'en affranchir à l'aide d'une autre équation. En appelant [ET] la concentration totale en enzyme, la concentration en enzyme libre est égale à :

$$[E] = [E_T] - [ES]$$

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_m} = \frac{([E_T] - [ES]) [S]}{K_m}$$

$$K_m [ES] = [E_T] [S] - [ES] [S]$$

$$[ES] (K_m + [S]) = [E_T] [S]$$

$$[ES] = \frac{[E_T] [S]}{K_m + [S]}$$

$$V = k_3 [ES] = k_3 \cdot \frac{[E_T] [S]}{K_m + [S]}$$

La vitesse de la réaction est maximale (V_M) lorsque toute l'enzyme est sous forme de complexe enzyme-substrat, c'est-à-dire lorsque la concentration en complexe est égale à la concentration totale en enzyme [E]. On peut écrire :

$$V_M = k_3 [E_T]$$

$$V = \frac{V_M [S]}{K_m + [S]}$$

C'est l'équation de MICHAELIS et MENTEN.

La courbe qui traduit les variations de V en fonction de [S] selon cette équation est une branche d'hyperbole équilatère qui tend vers V_M (Schéma I.2).

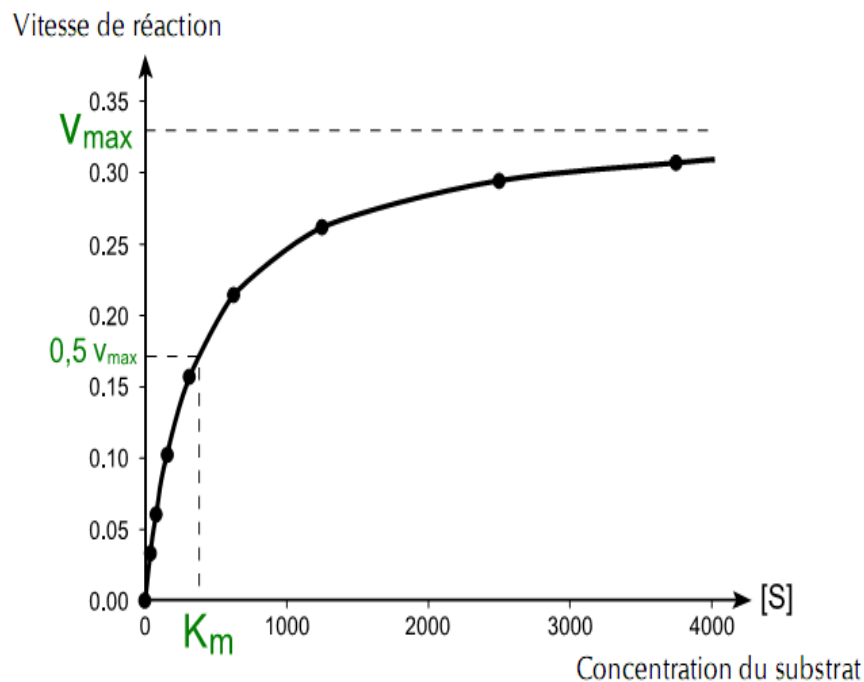


Schéma (I.2): Représentation de Michaelis.

4.2. Représentation de LINEWEAVER-BURK :

Il existe plusieurs possibilités de réarrangement de l'équation de MICHAELIS-MENTEN qui permettent de la transformer en un équation linéaire. La plus connue est la représentation en double inverse selon LINEWEAVER-BURK. En prenant l'inverse des deux côtés de l'équation de MICHAELIS-MENTEN, nous obtenons :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_M} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_M}$$

Qui est du type $y = ax + b$ (équation d'une droite) dans laquelle :

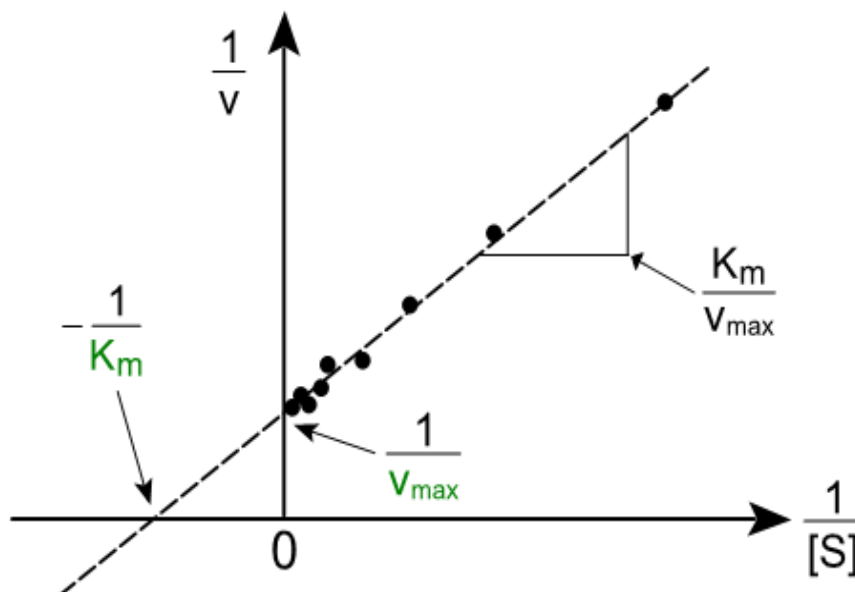


Schéma (I.3): Représentation de Lineweaver et Burk.

5. Inhibition enzymatique⁹:

Un inhibiteur enzymatique est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. Un inhibiteur peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place, ou provoquer une déformation de l'enzyme qui rend celle-ci inactive (inhibiteur allostérique).

L'inhibition des enzymes joue un rôle important dans le contrôle des mécanismes biologiques, et notamment dans la régulation des voies métaboliques. Puisque l'inhibition d'une enzyme peut tuer un pathogène ou corriger un déséquilibre métabolique, des applications existent dans de nombreux autres domaines : beaucoup de médicaments, pesticides ou insecticides sont des inhibiteurs enzymatiques.

5.1. Inhibiteur compétitif :

Un inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le même site enzymatique (effet isostérique). La réaction enzymatique est bloquée, soit parce que l'inhibiteur ne possède pas le groupement chimique transformé par l'enzyme, soit parce que la position de groupement chimique sur l'inhibiteur rend impossible sa reconnaissance par le site actif.

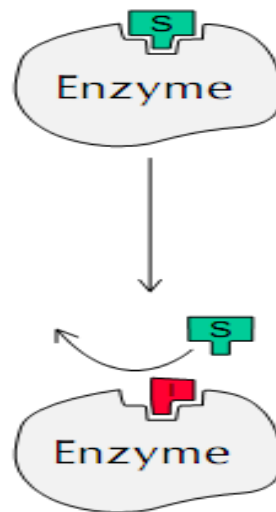
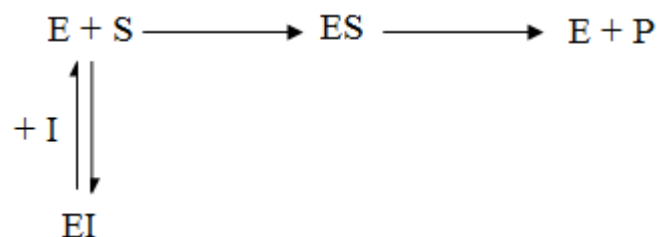


Figure (I.4) : Inhibition compétitive.

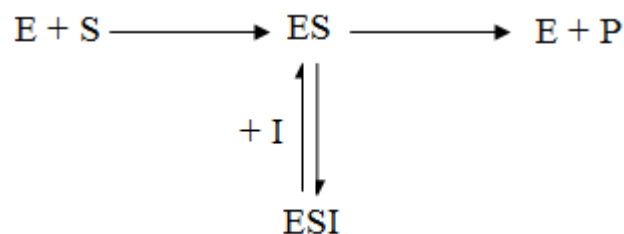
Schéma dans le cas d'une inhibition compétitive :



5.2. Inhibiteur incompétitif :

Un inhibiteur incompétitif ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement à l'enzyme complexée avec le substrat ES et empêche la formation des produits. Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction. Comme son nom l'indique, un inhibiteur incompétitif n'entre pas en compétition avec un substrat sur son site de fixation.

Schéma dans le cas d'une inhibition compétitive :



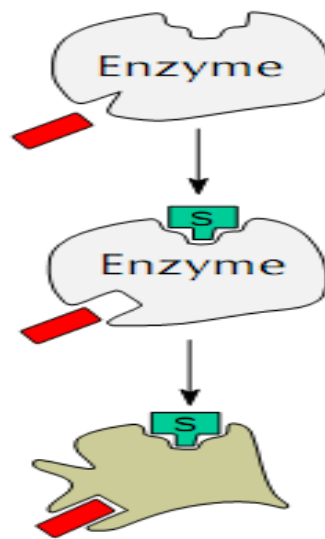
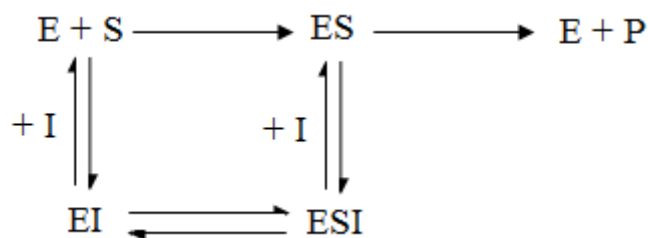


Figure (I.5) : Inhibition incompétitive.

5.3. Inhibiteur non compétitif :

Un inhibiteur non compétitif peut se lier à la fois, et avec une même affinité, sur l'enzyme libre et sur l'enzyme liée au substrat. Cependant, l'inhibiteur et le substrat n'entrent pas en compétition pour se fixer sur un même site : le substrat se lie au site actif, et l'inhibiteur à un autre site de fixation. L'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat.



La fixation d'un inhibiteur non compétitif diminue la vitesse maximale de la réaction, mais ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour le substrat, car ce dernier se lie aussi bien à l'enzyme libre qu'au complexe EI. L'efficacité enzymatique diminue, une partie des enzymes (celles liées à l'inhibiteur) ne plus transformer le substrat en produit. On a donc une apparente diminution de la quantité d'enzymes actives.

Une inhibition non compétitive ne peut pas être levée par une augmentation de la concentration en substrat.

5.4. Inhibition irréversible, inhibition « suicide » :

L'inhibition suicide est un mécanisme où l'inhibiteur forme un complexe stable avec l'enzyme qui l'inactive de façon permanente. L'enzyme reconnaît l'inhibiteur comme son substrat et entame le processus de modification de ce dernier. Intervient alors une étape au cours de laquelle l'inhibiteur modifié devient très réactif et se lie de façon très stable à l'enzyme. L'enzyme contribue ainsi à sa propre inactivation irréversible d'où le nom d'inhibition « suicide ». L'inhibiteur peut se placer sur le site catalytique de l'enzyme ou ailleurs.

Exemples :

- l'aspirine inhibe la cyclooxygénase active qui transforme l'acide arachidonique en une prostaglandine.
- la pénicilline est un inhibiteur suicide de la transpeptidase intervenant dans la synthèse du peptidoglycane, composant de la paroi des bactéries. Son cycle bêta-lactame étant très labile réagit avec le site actif de l'enzyme. Elle se fixe alors de façon thermodynamiquement très stable à l'enzyme au niveau de ce dernier.

Conclusion :

Les enzymes sont donc des protéines qui allient la capacité de reconnaître très spécifiquement des molécules, au pouvoir de catalyser efficacement leur transformation en composées utiles au métabolisme des organismes vivants.

Nous allons présenter dans ce qui suit, L'acétylcholinestérase (AChE) : enzyme exprimée dans le système nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs, et impliquée dans divers problèmes majeurs de santé publique (maladie d'Alzheimer, myasthénie, intoxication aux insecticides).

Chapitre II

L'acétylcholinestérase et ces inhibiteurs

Introduction:

L'acétylcholinestérase (AChE) est une protéine exprimée dans le système nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs. Le principal rôle biologique de l'acétylcholinestérase est la régulation de la transmission de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques¹³ (Schéma II.4).

Acétylcholine, substance chimique présente chez les vertébrés, qui joue un rôle de neuromédiateur permettant la transmission de l'influx nerveux d'un neurone à l'autre en passant par les synapses, et à partir des neurones vers les cellules musculaires, ce qui conduit ces dernières à se contracter. L'effet de l'acétylcholine disparaît lors de l'hydrolyse produite par l'acétylcholinestérase¹⁴.

Les molécules d'Acétylcholine qui participent à la transmission d'un influx nerveux donné doivent être dégradées très rapidement, en quelques millisecondes, afin de restaurer l'excitabilité neuronale et ainsi permettre la transmission de l'influx nerveux suivant¹⁵. Cette fonction essentielle est assurée par l'acétylcholinestérase laquelle, en accord avec sa fonction, est parmi les enzymes les plus rapides de la nature¹⁶. Son turn-over (kcat) est, en moyenne, de 10.000 molécules de substrat hydrolysées par seconde (entre 1000 et 20000 s⁻¹, selon l'espèce considérée).

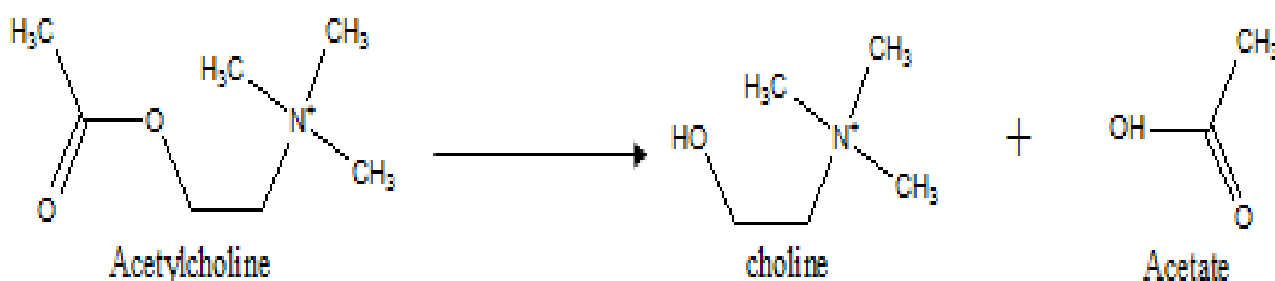


Schéma (II.4) : Hydrolyse de l'acétylcholine.

1. Structure de l'acétylcholinestérase :

La structure publiée en 1991 était celle du dimère entier d'AChE. Chaque monomère est constitué de 11 feuillets β et de 15 hélices α , ainsi que d'une courte portion de feuillet β , à l'extrémité N-terminale, qui n'est engagée dans aucune interaction avec le reste de la structure. Le repliement global de l'enzyme est typiquement celui de la famille des α/β hydrolases¹⁷. Dans le dimère, les deux monomères sont liés, l'un à l'autre, par un «paquet» de 4 hélices α : deux hélices α de chaque monomère, dont l'hélice α C-terminale, participent à la mise en place d'un accollement inter-résidus très stable. Les cystéines C-terminales (Cys537) de chacun des deux

monomères établissent entre elles un pont disulfure inter-chaînes qui stabilisera, covalamment, cette interface de dimérisation.¹³

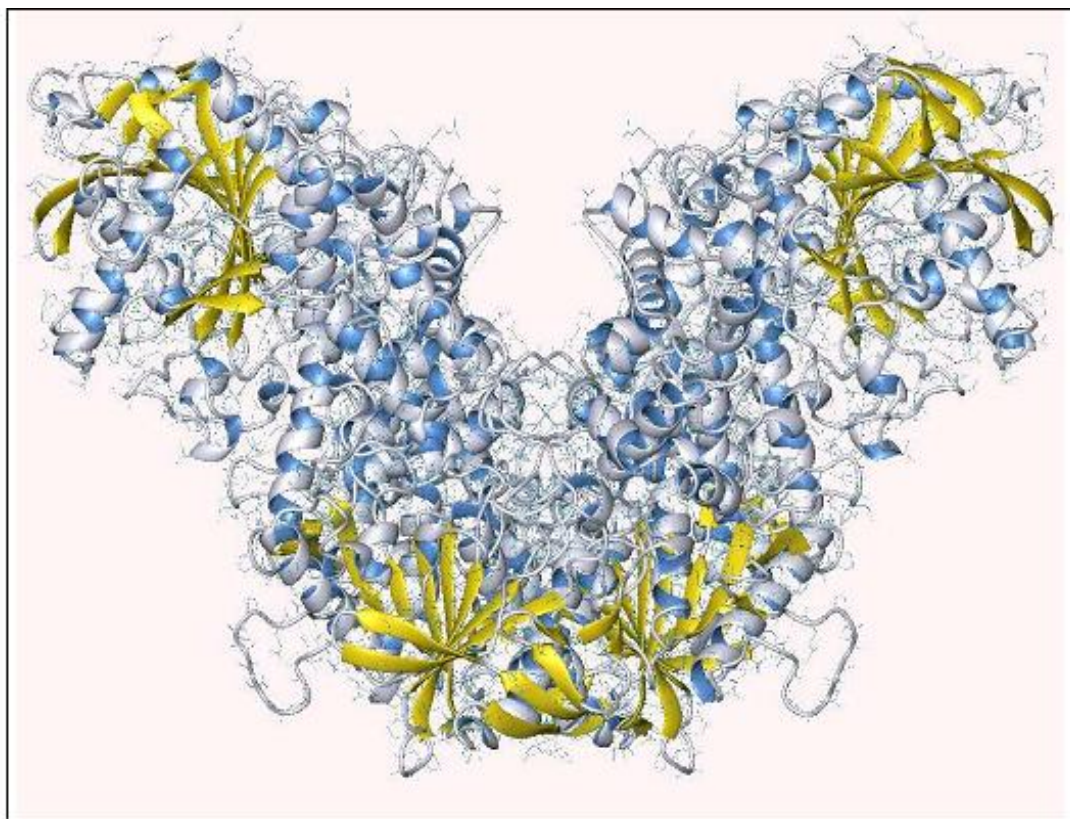


Figure (II.6) : Structure tridimensionnelle de la l'acétylcholinestérase.

2. Le site actif et la triade catalytique :

Le site catalytique de l'AChE est situé au fond d'une gorge profonde et étroite¹⁸. On distingue deux sous-sites : le site anionique et le site estérasique.

Le site estérasique correspond au locus au niveau duquel la portion acétyl de la molécule d'ACh se fixe et forme l'intermédiaire tétraédrique.

La triade catalytique est composée des résidus Ser200, Glu327 et His440 (Figure II.7). C'est au niveau de la sérine catalytique que se fixe la portion carbonyle de la molécule d'ACh. L'His440 se comporte comme un catalyseur acido-basique pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique. Grâce à son noyau imidazole, elle établit deux liaisons hydrogènes avec la Ser200 et le Glu327 qui jouent, dans cette triade catalytique, le rôle de donneur et d'accepteur final de proton, respectivement¹⁵.

L'enzyme devra pouvoir stabiliser l'oxygène du carbonyle de l'ACh, qui se charge négativement lors de la formation de l'intermédiaire tétraédrique. De fait, une poche est présente

dans le site actif de l'enzyme, qu'on nomme le trou « oxyanion », et qui est constituée des résidus Gly118, Gly119 et Ala201 (Figure II.7).¹⁴

Ainsi on trouvera également, dans le sous-site estératique, une petite cavité hydrophobe nommée la « poche acyle », constituée des résidus Trp233, Phe288, Phe290 et Phe331 (Figure II.7). Cette poche joue un rôle essentiel dans la sélectivité de substrat de l'AChE, qui ne pourra hydrolyser efficacement que les esters pouvant loger leur portion aliphatique dans cette poche¹⁴.

Le site anionique est constitué des résidus Trp84, Glu199 et Phe330 (Figure II.7). La charge positive du ligand sera effectivement stabilisée par l'attraction électrostatique du résidu Glu199, mais le sera beaucoup plus effectivement par son interaction avec les électrons π des noyaux aromatiques environnant¹⁹. Les résidus Trp84 et Phe330 seront les deux plus importants contributeurs à cette énergie de stabilisation.

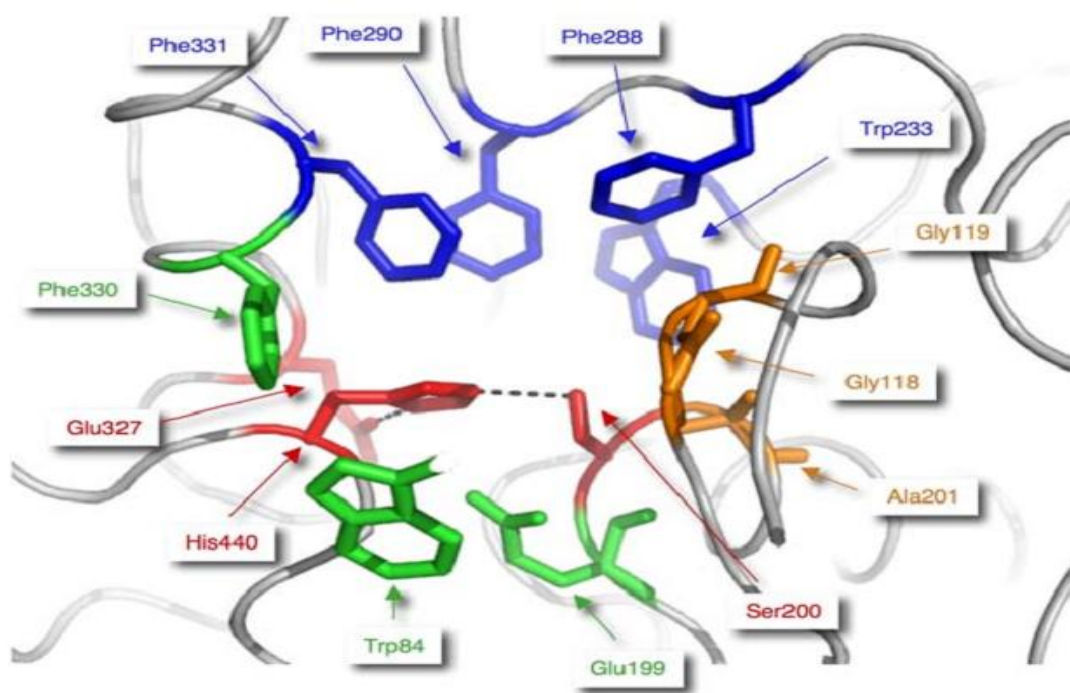


Figure (II.7) : Vue détaillée du site actif de l'AChE.

3. Mécanisme catalytique :

L'AChE (acétylcholine acétyl hydrolase – EC 3.1.1.7) est une carboxylestérase de type B, appartenant à la famille des sérines hydrolases^{20,21}.

Cette famille comprend, entre autres, la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase. Les sérines hydrolases sont considérées comme des enzymes relativement rapides et efficaces, on y trouvera

en effet toujours une poche responsable de la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique, appelée « trou oxyanion », et une autre en charge de la spécificité de substrat, et nommée « poche acyle », dans le cas de l'AChE.

Le mécanisme catalytique des sérines hydrolases (Schéma II.5), conservé, est le suivant :

- Formation du complexe michaëlien .
- Attaque nucléophile de la sérine catalytique sur le substrat.
- Formation du 1^{er} intermédiaire tétraédrique.
- Libération du 1^{er} produit (choline).
- Attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la sérine acylée.
- Formation du 2^{ème} intermédiaire tétraédrique.
- Libération du 2^{ème} produit (acétate).

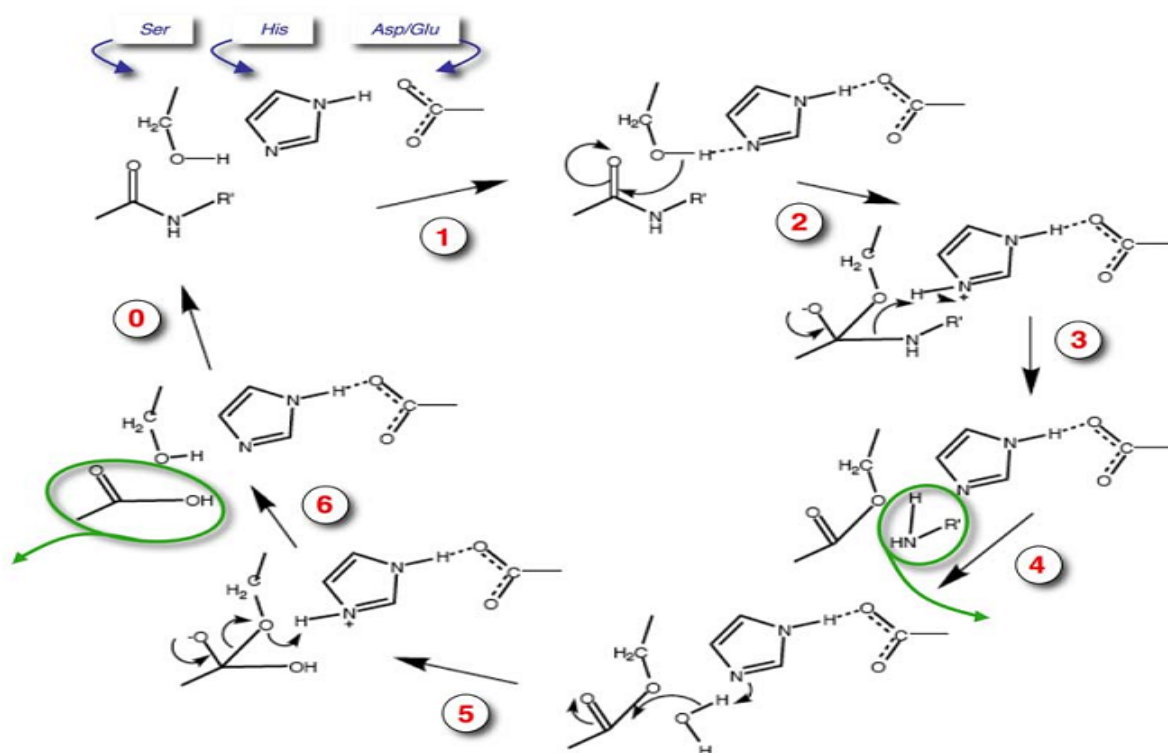


Schéma (II.5) : Mécanisme général d'hydrolyse par une sérine hydrolase.

4. Implication de l'AChE dans la maladie d'Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer se manifeste, entre autres, par la détérioration des cellules nerveuses libérant une substance appelée Acétylcholine, dont le rôle est de transmettre les messages entre les cellules du cerveau. Le déficit en Acétylcholine chez les malades est aggravé par l'action d'une enzyme, l'Acétylcholinestérase (AChE), qui décompose rapidement l'Acétylcholine. Les traitements liés à la RIVASTIGMINE, la TACRINE, le DONEPEZIL, ont pour but d'inhiber l'AChE pendant un temps suffisamment long pour que le taux d'Acétylcholine puisse se relever.

5. La maladie d'Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer est une affection dégénérative du cerveau qui associe des troubles prédominants de la mémoire, des troubles cognitifs et/ou du comportement ayant un retentissement sur la vie quotidienne des patients. Cette démence est associée à deux types de lésions : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires. Si les lésions se développent assez tôt dans la vie, la maladie ne s'exprime habituellement que tardivement, l'âge étant le premier facteur de risque.

5.1. Les facteurs conduisant à la maladie d'Alzheimer :

Près de 15 années de recherche les scientifiques ont identifiés une série de facteurs qui pourraient conduire à la maladie d'Alzheimer²².

Le plus important de ces facteurs:

- Vieillesse: la majorité des patients infectés après l'âge de soixante ans²³.
- Le facteur génétique : repose sur des études épidémiologie révélant l'existence d'antécédents familiaux de la maladie chez 15% des sujets atteints ²⁴.
- Les maladies qui affectent les vaisseaux sanguins dans le cerveau
- Les blessures graves à la tête augmentent les risques d'infection²².

5.2. Les symptômes de la maladie d'Alzheimer :

Bien que les signes et les symptômes de la maladie peuvent varier d'une personne à l'autre, la perte de mémoire croissante avec le passage du temps est souvent les premiers symptômes observés. Voici quelques signes qui apparaissent dans le stade précoce de la maladie²⁵ :

- L'incapacité de trouver des mots ou des difficultés de langue
- Choses oublier - noms, des dates, des lieux et des visages
- Perte d'intérêt à lancer des projets ou faire des choses
- Difficulté à résoudre des problèmes ou de résoudre des puzzles à faire

- Des difficultés à accomplir des tâches de tous les jours
- Incapacité à mettre les choses en place sur une base quotidienne
- Changements d'humeur et de comportement.

5.3. Traitement de la maladie d'Alzheimer :

Actuellement, il n'existe aucun traitement guérissant la maladie d'Alzheimer, ni même permettant d'arrêter son évolution, mais il existe quelques médicaments susceptibles de retarder son évolution. Ils permettent d'atténuer les pertes de mémoires, les problèmes de langage et de raisonnement, ou bien tous simplement de ralentir au moins en apparence la progression de la maladie.

La cause exacte est encore inconnue, mais il est supposé que des facteurs environnementaux et génétiques y contribuent. Les plus grandes méthodes dans le traitement de la maladie d'Alzheimer se focalisent sur deux aspects fondamentaux : traitement au niveau des plaques séniles ou plaque amyloïdes, et traitement de la transmission cholinergique²⁶. Ce sont les deux approches dans le traitement de cette maladie. Dans la première approche, Il s'agit donc de lésions extracellulaires de la maladie d'Alzheimer. Ces plaques correspondent à l'accumulation d'un peptide anormal et neurotoxique de 42 acides aminés, le peptide bêta-amyloïde. Ce peptide, provient d'un mauvais clivage de la protéine APP (Amyloid Protein Precursor). Ceci participerait à l'entrée massive de calcium dans le neurone et activerait la microglie (réaction inflammatoire), ce qui entraîne la mort du neurone par nécrose. Donc il est préalable de prévenir la formation de ce peptide ou au moins diminuer sa génération ou déposition. De ce fait il est demandé de bloquer ou inhiber qui est responsable de la formation des AB peptides²⁷.

La plus grande partie des recherches scientifiques réalisées sur le traitement de la maladie d'Alzheimer (MA) a été guidée par un constat : l'existence d'une relation dans cette maladie, entre le déficit des neurotransmissions cholinergiques et les différents symptômes, en particulier cognitifs. Les recherches en ont donc eu pour but d'augmenter l'activité cholinergique centrale²⁸. ce qui définit la deuxième approche dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Les plus étudiés, les inhibiteurs des cholinestérases, sont les seuls à avoir obtenu jusqu'à présent une application clinique²⁹.

Le précurseur des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase est la PHYSOSTIGMINE, elle a montré chez des patients une amélioration de la mémoire et des fonctions cognitives³⁰.

Cependant l'intérêt de cette molécule est limité par sa demi-vie très courte ³¹.

En 1986, Summer et al. ³² ont rapporté des résultats intéressants sur la TACRINE, autre inhibiteur de l'acétylcholinestérase qui présentait l'avantage d'une demi-vie de durée supérieure à celle de la PHYSOSTIGMINE. C'est le premier médicament dont l'utilisation a été autorisée dans la MA par la FDA aux USA (en 1993) et par la France (en Mai 1994) ³³.

En novembre 1996, le DONEPEZIL, un inhibiteur sélectif de l'acétylcholinestérase a été autorisé par la FDA et en septembre 1997, il a reçu son AMM en France ³⁴. Le troisième médicament de la classe arrivé sur le marché est la RIVASTIGMINE. Il a reçu son AMM en 1998 en France et dans de nombreux pays européens.

La TACRINE, le DONEPEZIL et la RIVASTIGMINE, tous inhibiteurs des cholinestérases, sont actuellement les seuls médicaments disponibles dans le traitement symptomatique des formes légères à modérées de la maladie d'Alzheimer.

6. les Inhibiteurs de L'acétylcholinestérase :

Les Inhibiteurs de L'acétylcholinestérase sont classés en fonction de leur intensité, et de leur durée d'action en inhibiteurs réversibles irréversibles.

6.1. Inhibiteurs irréversibles :

Les composés organophosphates sont des molécules constituées d'un atome de phosphate sur lequel est attaché différents groupes chimiques, qui déterminent les propriétés exactes du composé. Il existe ainsi une grande variété d'insecticides organophosphorés.

Les organophosphates sont des inhibiteurs irréversibles de l'AChE. Ils créent une lésion biochimique en phosphorylant le site estérasique de l'enzyme, s'opposant à l'hydrolyse de l'acétylcholine.

Par conséquent, Une liaison covalente est formée entre le groupement phosphate et le résidu Ser200 du site actif de l'enzyme.

Dans un deuxième temps, une déalkylation va rendre irréversible cette phosphorylation entraînant le vieillissement de l'enzyme ce qui correspond à une inactivation quasi-définitive. (Schéma II.6).

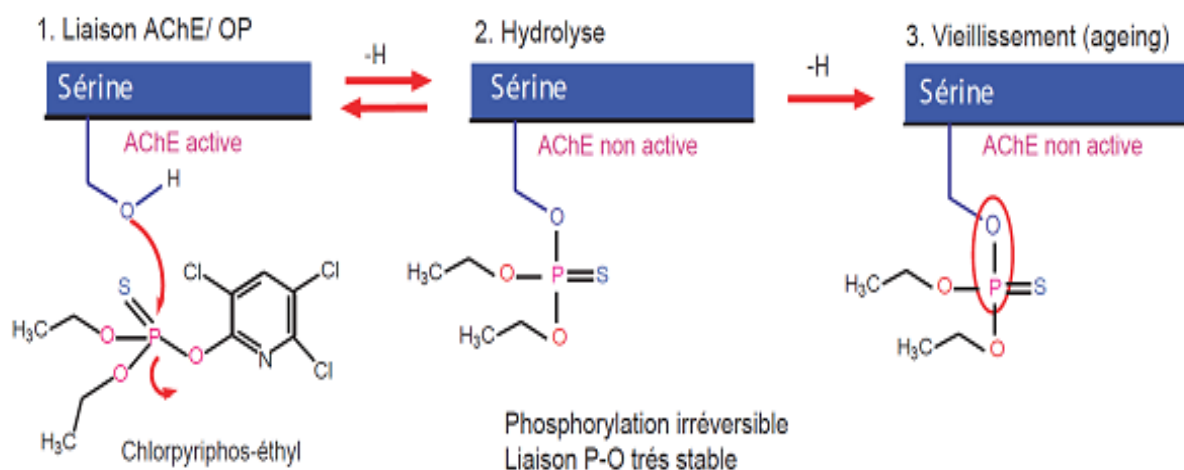


Schéma (II.6) : Mécanisme d'action d'un organophosphate sur l'activité de l'AChE .

6.2. Les inhibiteurs réversibles :

Les inhibiteurs réversibles, qui inhibe l'enzyme d'une façon transitoire, tant que leur concentration est suffisante sont utilisée en thérapeutique, et pour la plupart d'entre eux connus depuis longtemps.

6.2.1. Tacrine (Cognex) :

Le premier traitement commercialisé, il appartient à la famille des aminoacridines, elle provoque plusieurs effets indésirables de type muscarinique, mais son inconvénient major est sa toxicité hépatique.

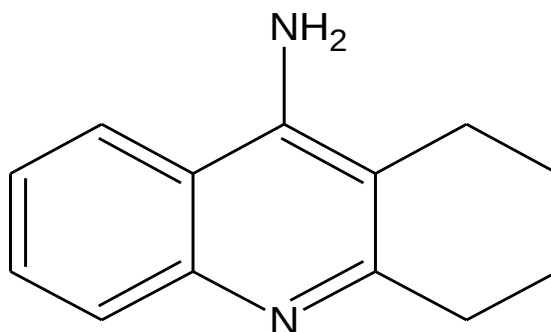


Figure (II.8) : Structures chimiques de la Tacrine

6.2.2. Donépézil (Aricept) :

Un inhibiteur sélectif et réversible. Sa demi-vie d'élimination plasmatique est de l'ordre de 70 heures et une seule prise quotidienne suffit.

Les effets indésirables les plus fréquents du Donépézil sont des troubles digestifs. Il peut également être l'origine de vertige et de bradycardie mais il paraît dépourvu de toxicité hépatique, inconvénient major de la Tacrine.

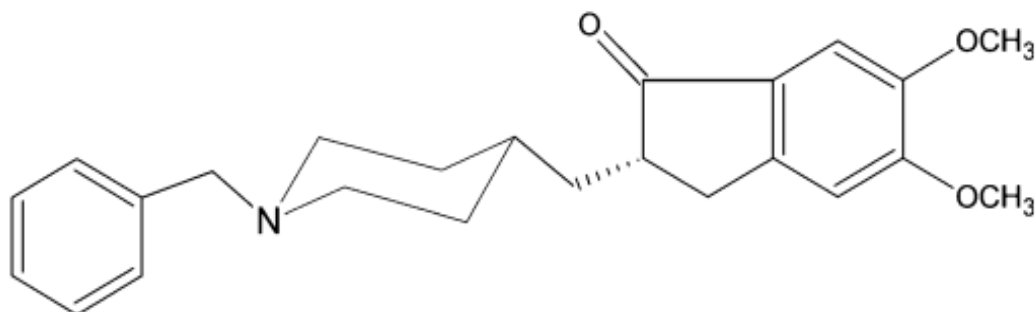


Figure (II.9) : Structure chimique de la Donépézil

6.2.3. Galanthamine (Reminyl) :

Galanthamine (Reminyl) est un alcaloïde avec amine tertiaire, a été approuvé dans plusieurs pays pour le traitement de la maladie d'Alzheimer³⁵. Plusieurs dérivés ont été synthétisés et étudiés et ont montré un potentiel plus fort que celui de la galanthamine³⁶.

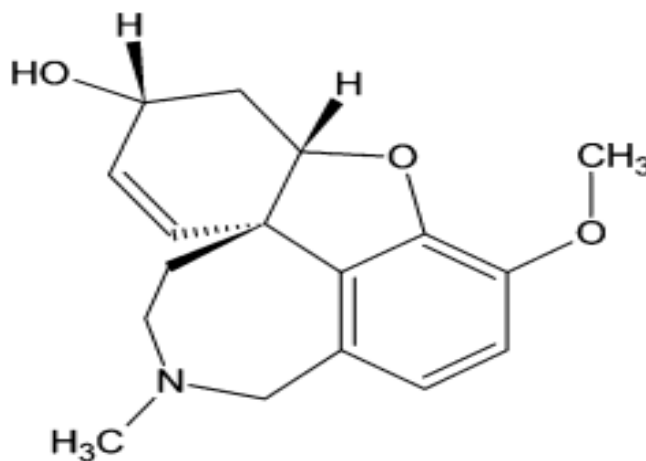


Figure (II.10) : Structure chimique de la Galanthamine

6.2 .4. Huperzine :

Huperzine est un alcaloïde d'origine végétale, connu depuis de nombreuses années, qui inhibe réversiblement le cholinestérase. Il a été mis en vente aux USU comme supplément diététique d'origine végétale destiné à réduire les troubles de mémoire.

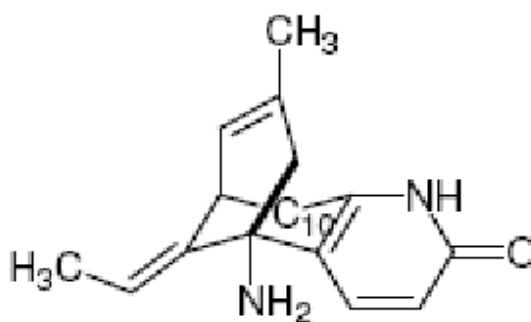


Figure (II.11) : Structure chimique du Huperzine

6.2.5. Rivastigmine :

Rivastigmine est un anticholinestérasique qui possède un groupement carbamate.

L'inhibition de l'acétylcholinestérase par les carbamate est instable et donc rapidement réversible.

La Rivastigmine est utilisée en deux prises quotidiennes dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer, elle paraît dépourvue de toxicité hépatique.

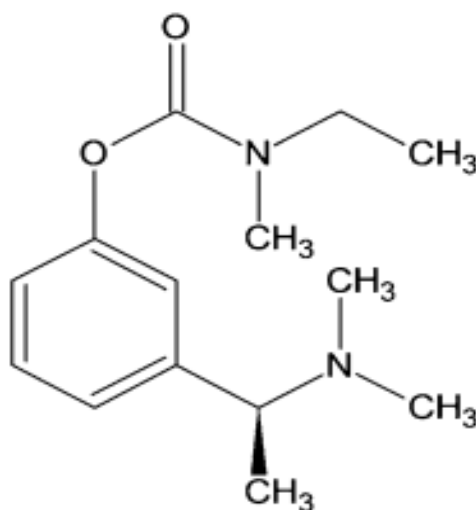
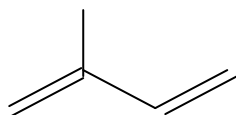


Figure (II.12) : Structure chimique de la Rivastigmine

6.2.6. Les monoterpènes

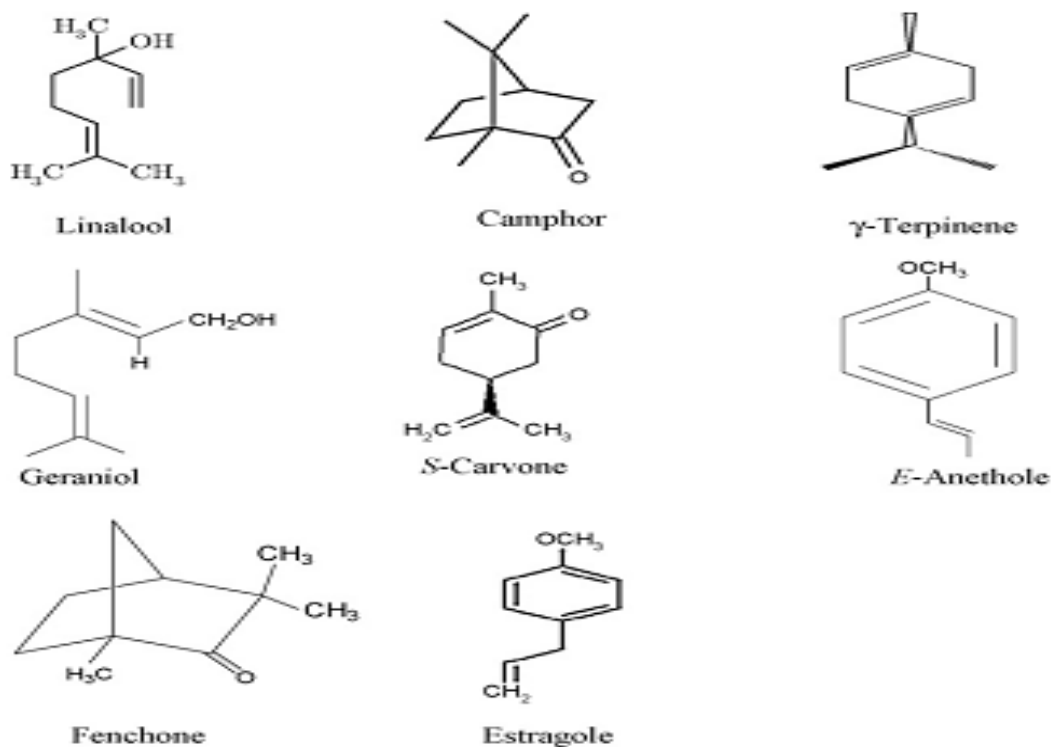
Les terpènes sont des hydrocarbures résultant de la combinaison de plusieurs unités d'isoprène C_5H_8 (figure II.13), et ont pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à dire $(C_5H_8)_n$

**Figure (II.13) :** Unités d'isoprène

Les terpénoïdes peuvent être considérés comme des terpènes modifiés avec des groupes méthyles ajoutés ou enlevés, ou des atomes d'oxygène ajoutés. On utilise le terme «terpène» de façon plus large, en y incluant les terpénoïdes. Tout comme les terpènes, les terpénoïdes peuvent être classés selon leur nombre (n) d'unités isoprène.

Pour $n = 2$: Les monoterpènes.

Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques

**Figure (II.14) :** Structures des Monoterpènes connus.

A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde.

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques du monoterpène, en particulier leur pouvoir antitumoral, Antibactérien, antioxydant

L'activité antioxydante de ces composés est exploitée dans la prévention et la lutte contre des maladies comme Alzheimer, l'artériosclérose, et le cancer.

Des nouveaux travaux montrent l'effet inhibitrice du monoterpène sur l'acétylcholinestérase³⁷, cette approche peut être utilisée dans l'invention de nouveaux médicaments d'origine naturelle, pour le traitement de la maladie d'Alzheimer

Conclusion :

En accord avec son rôle physiologique clé, l'AChE est la cible d'une gamme très large de molécules actives, parmi lesquelles autant de toxines naturelles que de poisons de confection humaine. En industrie pharmaceutique L'inhibition de l'AChE présente une approche bénéfique du traitement de la maladie d'Alzheimer.

Spécialement dans la chimie des médicaments, plusieurs méthodes de recherche utilisant l'ordinateur ont été créées. Ces méthodes ont été développées pour aider les médecins chimistes pour comprendre les interactions, au niveau moléculaire où elle est la base de la plupart des mécanismes biologiques.

Parmi les méthodologies employées, celle de docking moléculaire est de plus en plus utilisée, le chapitre suivant sera consacré à la présentation de cette méthodologie.

Chapitre III

Docking moléculaire

Introduction

Le docking ou amarrage protéine-protéine est un problème de biologie structurale qui, à partir des structures tridimensionnelles (3D) des protéines et de leurs propriétés physico-chimiques, consiste à prédire comment les protéines s'associent entre elles pour former des complexes fonctionnels au niveau de la cellule. La connaissance de la structure des complexes protéine-protéine permet aux chercheurs de mieux comprendre les mécanismes clefs mis en jeu lors d'une interaction entre protéines, ce qui constitue un enjeu scientifique majeur, autant en termes fondamentaux (expliquer une fonction cellulaire) que pour la recherche appliquée (inhiber spécifiquement une fonction cellulaire).

Actuellement, les méthodes employées pour étudier le docking combinent des phases automatiques³⁸, prenant en compte les paramètres topologiques ainsi qu'énergétiques (physico-chimiques) des protéines et des phases de visualisation moléculaire permettant d'évaluer les résultats obtenus⁴¹. La phase automatique est coûteuse en temps de calcul, et fournit un grand nombre de solutions de docking potentielles difficilement discriminables juste sur la base des paramètres évalués. C'est pourquoi une phase d'analyse visuelle manuelle par un expert est nécessaire afin d'obtenir un résultat pertinent. Néanmoins cette analyse est très lourde en terme de quantité d'information qu'il faut prendre en compte simultanément (manipulation d'objet 3D, caractéristiques physico-chimiques, données biologiques, etc.).

1. Présentation de la méthode du docking moléculaire

1.1. Principes

Le plus important problème pour l'étape de Docking est de parcourir le mieux possible l'espace conformationnel. La complexité de ce problème est en fonction du nombre de degrés de liberté, de translation, de rotation en plus des conformations de départ possibles du ligand. Afin d'éviter des calculs que les machines ne peuvent résoudre ou seulement dans des temps bien trop importants, plusieurs approximations sont possibles. Les algorithmes de recherche de la flexibilité du ligand peuvent se classer en trois principes, nommés combinatoire, stochastique, et déterministe³⁸.

1.1.1. L'approche combinatoire

Cette approche est basée sur des grilles de valeurs pour chaque degré de liberté, et chacune de ces grilles est explorée de manière combinatoire au cours de la recherche. En raison de l'effet combinatoire, le nombre d'évaluations augmente bien plus rapidement que le nombre de degrés

de liberté. Pour cela, des critères de fin sont imposés pour éviter à l'algorithme de parcourir des portions de l'espace qui ne mèneraient qu'à de mauvaises solutions.³⁸

Dans un premier temps le ligand est découpé en parties rigides et flexibles. Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs «ancres» rigides sont définies, ensuite une première partie rigide est mise en interaction avec le récepteur puis les parties flexibles sont ajoutées de manière successive avec une exploration des angles de torsion. Le plus important est le choix des fragments de base à placer en premier dans le site car il est très difficile pour les algorithmes de compenser une mauvaise position initiale.³⁸ Les différentes implémentations changent par la manière dont le premier segment rigide est placé dans le site et dans les procédures d'élimination quand le nombre d'angles de rotation augmente. Nous supposons que la position du segment rigide de départ ou ancre fait partie des n positions de plus basse énergie possible. Le nombre n détermine la largeur de l'arbre de recherche. Cette hypothèse peut s'avérer être un biais dans le cas de petits segments 'ancres' car ceux-ci sont susceptibles de s'adapter à de nombreux endroits à la surface du récepteur entraînant la construction de branches sans intérêt. Cette méthode a été incorporée dans plusieurs programmes dont Dock³⁹ et FlexX⁴⁰. Le programme FlexX positionne l'ancre à partir d'une modélisation des interactions chimiques et effectue une sélection automatique des fragments de base^{41,42}. Les fragments sont ajoutés de manière incrémentale. Chaque angle possible est construit et les angles qui produisent des recouvrements avec le récepteur ou des conflits internes sont rejetés. A chaque ajout, le calcul de l'énergie est pratiqué et les molécules partiellement construites sont classées. Cette procédure est répétée jusqu'à la construction complète de la molécule.

1.1.2. L'approche stochastique

L'approche stochastique consiste à effectuer des changements aléatoires dans la structure tridimensionnelle du ligand. Habituellement il s'agit de modifier un degré de liberté à chaque fois. L'un des points faibles de cette méthode est l'incertitude de convergence. Pour l'éviter, il faut multiplier les calculs, indépendamment les uns des autres. Un des principaux algorithmes stochastiques est la méthode de Monte Carlo⁴³.

1.1.3 L'approche déterministe

Dans l'approche déterministe, l'état initial détermine les mouvements à effectuer pour générer l'état suivant. Cet état devant être d'énergie égale ou inférieure à celle de l'état initial. Le problème des systèmes déterministes est qu'ils peuvent facilement rester piégés dans un

minimum local car leurs capacités à surmonter des barrières énergétiques sont faibles. Il s'agit de l'approche la plus simple et la plus directe.

1.2. Obtention des structures

La majorité des structures protéiques sont disponibles via la «Protein Data Bank »⁴⁴, un grand nombre de structures d'une même molécule avec ou sans ligand permet d'avoir une information pertinente. Quand la méthode expérimentale n'est pas possible ou n'a pas été encore réalisée, la solution à envisager en premier est une approche par modélisation comparative⁴⁵.

1.3. Applications

Il y a deux principales applications au programme de docking. La plus ancienne est la prédiction du mode d'interaction. La seconde consiste à optimiser des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer les performances des différents programmes de docking pour chaque application. L'aptitude d'un algorithme à trouver l'emplacement correct du ligand par rapport à son récepteur est habituellement déterminée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (root-mean-square deviation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal. La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate^{46,47}. En général, les erreurs de docking sont dues à un échantillonnage insuffisant ou à une fonction de score inadéquate.

Pour savoir de quel type d'erreurs il s'agit, il faut comparer l'énergie la plus basse obtenue par docking avec le score de la structure cristalline. Si le score du complexe de docking est moins favorable à celui de la structure cristalline il s'agit d'un problème de la partie chargée de parcourir l'espace conformationnel.

1.4. Le processus de scoring

1.4.1. Principe

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. Le principe thermodynamique est le suivant:⁴⁸

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéine}}$$

L'utilisation des fonctions de scoring est double. Tout d'abord, elles permettent de déterminer la conformation qui représentera au mieux le ligand concerné. Cette conformation est appelée

«première pose». L'autre utilisation des scores est de pouvoir classer les premières poses de chaque ligand afin d'établir un classement final des molécules les plus prometteuses.

Malgré tout, il subsiste encore beaucoup d'inconnues dans le mécanisme de reconnaissance lors de la formation des complexes tels que la formation de liaisons hydrogène, les termes entropiques ainsi que le rôle à jouer des molécules d'eau dans le processus de solvation-désolvation. Nous avons montré que le docking est accompagné d'une multitude d'approximations. Il en va de même pour les fonctions de scoring pour lesquelles il est impossible d'évaluer toutes les interactions intra et interatomiques. Bien que ces approximations existent, ces méthodes sont utiles pour nos applications de criblage virtuel.

1.4.2. Familles de fonctions de scoring

Les fonctions de scoring peuvent être classées dans deux grandes catégories: les fonctions empiriques et les fonctions basées sur la connaissance (encore appelées «knowledge-based»). Ces deux classes de fonctions sont basées sur un ensemble de complexes ligand-protéine.⁴⁹ Elles ont donc la faiblesse de ne pouvoir prédire que des interactions qui ne dévient pas trop de celles ayant été répertoriées dans les complexes étudiés.⁴⁸

a- Les fonctions de scoring empiriques

Les termes représentant chacun des types d'interactions connues dans le complexe (liaison hydrogène, contact hydrophobe, interaction ionique, surface de contact ligand protéine et parfois les contributions entropiques) sont additionnées. La pondération de chaque terme est déterminée par des méthodes de régression multivariées appliquées à un ensemble d'apprentissage.

- L'exactitude, c'est-à-dire qu'une fonction de scoring doit proposer une précision acceptable dans un contexte défini.
- Le domaine d'application: il doit être assez étendu pour pouvoir permettre de prédire des composés par interpolation et extrapolation. Le modèle prédictif ne doit pas être trop restrictif.

Des méthodes linéaires permettent généralement d'obtenir un modèle capable d'extrapoler et d'interpoler. Les modèles issus de méthodes non linéaires (réseaux de neurones par exemple) ont parfois l'inconvénient de trop suivre les points ayant servi à leur élaboration et sont donc incapables d'interpoler et d'extrapoler.⁵⁰

- La robustesse de la méthode: dans des applications de QSAR, un problème majeur existe lorsque l'on applique les équations à des molécules différentes de l'ensemble d'apprentissage.

C'est précisément ce qui peut se passer dans le cas des fonctions de scoring puisque l'on ne possède généralement que la structure tridimensionnelle des molécules les plus affines, dans un contexte où l'on souhaite appliquer les fonctions de scoring à des molécules toutes différentes les unes des autres.

Toutefois, cette faiblesse peut être améliorée en élargissant les bases de données de complexes récepteur-ligand mais également en utilisant des méthodes de validation croisée afin de s'assurer que les coefficients de corrélation sont stables.

- La vitesse à des fins de criblage virtuel: les fonctions de scoring doivent être suffisamment rapides pour être appliquées au criblage virtuel. Toutefois, le facteur limitant n'est pas les fonctions de scoring mais le processus de docking.
- L'interprétation physique: il est souhaitable que le nombre de termes employés dans la régression soit le plus faible possible. L'ajout d'un nouveau terme doit faire la preuve d'un véritable bénéfice. Ceci est nécessaire pour obtenir une équation simple, facilement interprétable de manière physique.⁵⁰

b- Les fonctions de type knowledge-based

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexes ligand-protéine déterminés de manière expérimentale. Des règles définissant la géométrie préférentielle des interactions sont déduites de ces structures grâce à des moyens statistiques.

Cette alternative aux fonctions empiriques est plus tolérante quant aux interactions présentes au sein du complexe. Leurs expressions sont moins strictes que dans le cas des fonctions empiriques. La fonction PMF fait partie de cette classe de fonction.⁵⁰

1.4.3. Description des fonctions de scoring

a- La fonction de scoring DOCK

Dock-Score, élaborée par Kunst,⁵¹ dérive directement du champ de force AMBER⁵². Cette fonction est composée de deux termes électrostatique et stérique.

$$\text{Dock-Score} = E_{\text{(électrostatique)}}(d) + E_{\text{(stérique)}}(d)$$

Où E est l'énergie dépendante de la distance (d) entre deux points susceptibles d'interagir.

b- La fonction de scoring GOLD

Gold-Score est issue des travaux de Willet.⁵³ Cette fonction est la somme des énergies de stabilisation provenant des liaisons hydrogène, de l'énergie interne de Van der Waals pour la conformation du ligand en question ainsi que la force des interactions stériques entre le ligand et le récepteur.

$$\text{Gold-Score} = \text{Eliaison H}(d, \alpha) + \text{Estérique}(d) + \text{EVan der Waals}$$

c- La fonction de scoring FlexX

Cette fonction dérive de l'équation de Böhm qui est bien plus complexe que les deux fonctions de scoring⁵⁴.

$$\text{F-Score} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} N_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{liaison H}} (\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{liaison ionique}} (\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{aromatique}} (\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{lipophilie}} (\Delta d).$$

Cette équation considère la baisse d'entropie lors de la fixation du ligand dans le site actif. Les interactions sont prises en compte dans cette formule (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, contacts aromatiques). Un terme prend également en compte la lipophilie. Les écarts d'angle et de distance sont impliqués dans une fonction pénalisant les termes décrits ci-dessus.

Plus l'écart entre la géométrie de la liaison observée et la géométrie idéale est important, plus le terme est pénalisé et moins son énergie ΔG sera importante. Le terme lipophilique évalue les contacts atomiques entre la protéine et le ligand (interactions favorables hydrophobes et contacts déstabilisants).

d- La fonction de scoring Chemscore

Chemscore a été élaborée par le groupe d'Elbridge *et al.*⁵⁵ Elle prend également en considération des termes similaires aux autres fonctions jusque là décrites. Elle prend en compte l'énergie de liaison hydrogène, les interactions métal-ligand, les contacts lipophiles et enfin un terme prenant en considération l'entropie en fonction de la flexibilité de la molécule:

$$\text{Chemscore} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{liaison H}} (d, \alpha) + \Delta G_{\text{métal}} (d) + \Delta G_{\text{lipophilie}} + \Delta G_{\text{rot}} H_{\text{rot}}$$

L'énergie de liaison hydrogène est pondérée par la distance et l'angle entre les entités «donneur» et «accepteur». Le terme correspondant à la liaison du ligand avec un métal est pondéré par la distance entre l'atome du ligand et le métal.

e – La fonction MolDock Score

La fonction d'amarrage "MolDock Score" employée par MVD est une dérivée de la fonction PLP. Cette fonction contient des termes additifs des énergies des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, et des interactions hydrophobiques.

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

E_{intra} : Energie interne de ligand.

1. 5. Interaction protéine-ligand

Pour attacher un ligand à une protéine (docking) le problème est de prédire la conformation et l'orientation du ligand relative au site actif de la protéine cible. Le docking est la base de la reconnaissance moléculaire et du type de l'interaction. À chaque protéine cible de structure connue le docking se révèle être la clé dans le design de nouveaux médicaments^{56,57, 58}. Le ligand est considéré comme une petite molécule organique. Les interactions qui peuvent exister entre cette petite molécule (le ligand) et la protéine sont : des interactions polaires (liaisons hydrogène, liaisons ioniques) et des interactions hydrophobiques (contact entre des groupes hydrophobes).

- les interactions du 3ème niveau concernent les liaisons hydrogène et les liaisons ioniques, elles sont les plus restrictives géométriquement à cause de leur courte distance.³⁸

Une liaison hydrogène résulte de manière électrostatique entre un atome d'hydrogène (H), lié par covalence à un atome électronégatif (O, N, S) (donneur) et un deuxième atome électronégatif possédant une paire d'électrons non partagée (accepteur), leurs énergies sont estimées entre 3 et 9 kcal/mol.

- les interactions du 2ème niveau sont les interactions hydrophobiques (π - π) entre le centre d'un cycle aromatique et les atomes d'un autre cycle. Des études sur l'interaction protéine-ligand ont montré que ce type d'interaction est le plus fréquent.³⁸

- les interactions du 1erniveau sont les contacts hydrophobiques non spécifiques entre les atomes de carbone aliphatique ou aromatique. Ces interactions sont généralement sphériques avec un rayon de 4Å° et elles couvrent la plus grande partie du ligand.³⁹

1.6. Logiciels utilisés

Le docking moléculaire a pour objectif essentielle de prédire la conformation (position et orientation relative) la plus favorable du ligand au sein de son récepteur. Initié au début des

années 1980, ce domaine s'est développé pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs^{59,38}.

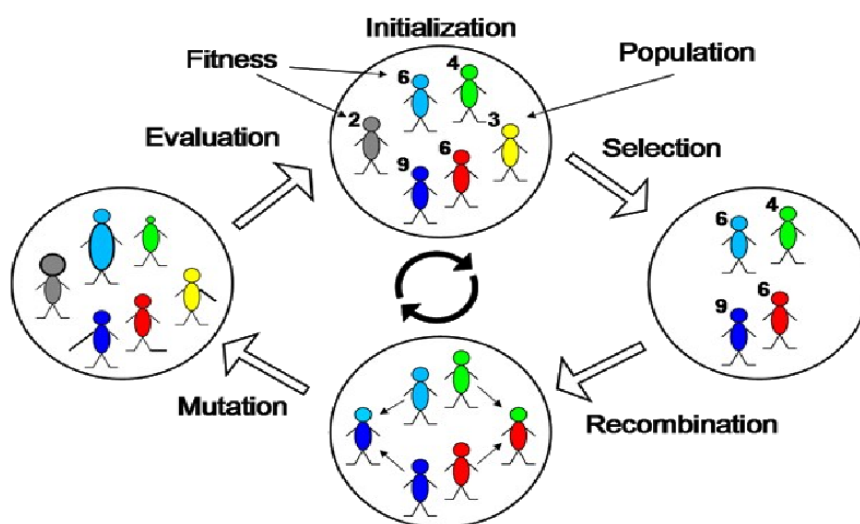
A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont respectivement: AutoDock, GOLD, FlexX, DOCK et Molegro virtuel Docker (MVD).

Nous intéressons, également au Molegro Virtuel Docker car il est le logiciel utilisé dans notre étude.

Le Molegro Virtuel Docker (MVD) est un logiciel performant permet la prévision des interactions Enzyme-ligand. Il réalise, automatiquement toutes les étapes du processus. Le MVD offre un amarrage de haute qualité, il utilise une technique d'optimisation basée sur la rentabilité et la productivité. MolDock Score est basée sur un nouvel algorithme heuristique de recherche qui combine l'évolution différentielle avec un algorithme de prévision de cavité.

Les algorithmes évolutionnaires sont des méthodes d'optimisation génériques et itératives.

Elles se reposent sur un processus adaptatif similaire à celui de l'évolution naturelle. Ces méthodes sont capables de gérer plusieurs solutions simultanément, regroupées dans une population.(figure (III.15)).



Figure(III.15) : Représentation schématique du cycle évolutionnaire d'un algorithme évolutionnaire.

Alors, cette population est exposée à une pression de sélection, implémentée dans une fonction objective (fonction de score) qui elle-même décrit le problème à optimiser, où

plusieurs degrés de liberté interviennent, qui leurs tour permettent de définir une solution appelé « génome ».

La sélection des solutions les plus performantes d'après la fonction de score est appelée « parents » est contrebalancée par la génération de nouvelles solutions « enfants », ceci est pour maintenir une diversité de population. Les enfants, donc sont générés par modification du génome parental par des opérateurs classés, classés suivant le nombre de parents sur lesquels ils s'appliquent. Une fois les enfants créés, ils prennent la place des plus mauvaises solutions de la population. Et donc le processus itératif commence, cette dernière population (nouvelle population) est de nouveau exposée à la pression de sélection implémentée par la fonction de score. L'évolution continue par une nouvelle itération ou bien génération. Au cours du processus itératif les solutions les mieux adaptées s'émergent, jusqu'à convergence de la population ou après un nombre déterminé de génération. Dans le docking moléculaire, l'algorithme évolutionnaire cherche à décrire les interactions entre le ligand et la cible protéique où les degrés de liberté (ddl) correspondent aux positions, orientations et conformation du ligand et du récepteur^{60, 61}

Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre les éléments bibliographiques essentiels relatifs à la compréhension de la méthodologie du docking moléculaire.

Nous allons présenter dans ce qui suit, l'application de cette méthodologie dans l'étude des interactions Enzyme-Ligand : cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase dans le but de Caractériser le mécanismes d'interaction mis en jeu entre l'AChE et des inhibiteurs célèbre et principalement de développer de nouveaux inhibiteurs en faisant appel aux approches *in silico* de modélisation des interactions enzyme-inhibiteur par docking moléculaire.

PARTIE II

Chapitre IV

I .Matériels et méthode

II. Résultat et discussion

I .Matériels et méthode

Dans cette étude, nous avons utilisé le programme Molegro Virtuel Docker 5.5, la procédure de docking par ce logiciel se décompose en 5 étapes :

1. Préparation du récepteur

Les fichiers du récepteur utilisé, l'enzyme acétylcholinestérase est téléchargé sous forme PDB via le banque de la protéine (<http://www.pdb.org>).

Protein Data Bank ou PDB est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.

Parmi plusieurs complexes proposés par la PDB, nous avons choisi les codes mentionnés dans le tableau suivant, car il s'agit des structures correctement définie avec une bonne résolution.

Tableau (IV.2) : Résolution des structures étudiées.

Code PDB	Résolution A°
1ACJ	2.80
1DX6	2.30
1E3Q	2.85
1EVE	2,5
1OCE	2,70
1U65	2,61
1VOT	2,50
2ACE	2,50
2ACK	2,40
1ACL	2,80

La préparation de récepteur pour l'amarrage s'effectue comme suit :

les molécules d'eau, les cofacteurs, et les ions ont été exclus; les états de protonation (les ligands et la protéine) ont été placés au pH physiologique ;les ligands ont été placés pour être flexible ;et l'enzyme a été préparée comme corps rigide.

2. Préparation du ligand :

Les ligands utilisés dans ce travail sont téléchargé sous forme PDB de la banque de donnée PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Le ligand choisis pour le docking sera importer dans l'espace de recherche, en utilisant la commande suivante : "Import Molecules"

3. Détection des cavités :

Les cavités présentes dans le récepteur sont identifiées en utilisant l'algorithme intégré pour la détection de cavité. La maille de la grille est fixée par défaut à 0.80Å.

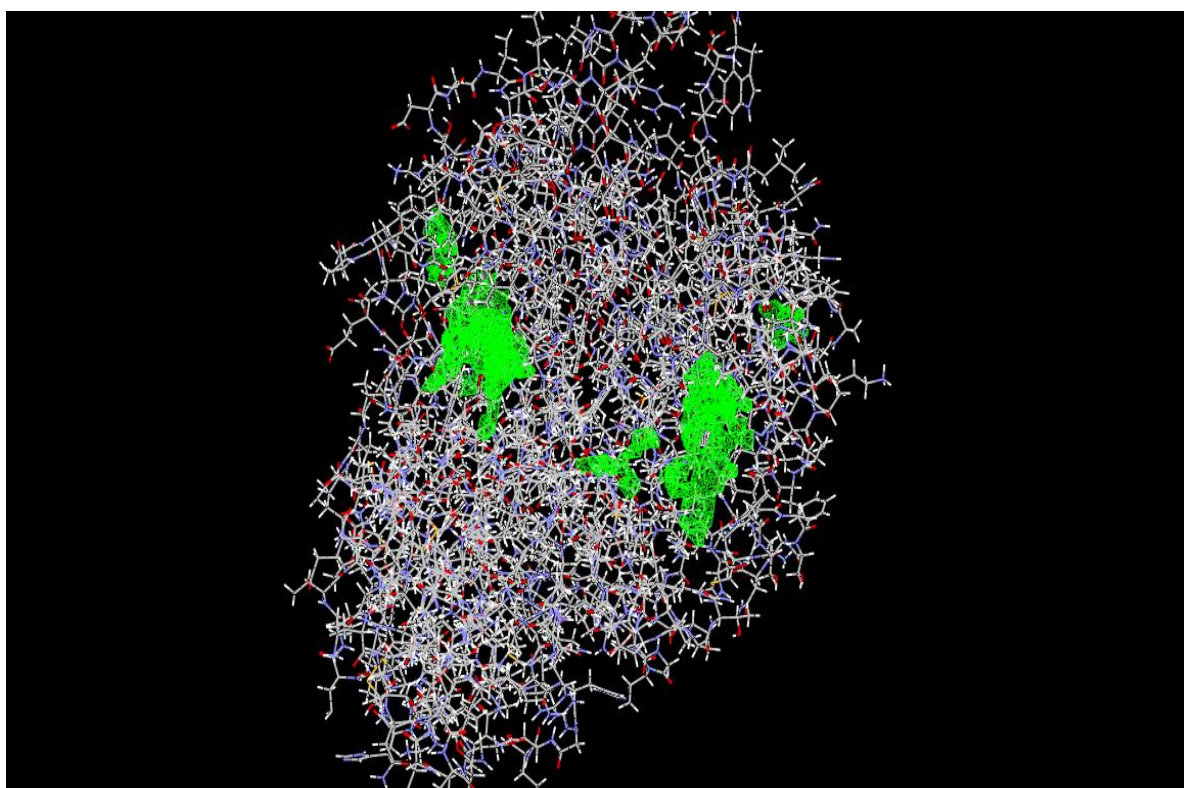


Figure (IV.16) : Cavités détectés dans le récepteur 1ACJ.

4. Docking :

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

5. Analyse des résultats :

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

La fonction d'amarrage "MolDock Score" employée par MVD est une dérivée de la fonction PLP, proposées par Gehlhaar et al¹, et développée par Yang et al².

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

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

E_{intra} : Energie interne de ligand.

II. Résultat et discussion

Notre démarche consiste d'abord de tester, dans un premier temps, la fiabilité du programme de docking moléculaire "Molegro Virtuel Docker" utilisé dans cette étude. Dans un deuxième temps, nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes d'interaction mis en jeu entre l'acétylcholinestérase et des inhibiteurs connus (Tacrine, Galanthamine, Donepezil). Ensuite nous allons étudier le mécanisme d'inhibition mis en place par le Linalol : un inhibiteur naturel appartenant à la classe des monoterpènes.

Dans une dernière partie, en nous appuyant sur les résultats précédents, nous avons tenté de modéliser de nouveaux inhibiteurs, dérivé de Linalol, pouvant inhiber plus fortement l'acétylcholinestérase.

1. Tests de fiabilité du programme de docking :

Pour vérifier si le protocole que nous venons de développer est correct, nous avons jugé utile d'évaluer d'abord la performance du programme Molegro virtuel Docker (MVD) par les deux tests suivants :

- L'écart quadratique moyen ou le RMSD (root mean square deviation)
- La superposition des ligands.

1.1. L'écart quadratique moyen (RMSD) :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer les performances des différents programmes de docking pour chaque application. L'aptitude d'un algorithme à trouver l'emplacement correct du ligand par rapport à son récepteur est habituellement déterminée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (root-mean-square deviation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal. La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate^{3,4}.

Le test RMSD a été réalisé sur dix complexes de l'acétylcholinestérase (AChE) disponibles dans la PDB. Il s'agit plus précisément, de complexes formés entre l'enzyme AChE et différents ligands. Les codes PDB des complexes et de leurs ligands ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenus avec (MVD) sont mentionnés dans le tableau (IV.3) .

Tableau (IV.3) : Valeurs de RMSD des dix complexes de l'AChE étudiés.

Code PDB	Code des ligands	RMSD (Å°)
1ACJ	THA	0,32
1DX6	GNT	0,78
1E3Q	EBW	5,46
1EVE	E20	0,79
1OCE	MF2	3,03
1U65	CP0	1,38
1VOT	HUP	0,53
2ACE	ACH	1,89
2ACK	EDR	0,60
1ACL	DME	2,81

La valeur de la déviation quadratique moyenne ou RMSD du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal ne dépasse pas 2Å° dans la plupart du complexe de l'acétylcholinestérase étudiée.

Les trois valeurs de RMSD supérieur à 2Å° correspondant au complexe suivant : 1E3Q, 1OCE, 1ACL.

Afin d'expliquer ce résultat, nous avons décidé de prendre en compte un facteur peuvent être potentiellement influents sur les valeurs de RMSD. Ce facteur est ; le nombre de liaisons rotatives (nRotB) (tableau (IV.4)).

Tableau (IV.4) : Valeurs du nRotB des dix ligands étudiés.

Code PDB	Code des ligands	nRotB	RMSD (Å°)
1ACJ	THA	0	0,32
1DX6	GNT	1	0,78
1E3Q	EBW	12	5,46
1EVE	E20	6	0,79

1OCE	MF2	10	3,03
1U65	CP0	6	1,38
1VOT	HUP	1	0,53
2ACE	ACH	4	1,89
2ACK	EDR	2	0,60
1ACL	DME	11	2,81

Le nombre élevé des liaisons rotatifs (liaisons simples ou liaisons sigma pouvant tourner librement) présentes dans les ligands codés par EBW, MF2, DME est probablement la raison pour laquelle il donne un mauvais RMSD⁵.

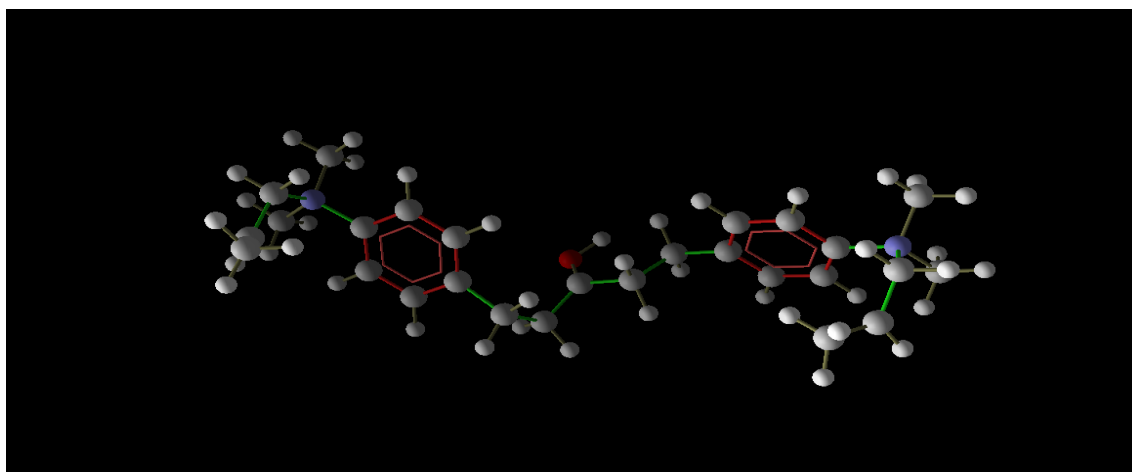


Figure (IV.17) : Structure 3D du ligand (EBW) : les liaisons rotatives sont représentées en vert.

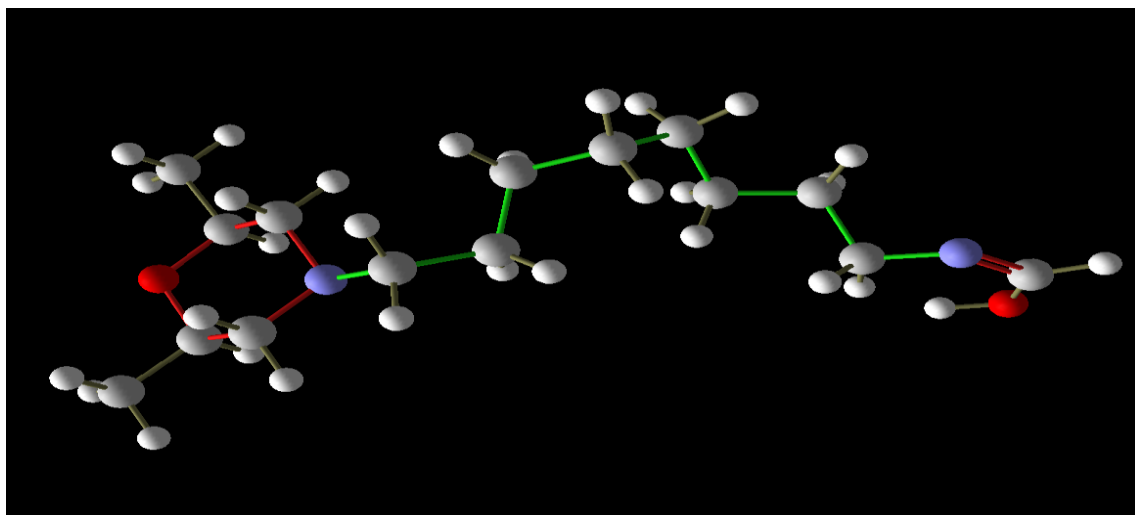


Figure (IV.18) : Structure 3D de ligand (MF2) : les liaisons rotatives sont représentées en vert.

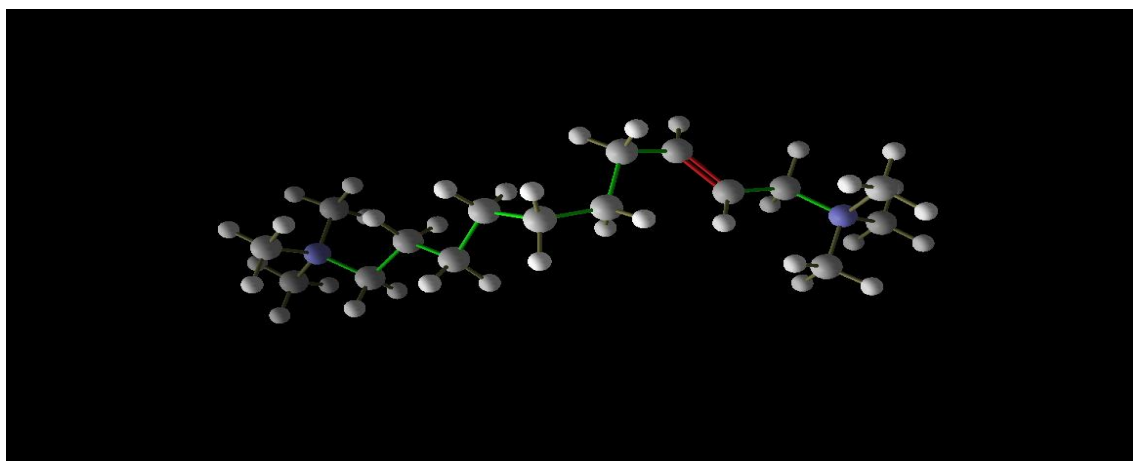


Figure (IV.19) : Structure 3D du ligand (DME) : les liaisons rotatives sont représentées en vert.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que le programme MVD est suffisamment performant puisqu'ils reproduisent assez bien les résultats expérimentaux. Il est généralement plus efficace en présence du ligand moins flexible.

Cela est également confirmé par l'Analyse visuel de la Superposition des géométries du ligand.

1.2 .La superposition des ligands :

Les résultats de docking des sept complexes présents une valeur de RMSD inférieure à $2\text{\AA}$, sont montrés dans les figures suivantes. La meilleure conformation du ligand générée par le docking (verts) est superposée à la pose expérimentale du ligand naturel (coloré par type d'atomes).

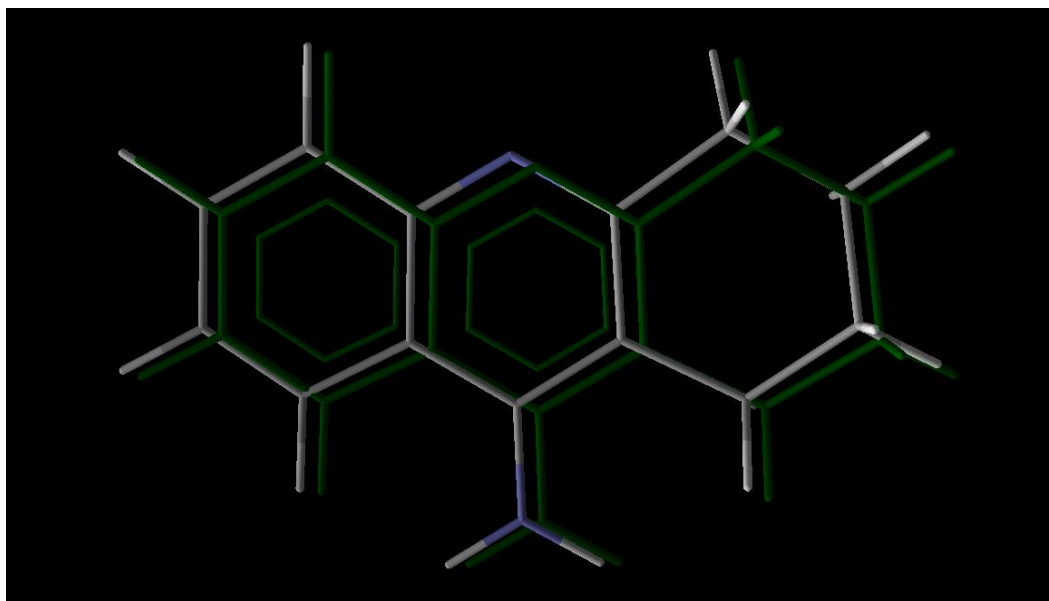


Figure (IV.20) : Superposition des géométries de l'inhibiteur Tacrine donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec MVD (coloré en vert).

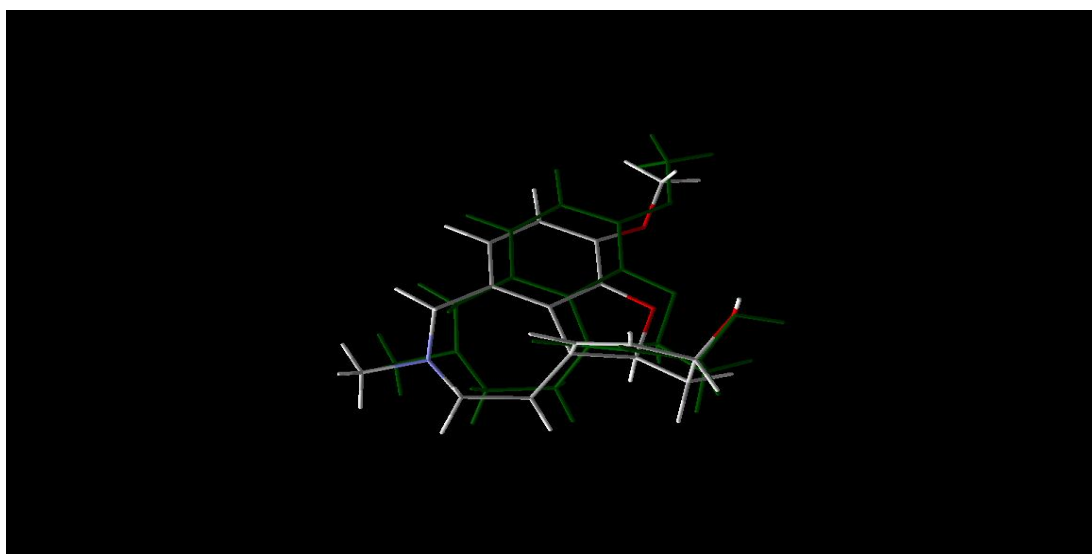


Figure (IV.21) : Superposition des géométries de l'inhibiteur Galanthamine donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec MVD (coloré en vert).

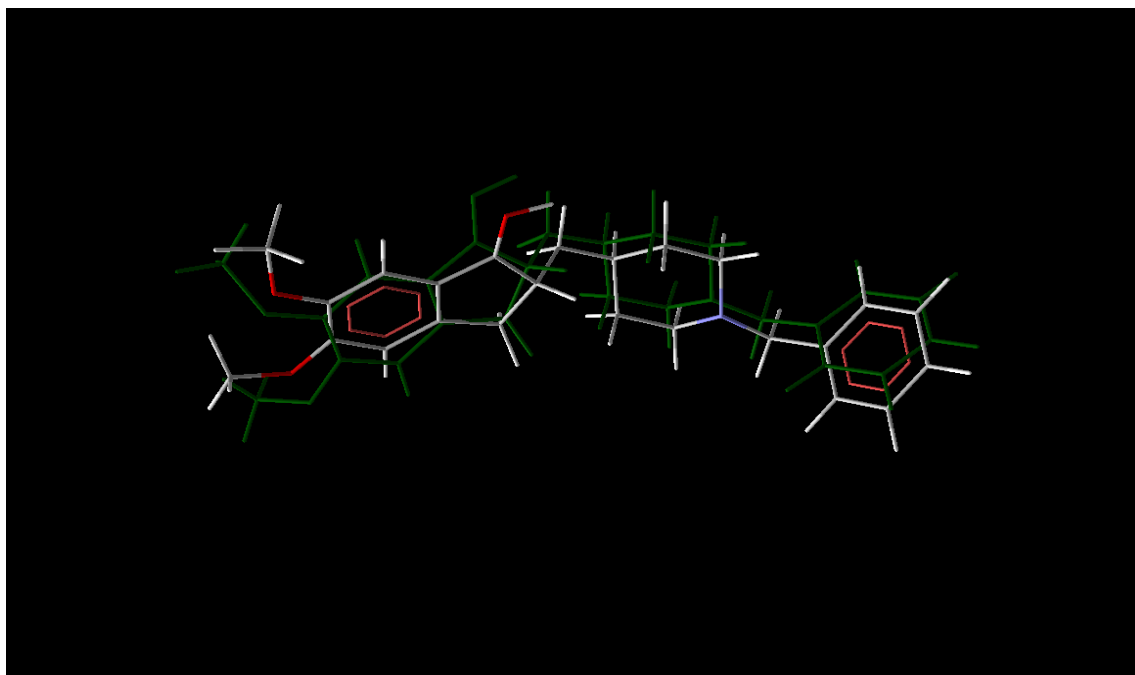


Figure (IV.22) : Comparaison de la conformation expérimentale de l'inhibiteur Donepezil (colorée par type d'atome) et sa conformation optimale simulée par MVD (colorée en vert).

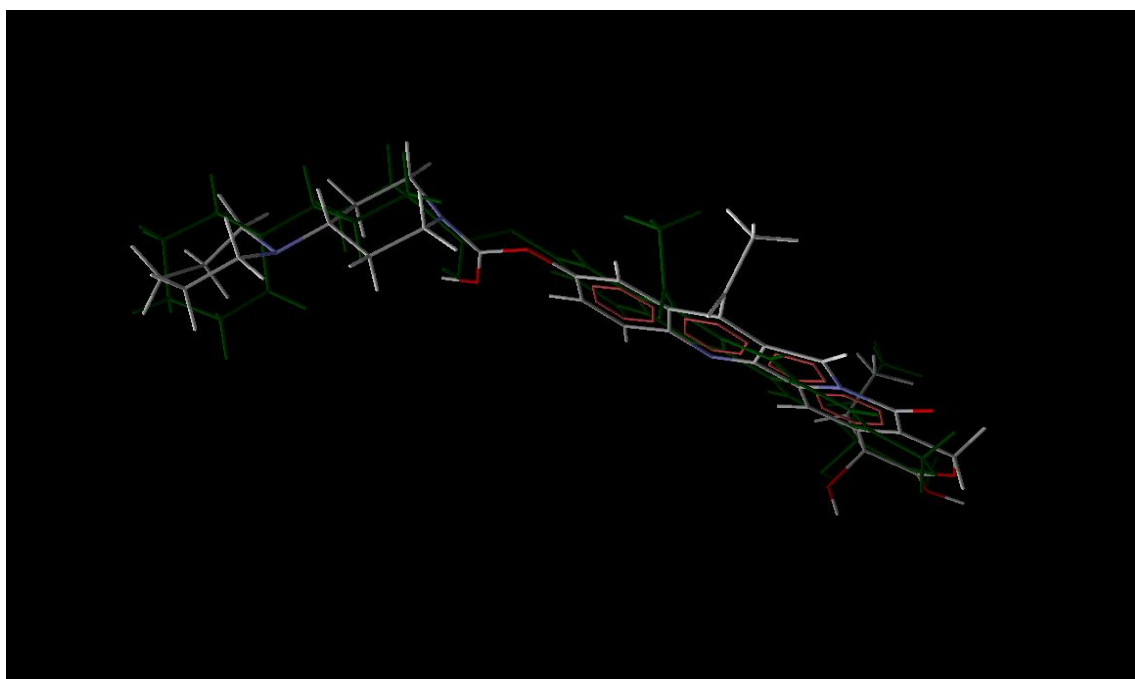


Figure (IV.23) : Superposition spatiale entre la pose du ligand CPO calculée par MVD (coloré en vert) et la conformation dans le complexe expérimentale 1U65 (coloré par type d'atome).

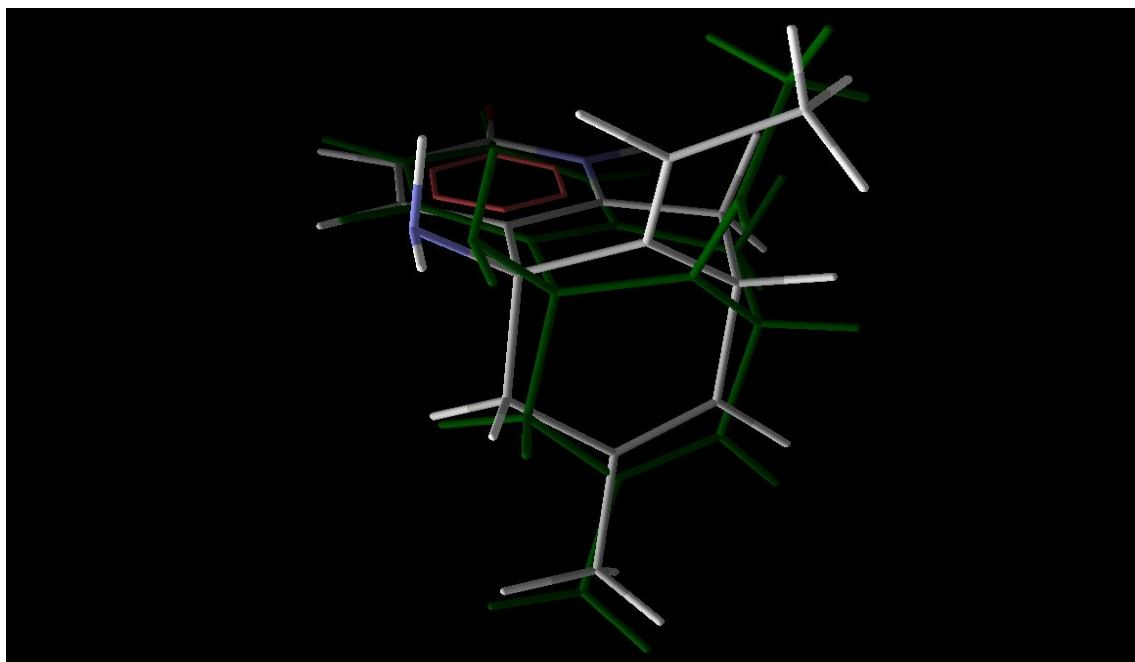


Figure (IV.24) : Superposition des géométries de ligand HUP donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec MVD (coloré en vert).

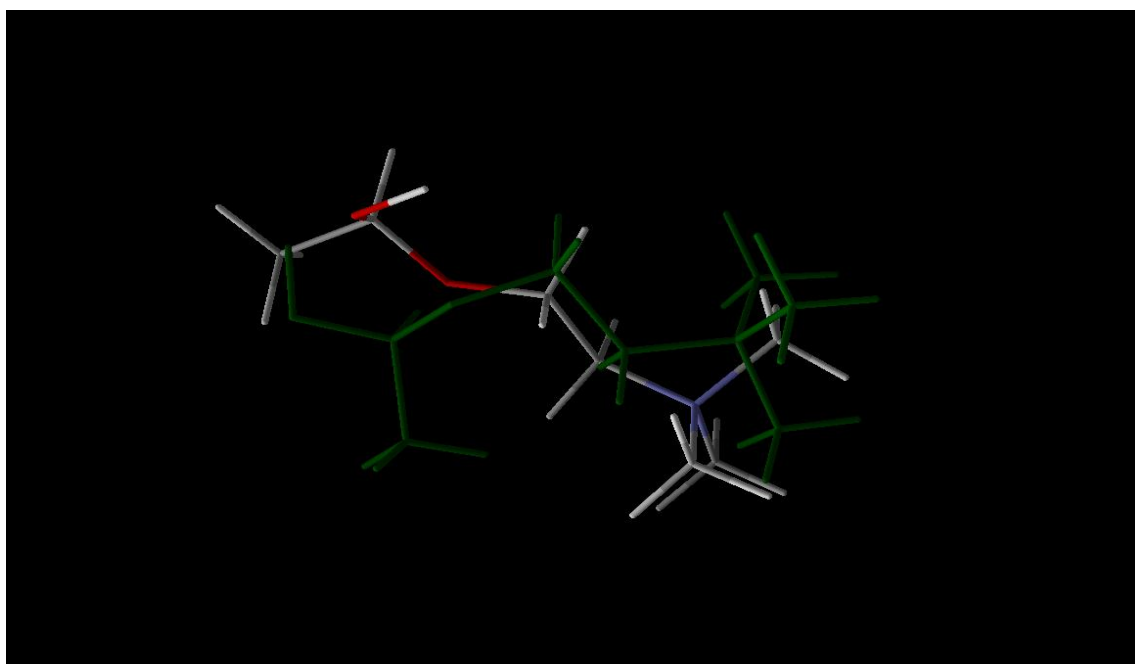


Figure (IV.25) : Superposition du modèle du ligand ACH simulé par MVD (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation déterminée expérimentalement (coloré par type d'atome).

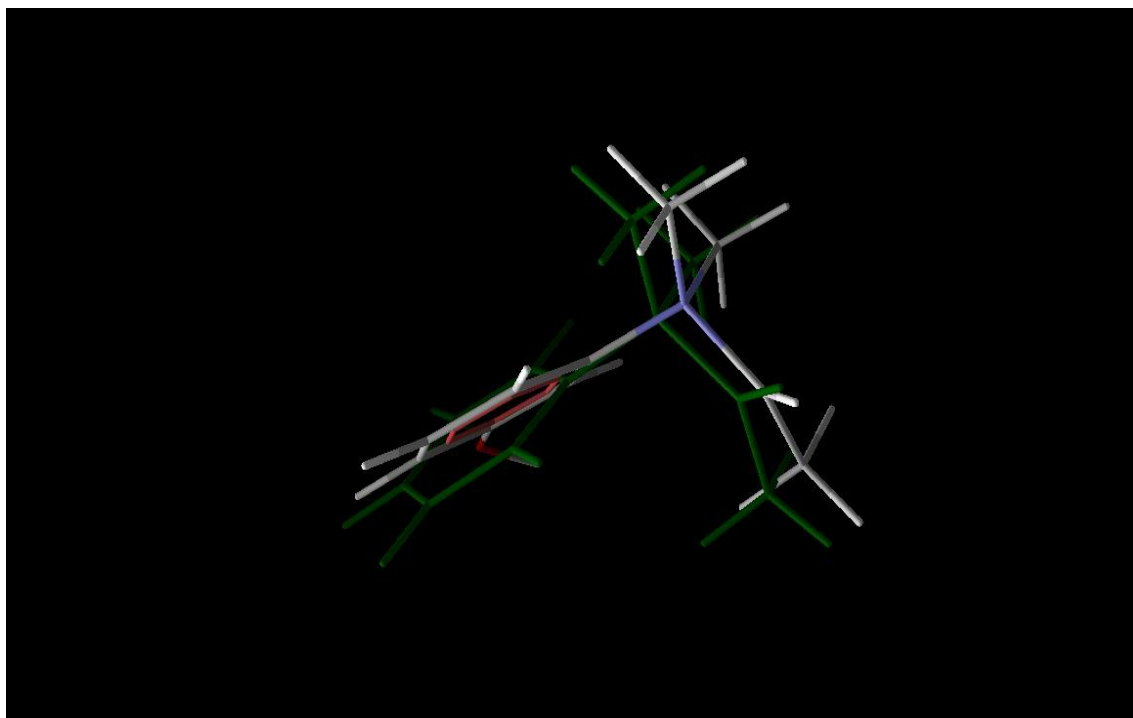


Figure (IV.26): Superposition des géométries de ligand EDR donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec MVD (coloré en vert).

Les poses montrent une bonne superposition, ce qui indique que les poses calculées par MVD sont extrêmement reproductibles. Cette notion est essentielle car elle met en évidence la grande convergence de résultats obtenue avec MVD ; ainsi que le calcul du RMSD, qui est le plus souvent utilisé comme indicateur pour la reproduction de poses, accentue les défauts du docking, puisqu'un ligand de faible poids moléculaire, même placé de façon aléatoire, peut présenter un RMSD plus faible qu'une molécule de plus haut poids moléculaire⁶.

La conclusion de cette étude préliminaire est que le logiciel de docking MVD est capable d'échantillonner l'espace de recherche suffisamment bien pour générer des modes d'interactions corrects en tenant compte de travailler avec des ligands moins flexibles.

2. Etude des interactions Tacrine-AChE :

Comme il est mentionné dans le deuxième chapitre, la Tacrine est un inhibiteur compétitif très puissant de l'acétylcholinestérase. Il s'agit d'un composé hétérocyclique dont la structure est représentée dans la figure suivante.

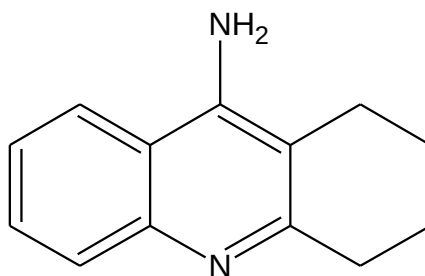


Figure (IV.27) : Structure 2D de la Tacrine

Pour effectuer le docking de cette molécule, nous avons utilisé le complexe 1ACJ.

Le programme MVD nous a permis de prédire l'énergie d'interaction entre la Tacrine (THA) et l'AChE qui s'évalue à -99,73 Kcal/Mole. Le complexe formé est stabilisé au sein de la cavité 1 (figure (IV.28)) de l'AChE par des interactions hydrophobiques par les résidus Trp432, Trp114, Leu127, Leu333, Leu 430, Ile439, Ile444, Phe78, Phe75.

Le composé THA établit également des interactions hydrophobiques de type π - π entre le ligand et les cycles benzéniques des acides aminés Trp84, Phe330 et Trp432. Une seule interaction stérique a été observée entre l'amine de cycle du ligand et l'Histidine 440 (figure (IV.29)).

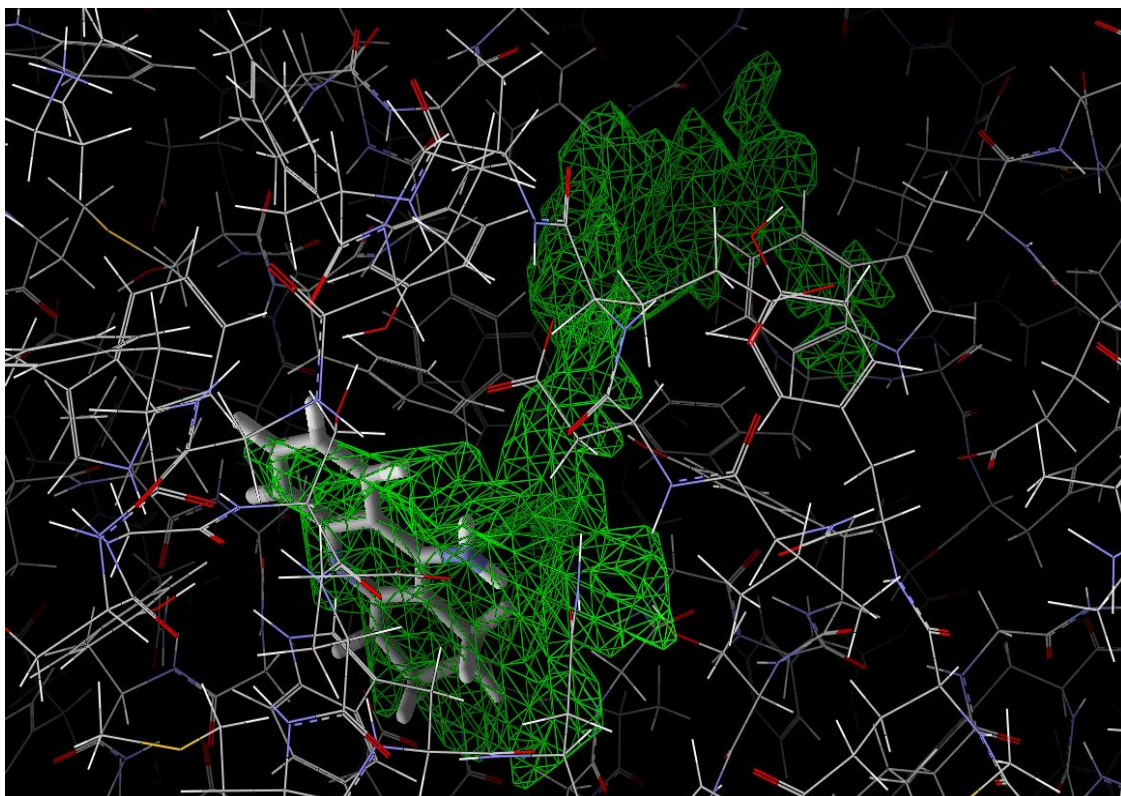


Figure (IV.28) : Positionnement du ligand THA (coloré par type d'atomes) au sein de la cavité 1 (coloré en vert)

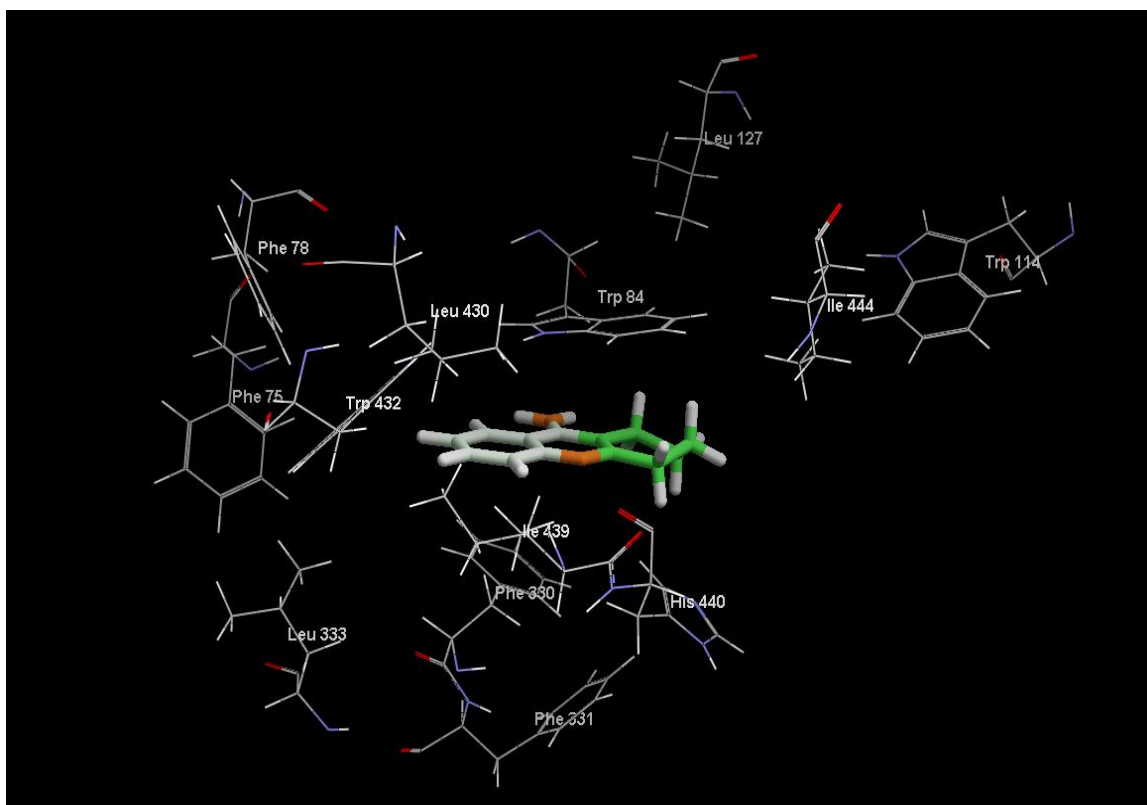


Figure (IV.29) : Représentation des interactions Tacrine-AChE

3. Etude des interactions Galanthamine –AChE :

La Galanthamine (figure (IV.30)) appartient à la famille des anticholinestérasique ; elle inhibe de façon réversible et compétitive l'acétylcholinestérase. Elle potentialise l'action de l'acétylcholinestérase en empêchant sa dégradation dans la fente synaptique.

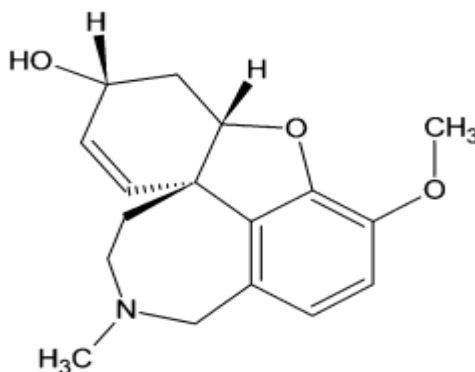


Figure (IV.30) : Structure chimique de la Galanthamine.

La modélisation de l'interaction Galanthamine-AChE simulé par docking moléculaire avec MVD nous a permis d'obtenir un complexe plus stables (figure (IV.31)) avec une énergie d'interaction égale à -129,7 Kcal/Mole. Cette énergie résulte de la mise en place de trois liaison hydrogène et plusieurs interaction hydrophobique.

Les longueurs et les orientations spatiales des différentes liaisons hydrogène obtenues sont résumées sur le tableau suivant :

N° d'H-Bonds	Résidus impliqué	Groupe ment du ligand	Distance A°
1	O=C-Glu199	O-CH3	2,72
2	(OH)-Ser200	O-CH3	2,60
3	(OH)-Ser200	O-Cycle	3,19

Ce résultat a déjà été trouvé par Natalie Cortes *et al...*⁷ qui ont utilisé un autre logiciel appelé l'Autodock.

La visualisation des résultats du docking (figure (IV.31)) montre que le composé (GNT) forme avec le site actif de l'AChE plusieurs interactions hydrophobes avec les résidus Trp279, Leu127, Ile439, Ile444, Phe120, Phe75.

le complexe formé est stabilisé aussi via plusieurs interactions hydrophobiques de type π - π entre le ligand et les cycles benzéniques des acides aminés Phe330, Phe331, Phe288, Phe290 et le Trp84, Trp233.

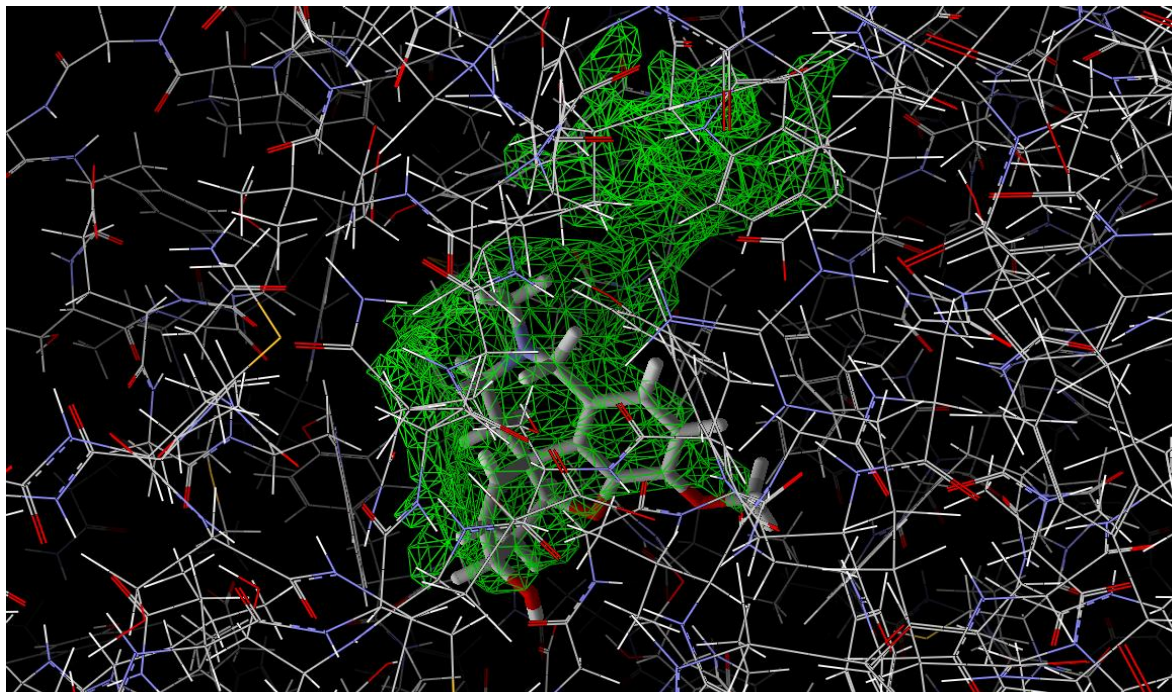


Figure (IV.31): Positionnement du ligand (GNT) (coloré par type d'atomes) au sein de la cavité 1 (coloré en vert)

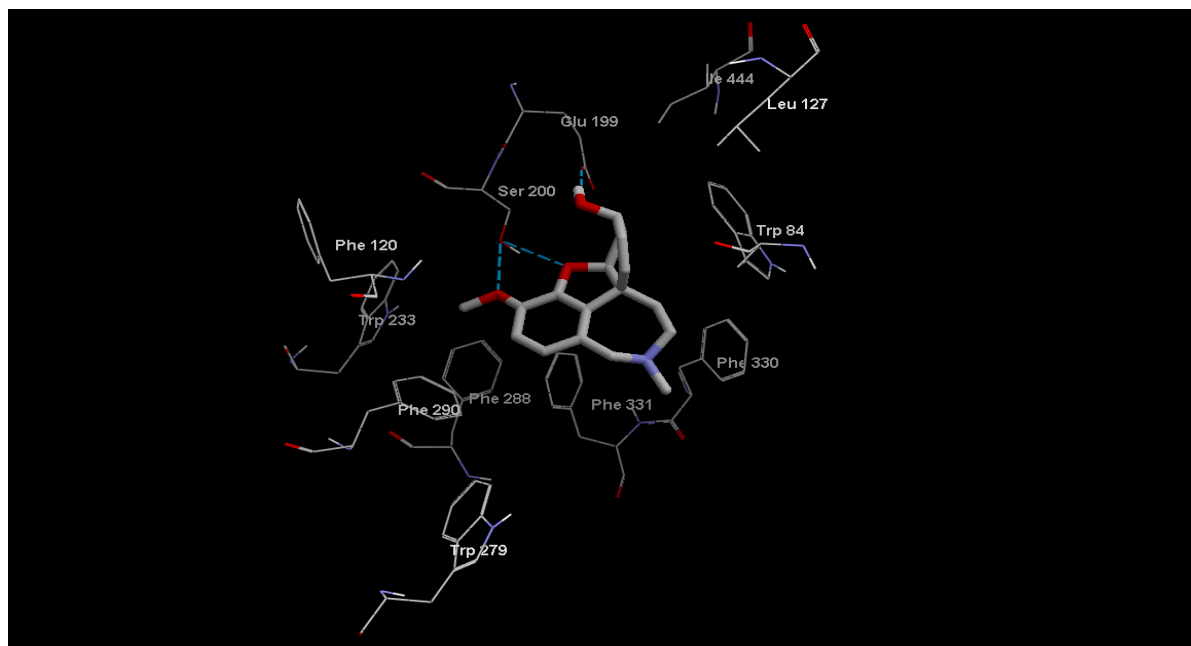


Figure (IV.32) : Représentation des interactions Galanthamine –AChE les liaisons hydrogène présentées par un trait bleu discontinue.

4. Etude des interactions Donepezil-AChE :

Le Donepezil (figure (IV.33)) se caractérise par la plus faible activité biologique ($IC_{50} = 0,007 \mu\text{mol}$)⁸. Le programme Molegro virtuel Docker confirme parfaitement ce résultat en fournissant une énergie d'interaction égale à -148,69 Kcal/Mole, ainsi que avec la bonne pénétration de ligand au niveau du site actif (figure (IV.31)).

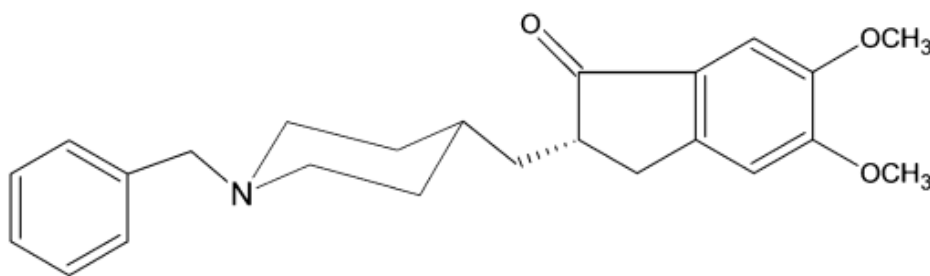


Figure (IV.33) : Structure chimique de la Donépézil

La visualisation des résultats du docking montre que le composé (E20) forme avec le site actif de l'AChE plusieurs interactions hydrophobes avec les résidus Ile444, Leu288 Phe331, Phe330, Phe288, Tyr121, Tyr334, Gly118, Gly117, Gly444, Phe290, Trp278 (π - π), Trp74 (π - π). Le complexe est stabilisé par une liaison hydrogène entre l'un du groupement méthoxy du ligand et la fonction hydroxyle du résidu Tyr70, séparés par une distance de 3,40 Å (figure (IV.35)).

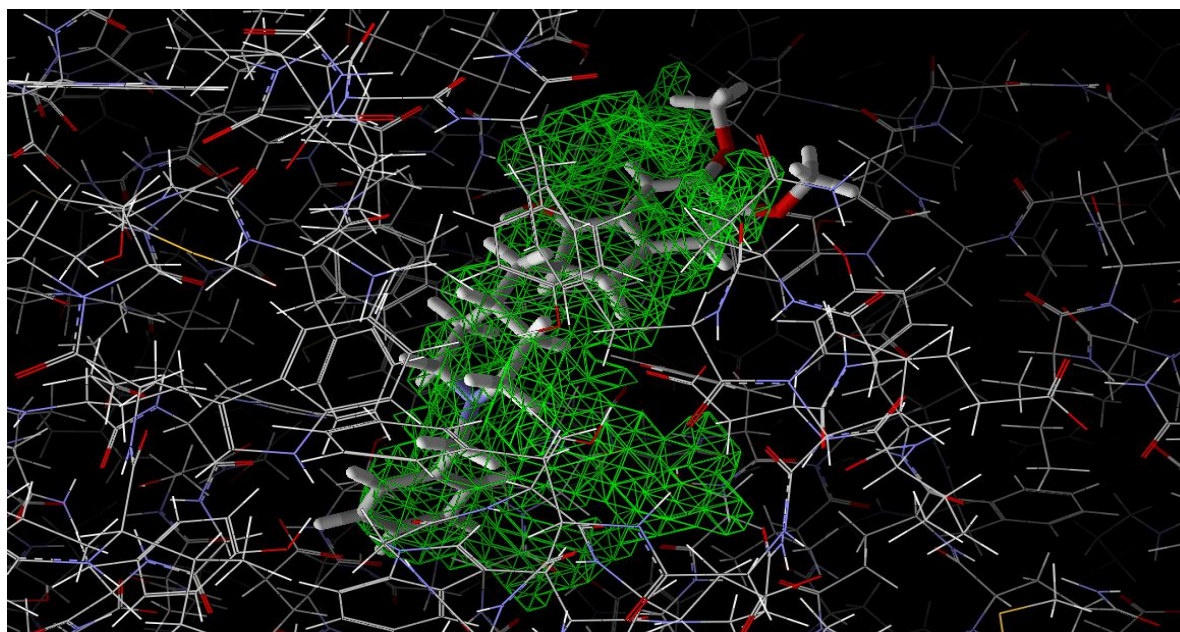


Figure (IV.34) : Positionnement du ligand (E20) (coloré par type d'atomes) au sein de la cavité (coloré en vert).

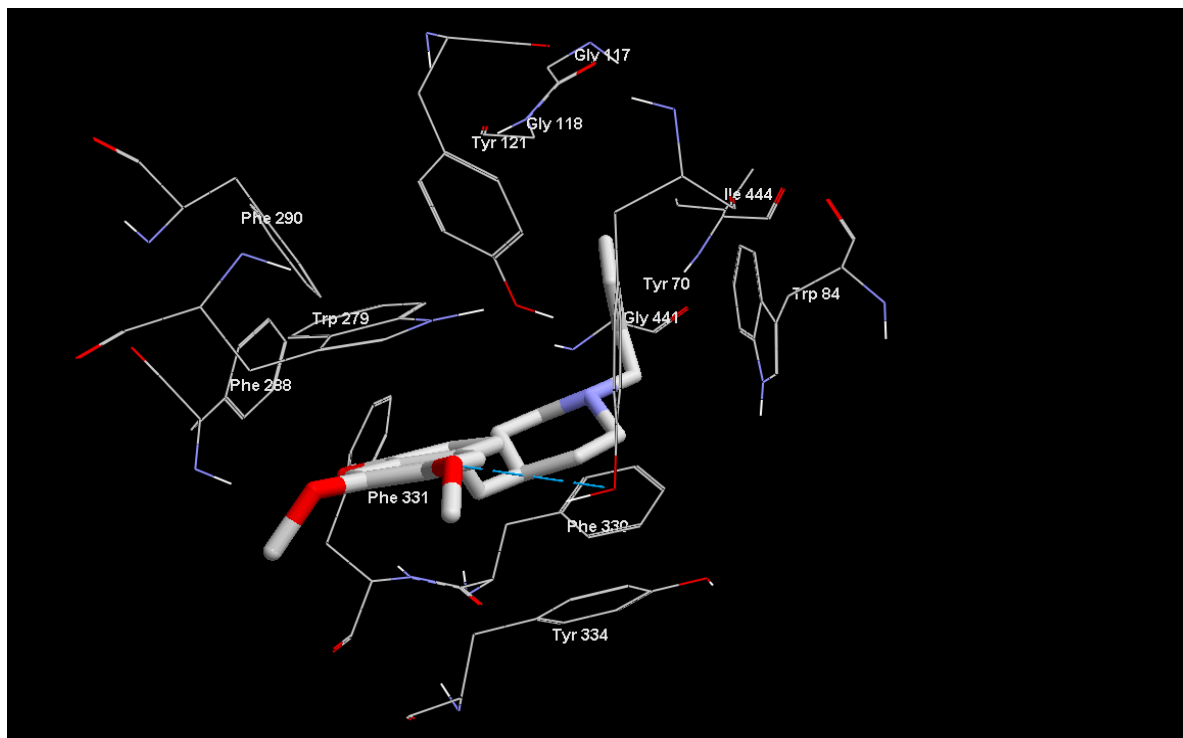


Figure (IV.35): Représentation des interactions Donepezil–AChE : les liaisons hydrogène présentées par un trait bleu discontinue .

5. Etude des interactions Linalol-AChE :

Le **linalol** (3,7-diméthyl-1,6-octadién-3-ol) est un alcool terpénique, alcool tertiaire, insaturé à l'odeur de muguet. On le retrouve notamment dans une majorité d'huiles essentielles notamment celle de lavande, de bergamote, de bois de rose, dont il est le composant majeur et de menthe. Parmi plusieurs composés monoterpéniques, présentant une activité inhibitrice vis-à-vis de l'AChE⁹, nous avons choisis d'étudier le mécanisme d'inhibition mis en place par le linalol.

Le choix de ce composé est basé sur les propriétés et avantages suivants :

- faible coût
- propriétés olfactives et biologiques notables
- simplicité de mise en œuvre

5.1. Le choix de récepteur :

Le **linalol** est un inhibiteur compétitif modeste de l'acétylcholinestérase, dont sa structure chimique est représentée dans la figure suivante :

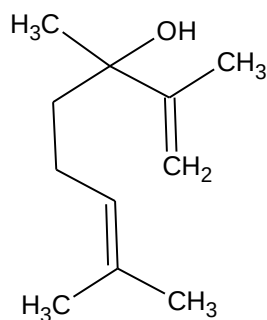


Figure (IV.36) : Structure 2D de linalol.

Dans le but de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs dérivés du linalol, il nous a semblé judicieux d'étudier, en premier lieu, son mécanisme d'inhibition.

Afin d'apprécier l'impact de la géométrie du récepteur sur la stabilité d'inhibiteur, Nous avons effectué la simulation de linalol sur les dix complexes étudiés précédemment en éliminant au préalable les ligands du site de l'enzyme.

Les résultats de la simulation par MVD de linalol aux dix complexes sont représentés dans le tableau (IV.5).

Tableau (IV.5) : Energie d'interaction des dix complexes AChE-linalol étudiés.

Code PDB	Moldockscore	Hbond score
1ACJ	-96,38	-6,24
1DX6	-84,17	-2,50
1E3Q	-87,90	-4,97
1EVE	-80,79	-1,13
1OCE	-86,62	-4,49
1U65	-87,09	-3,47
1VOT	-84,75	-2,50
2ACE	-83,318	-2,50
2ACK	-83,55	-5,00
1ACL	-80,26	-3,84

Parmi les dix récepteurs étudiés, le 1ACJ avec les meilleurs résultats d'énergie (MolDock score = -96,79 kcal mol⁻¹, HBond Score=-6,79 kcal mol⁻¹) se présente comme le récepteur le plus compatible. Ce résultat s'explique par la similarité de la taille du linalol à celle de la Tacrine (figure (IV.37)).

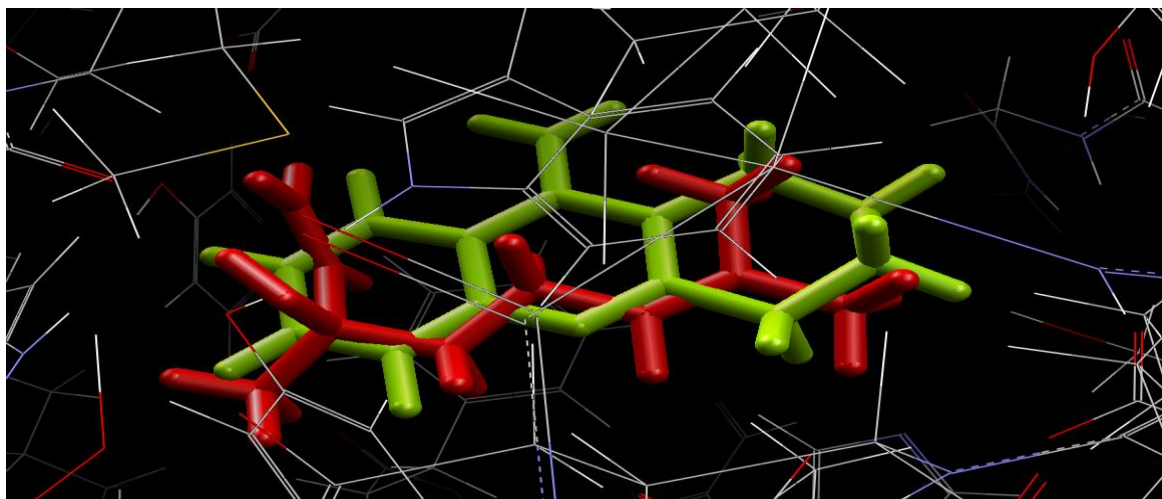


Figure (IV.37) : Similarité de la taille du linalol (coloré en rouge) à celle de la Tacrine (coloré en vert).

5.2. L'Analyse visuel des interactions :

La visualisation de résultat du docking moléculaire réalisée avec le linalol montre la bonne pénétration de ce inhibiteur dans le site actif de l'AChE.(figure (IV.38)).

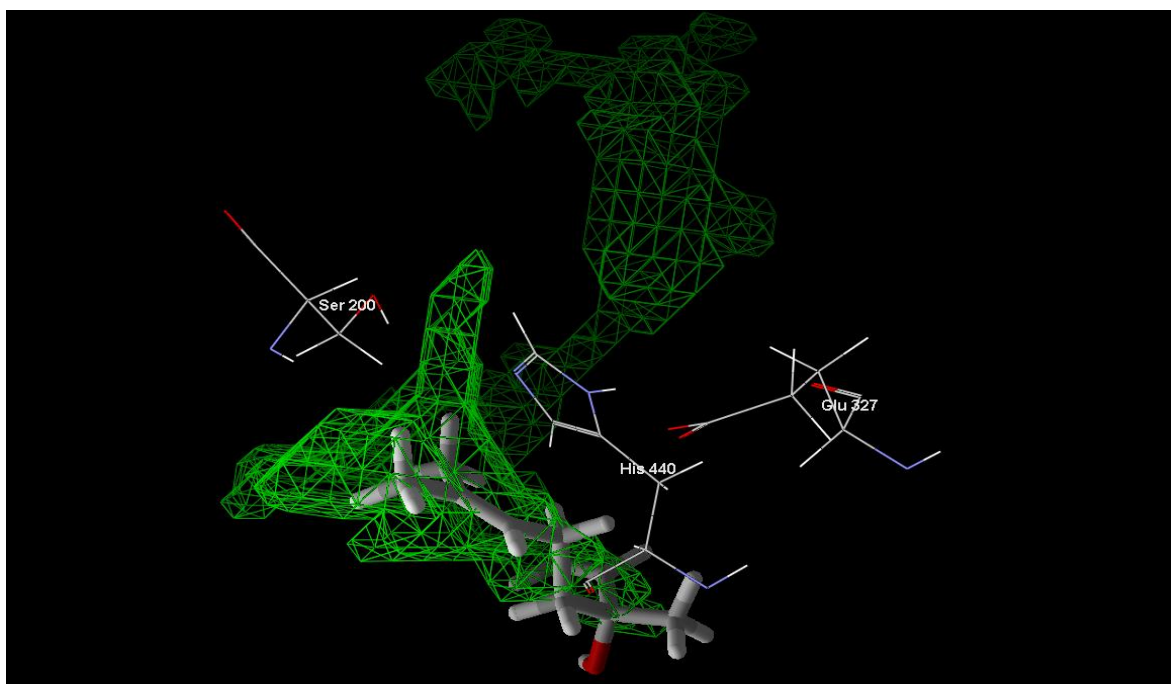


Figure (IV.38) : Positionnement du linalol (coloré par type d'atomes) au sein du site actif.

(Nous avons omis les autres résidus pour la clarté des acides aminés composant la triade catalytique).

Ces résultats s'expriment visuellement par la mise en place de nombreuses interactions entre l'enzyme et l'inhibiteur. On observe la présence de 3 ponts hydrogène formés, le premier

est d'une distance 2,81 Å se trouve entre la fonction hydroxyle de ligand et la fonction amine de l'indole du résidu Trp84. Le deuxième existe entre la fonction carbonyle du résidu Glu80 et la fonction hydroxyle de ligand, enfin le troisième s'établit entre la fonction hydroxyle du résidu Tyr 442 et la fonction hydroxyle de ligand. Enfin, le linalol est stabilisé au sein de la cavité principale de l'acétylcholinestérase par des interactions hydrophobiques par les résidus Ile439, Met436, Phe330, Ser81, Ser200, Tyr334, Tyr442, Gly441, Gly18. (Figure (IV.39)).

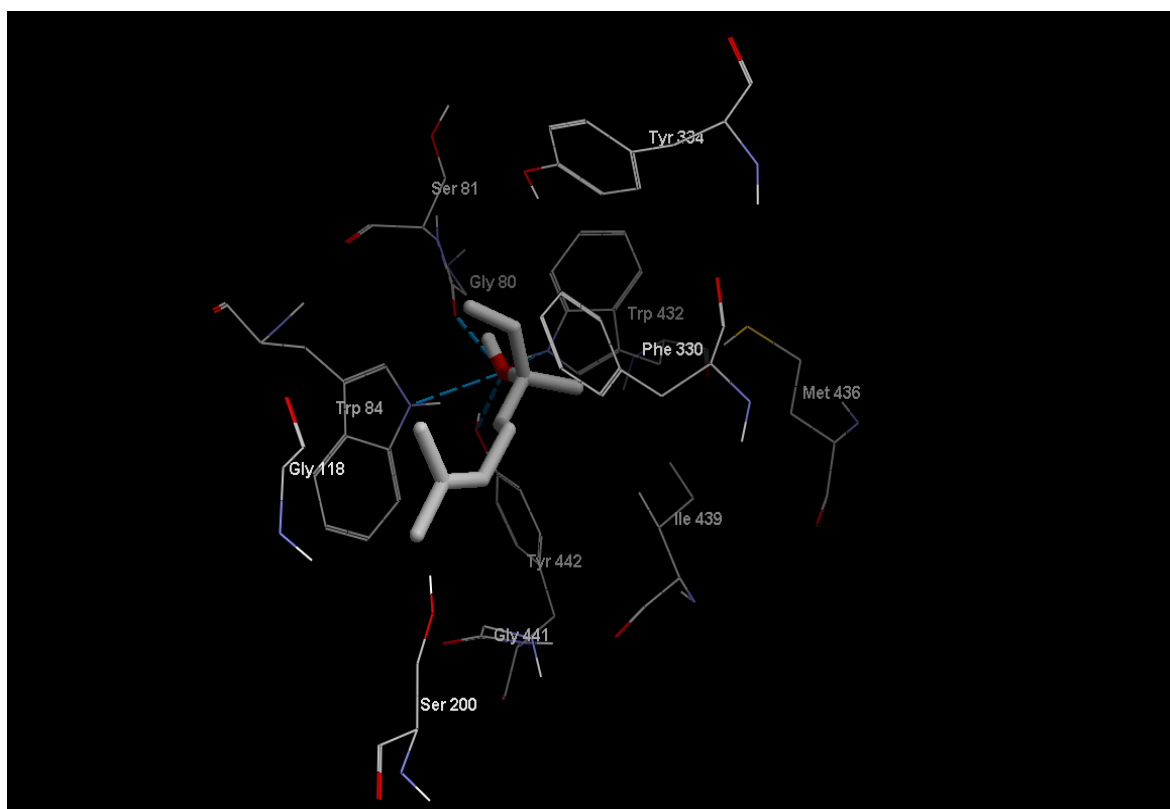


Figure (IV.39): Représentation des interactions linalol–AChE : les liaisons hydrogène présentées par un trait bleu discontinu.

En conclusion, le Linalol avec la valeur de son $K_i = 0.30 \text{ mM}^{10}$, et d'énergie d'interaction MolDock score = $-96,79 \text{ kcal mol}^{-1}$ se présente comme un inhibiteur moyennement efficace, afin d'améliorer son activité inhibitrice nous avons utilisé, la méthode du criblage virtuel d'une collection de molécules chimiques.

Le choix de la molécule de cette collection est basé sur l'introduction du nouveau radical, dans le but de créer de nouvelles liaisons hydrogène et d'autre interaction hydrophobique, surtout avec les acides aminés principaux.

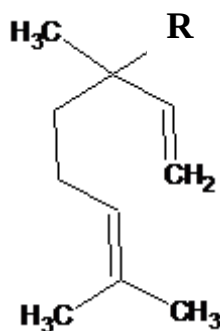
6. Proposition de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase :

Le développement d'inhibiteurs faisant appel à la connaissance d'information structurelle de l'enzyme ou du récepteur cible n'est pas nouveau, et on le voyait apparaître dans la littérature au début des années 1980. Cette méthode, consistant simplement en l'examen du site actif et en la direction par un expert des efforts de synthèse de nouveaux composés vers une structure permettant des interactions favorables avec le site visé.

En effet, les programmes de docking ont permis une modélisation plus facile des interactions enzyme-substrat souvent utilisées comme bases pour le développement d'agents médicamenteux.

Afin de Développer de nouveaux inhibiteurs à base de linalol, nous avons utilisé, la méthode du criblage virtuel d'une collection de molécules chimiques tiré de la banque de donnée PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). (Figure (IV.40))

Le changement de structure de la linalol consiste, à introduire de nouvelles substitutions sur le radical R, afin d'améliorer son score d'énergie.



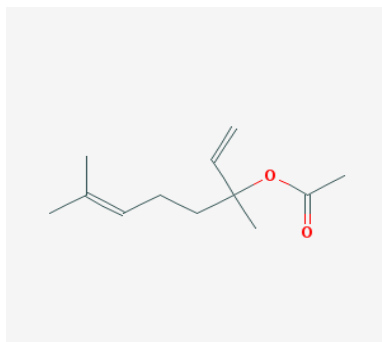
En se basant sur les observations décrites précédemment sur le site actif, nous avons Choisir des ligands avec différents substitutions de type amine, méthoxy, méthyle carbonyle...etc sur le radical R de la structure de départ de la linalol. Les résultats de la simulation par MVD des ligands dérivée de linalol (figure (IV.40)) au nombre de trente sont représentés dans le tableau suivants :

Tableau (IV.6) : Résultats des interactions de dérivés de linalol.

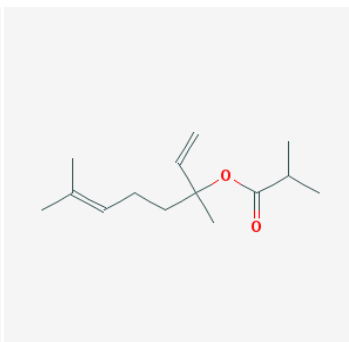
N° ligand	Nom	Code	Moldock Score	Hbond Score
1	Linalool acetate	CID8294	-97,85	-2,14
2	Linalool isobutyrate	CID 6532	-113,09	-2,80
3	Linalyl caproate	CID564550	-122,50	0,00

4	Linalyl propionate	CID61098	-104,18	-0,27
5	Linalyl O-aminobenzoate	CID23535	-128,51	-2,09
6	Linalyl isovalerate	CID240119	-116,96	-0,64
7	Linalyl cinnamate	CID5355858	-131,60	-0,51
8	Linalyl phenylacetate	CID251529	-130,70	-4,11
9	Linalyl butyrate	CID62321	-116,11	-2,76
10	Linalylbenzoate	CID31353	-124,67	0,00
11	Acetaldehyde ethyl	CID162027	-112,97	0,00
12	Linalyl valerate	CID112045	-113,45	0,00
13	Linalyl methyl ether	CID108507	-90,68	0,00
14	Linalyl octanoate	61435	-130,84	0,00
15	Linalyl formate	CID61040	-102,81	-3,34
16	Linalyl 2-methylbutyrate	CID112139	-112,84	-1,36
17	Linaloyl diphosphate	CID152192	-125,29	-9,93
18	Linalyl mercaptan	CID170239	-92,24	0 ,00
19	Ethyl linalyl acetate	CID6434672	-102,11	-2,17
20	Neohancoside A	CID131802	-178,086	-11,79
21	Linalyl 3-methylhexanoate	CID6430798	-124,42	0,00
22	6-linalyl-2-O,3 dimethylflaviolin	CID86289595	-143,56	-1,20
23	Linalyl beta-vicianoside	CID90658762	-163,53	-13,59
24	Linalyl acetoacetate	CID11791251	-112,28	-2,04
25	Linalyl chloroacetate	CID231030	-123,76	-2,54
26	Linalyl (nonanoyl)acetate	CID53716845	-161,82	-2,50
27	AC1LAXV9	CID523148	-149,07	-1,23
28	O-Nitro carbanilic acid	CID523120	-147,53	-4,61
29	SCHEMBL3161	CID21932508	-153,64	0,00
30	SCHEMB	CID10991722	-160,09	-2,5

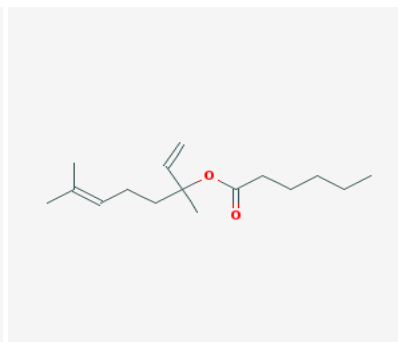
Dérivés de linalol



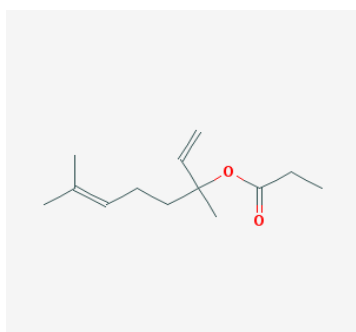
1



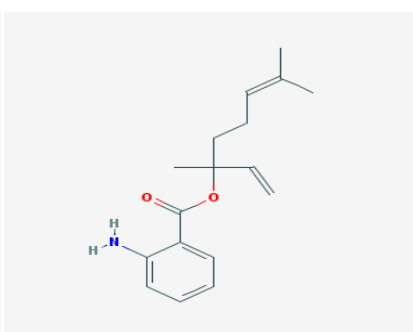
2



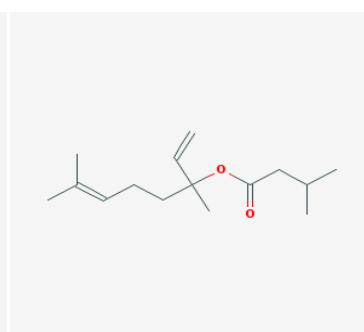
3



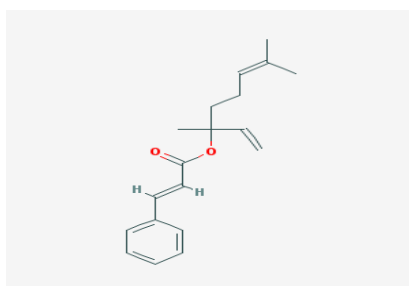
4



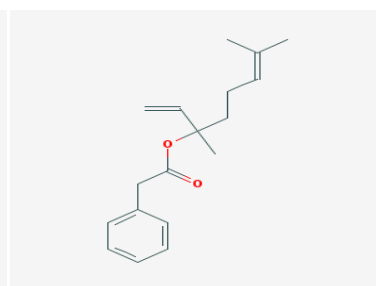
5



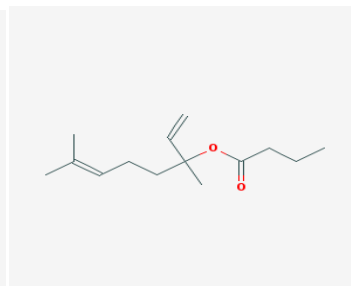
6



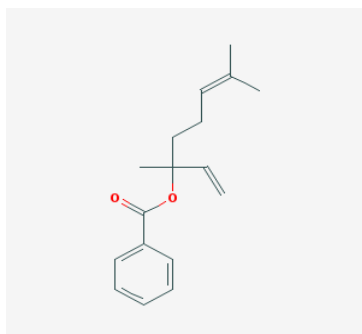
7



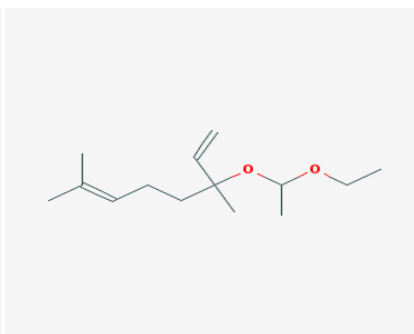
8



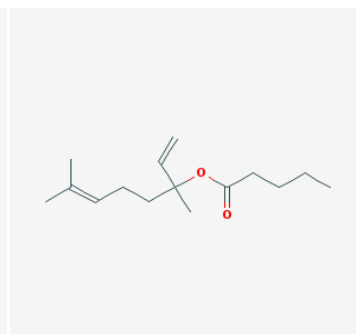
9



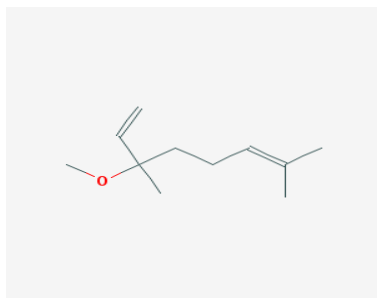
10



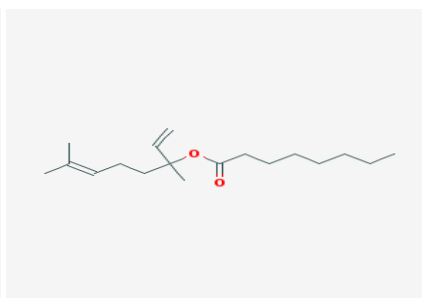
11



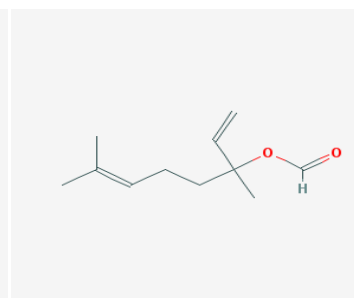
12



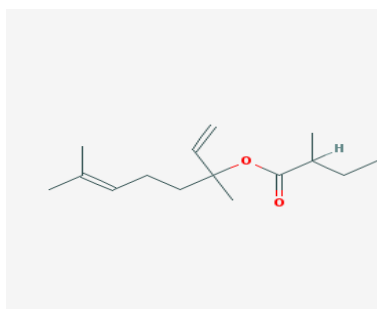
13



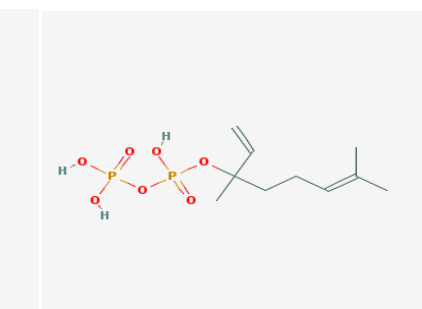
14



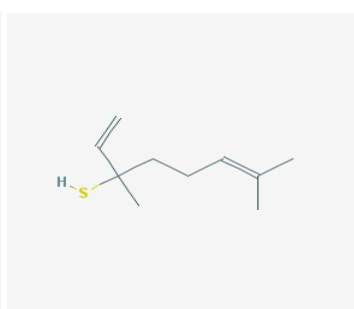
15



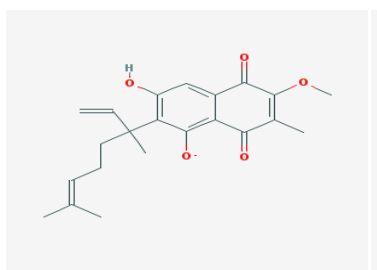
16



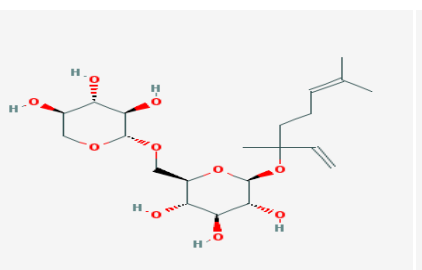
17



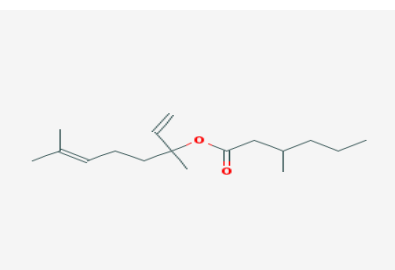
18



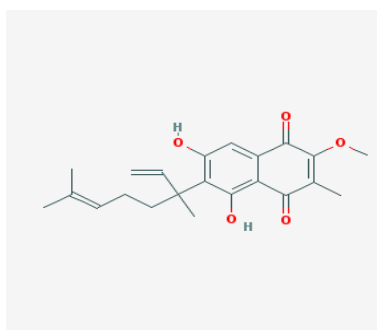
19



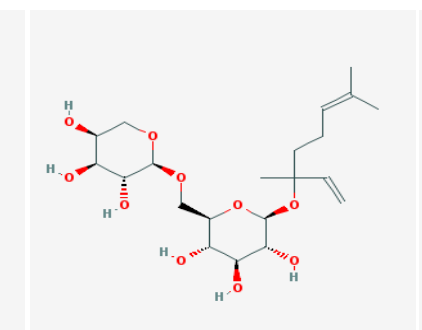
20



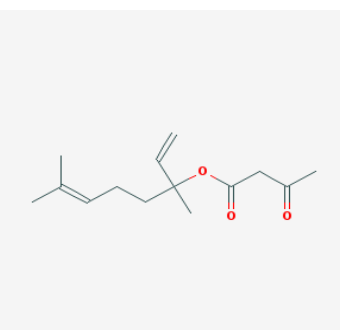
21



22



23



24

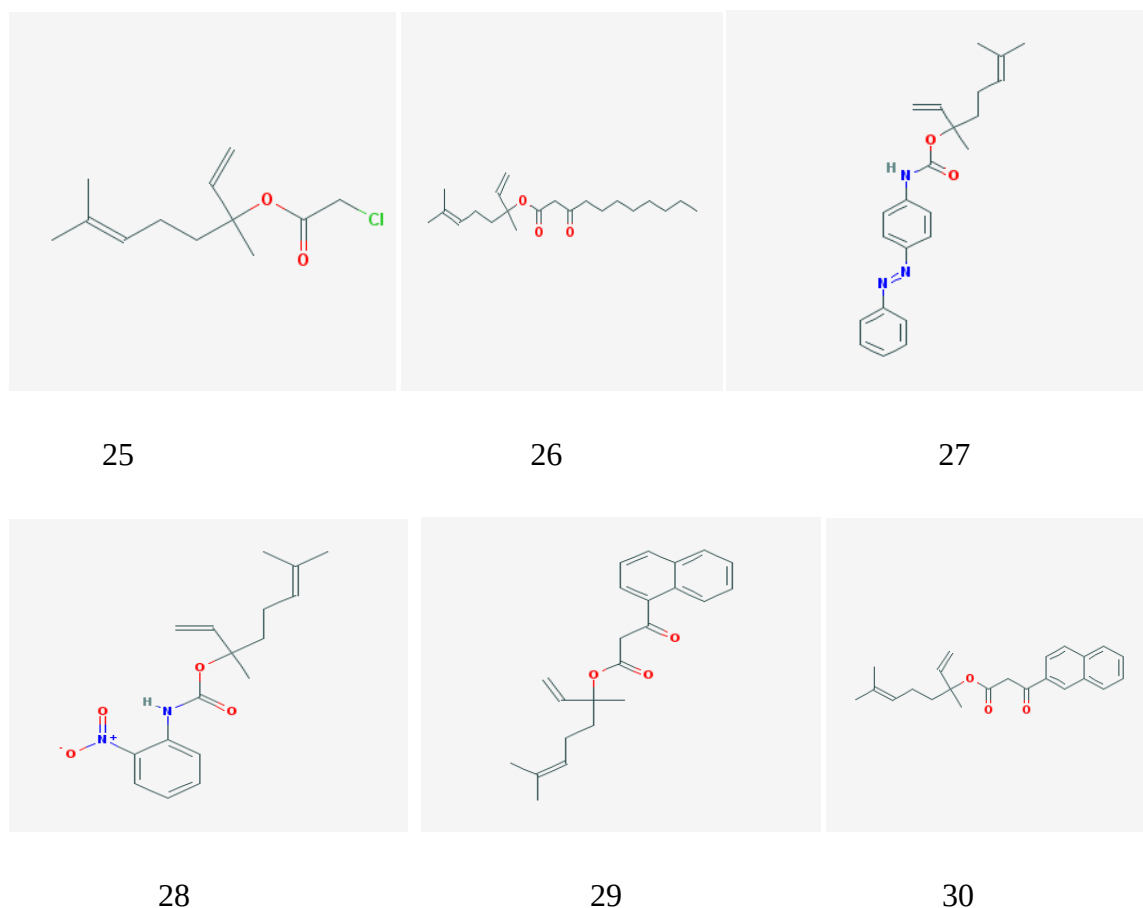


Figure (IV.40) : Structures développées des dérivés de linalol.

Les résultats du docking montrent que les trois composés : Neohancoside A, Linalyl (nonanoyl)acetate, et Linalyl beta-vicianoside avec des énergies d'interaction de $-178,086 \text{ kcal mol}^{-1}$, $-163,53 \text{ kcal mol}^{-1}$, et $-161,82 \text{ kcal mol}^{-1}$, présentent une meilleure activité inhibitrice que le linalol dont l'énergie d'interaction est égale à $96,79 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Nous remarquons à travers l'analyse du tableau 4, que le facteur d'isomérisation, c'est-à-dire le positionnement du radical, observé dans les composés : Neohancoside A, Linalyl beta-vicianoside ; SCHEMBL3161495, SCHEMBL3152988 ; et CHEBI:78588, CHEBI:82610, a un effet significatif sur la valeur d'énergie d'interaction (la stabilité d'inhibiteurs).

L'analyse visuelle du composé, présentant une meilleure énergie (Neohancoside A), montre qu'il est bien placé dans le site actif de l'AChE (figure (IV.42)). Cette énergie résulte de la mise en place de neuf liaisons hydrogène et plusieurs interactions hydrophobes.

Les longueurs et les orientations spatiales des différentes liaisons hydrogène obtenues sont résumées sur le tableau suivant :

N° d'H-Bonds	Résidus impliqué	Groupe ment du ligand	Distance Å°
1	(OH)-Ser122	OH	2,72
2	O=C-Ser81	OH	2,72
3	(OH)-Tyr334	R-O-R'	3,09
4	(OH)-Tyr121	OH	3,14
5	O=C-Trp84	OH	2,81
6	O=C-Asn85	OH	2,62
7	O=C-Asn85	OH	3,15
8	O=C-Asp72	OH	3,20
9	O=C-Tyr334	OH	3,17

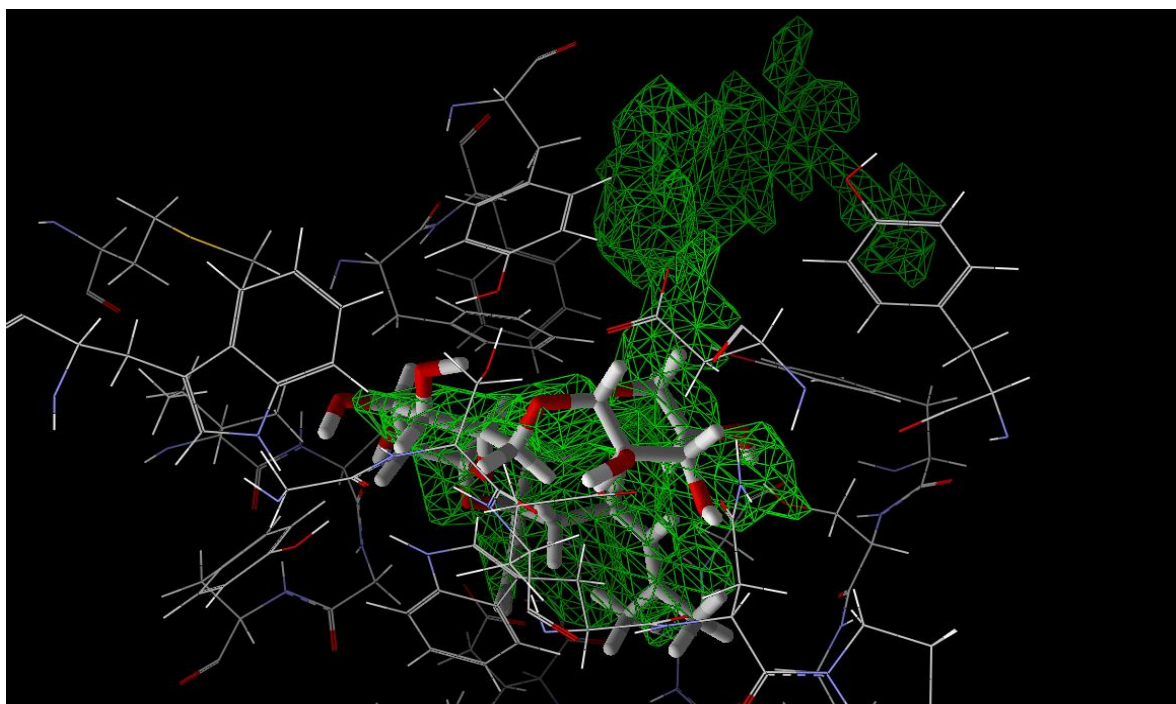


Figure (IV.41): Positionnement du Neohancoside A (coloré par type d'atomes) au sein du site actif.

Le complexe est stabilisé par plusieurs interactions hydrophobiques avec les résidus Phe330, Ile444, Leu 127, Ile439, Tyr442, Trp432, Gly118, Gly441.

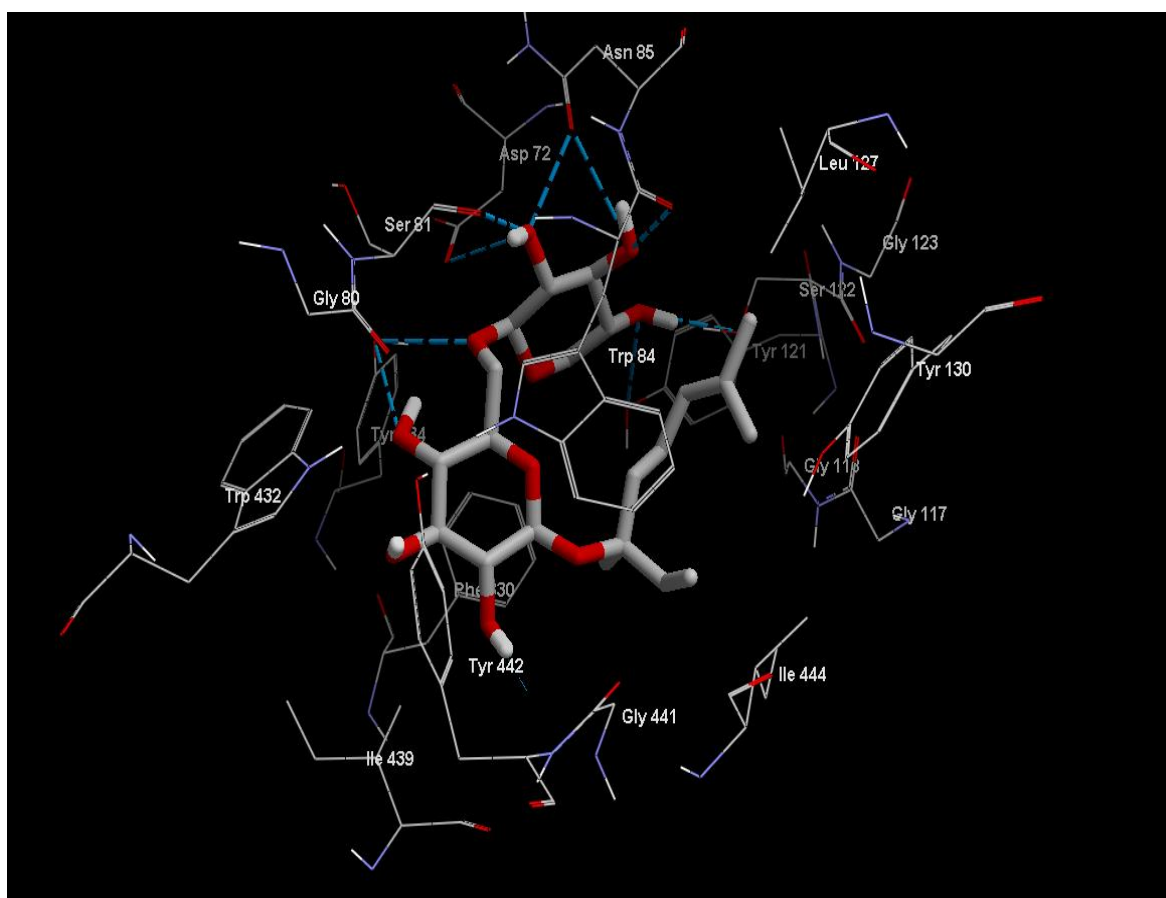


Figure (IV.42) : Représentation des interactions Neohancoside A –AChE : les liaisons hydrogène présentées par un trait bleu discontinue.

On voit également, que l'augmentation des interactions entre l'inhibiteur et les résidus principale, améliore l'activité inhibitrice (stabilité d'inhibiteur).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives:

Dans un premier temps nous avons testé la fiabilité du programme Molegro Virtuel Docker utilisé dans ce travail. Pour cela nous avons fait appel au test RMSD (root-mean-square derivation), permettant de comparer la déviation de la géométrie du ligand simulée par MVD avec celle déterminée expérimentalement qu'on retrouve dans la PDB. À ce titre, nous avons utilisé les ligands de dix complexes de la PDB portant les codes suivants : 1ACJ, 1EVE, 2ACK, 1DX6, 1U65, 1E3Q, 1OCE, 1VOT, 1ACL et 2ACE.

La valeur de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (root-mean-square deviation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal ne dépasse pas 2Å dans la plupart du complexe de l'acétylcholinestérase étudiée.

L'analyse visuelle de ces résultats montre une bonne superposition de la conformation optimale du ligand calculée par MVD et la géométrie du même ligand pris initialement de la PDB. Ce test nous a permis conclure que le programme Molegro Virtuel Docker est suffisamment performant puisqu'ils reproduisent assez bien les résultats expérimentaux. Il est généralement plus efficace en présence du ligand moins flexible.

Dans un deuxième temps, nous avons pu élucider les mécanismes d'interaction entre l'acétylcholinestérase et trois inhibiteurs connus (Tacrine, Galanthamine, Donepezil) par visualisation des différents types des interactions mis en jeu.

Dans la perspective de développer de nouveaux inhibiteurs plus affins et plus sélectifs de l'AChE, nous avons étudié le mécanisme d'inhibition mis en place par le Linalol : un inhibiteur naturel appartenant à la classe des monoterpènes.

Dans une troisième partie, nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs en

prenant comme structure de départ le linalol, L'activité inhibitrice de cette dernière a pu être améliorée grâce à une approches très utilisées dans le domaine de la conception rationnelle des médicaments : le criblage virtuel d'une collection chimiques.

Les résultats du docking montrent que les trois composés : Neohancoside A, Linalyl (nonanoyl)acetate, et Linalyl beta-vicianoside avec des énergies d'interaction de - 178,086 kcal mol⁻¹, -163,53 kcal mol⁻¹, et -161,82 kcal mol⁻¹, présentent une meilleure activité inhibitrice que le linalol dont l'énergie d'interaction est égale à 96,79 kcal mol⁻¹.

Sur la base de ces résultats préliminaires, nous envisageons d'approfondir notre étude, en faisant appel à d'autres programmes d'étude de docking et de simulation *in silico*.

Notre étude ici n'étant qu'initiale, une étude expérimentale complémentaire *in vitro* et/ou *in vivo* devra permettre de vérifier les résultats théoriques obtenus *in silico*.

Références bibliographiques

Référence introduction

- 1 :** A. Grosdidier, Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives, thèse de doctorat, université Joseph Fourier, Grenoble, 2007.
- 2 :** J. Colletier, Etude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acétylcholinestérase, thèse de doctorat, université Joseph Fourier, Grenoble, 2006.

Référence partie I

- 1 :** H.U. Bergmeyer, K. Gawekn, et al. Principe de l'analyse enzymatique. Tech. Et Doc. Lavoisier. Parie. P : 17, 1979.
- 2:** J. Pelmont, Enzymes: catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. P : 7; 621; 652–654, 1995.
- 3:** M. Drouin, Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître en sciences (M.Sc.). Canada, 2005.
- 4:** R. Patel, M. Dodia, S.P. Singh, Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp: Production and optimization. *Proc. Biochem*, 40; 3569–3575, 2005.
- 5:** M. Leisola, J. Jokela, O. Pastinen, O. Turunen, Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds, 2001.
- 6:** C. Sandhya, K.M. Nampoothiri, A. Pandey, Microbial proteases. *Methods Biotechnol*, 17; 165–179, 2005.
- 7:** T. Bertrand, les enzymes, Université Jausef Ferier, Grenoble, années universitaire 2011-2012.
- 8:** A.Robert, Copeland Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. 2000 by Wiley
- 9:** R. Benchoucha, Cour biochimie, 1er année médecine.
- 10:** H.U. Bergmeyer, K. Gawekn, Principes de l'analyse enzymatique. Tech. Et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17, 1979.
- 11:** M.B. Rao, A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 13(2); 281–294, 1998.
- 12:** A.A. Assamoi, J. Destain, P. Thonart, Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures: le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 2009
- 13:** E. A. Barnard, the Peripheral Nervous System, Plenum Press, New York, , p: 201-224, 1974.

- 14:** acétylcholine." Microsoft® Encarta® 2009 [DVD]. Microsoft Corporation, 2008.
- 15 :** C. Jacques-Philippe, Etude des relations structure-dynamique-fonction ausein de l'acetylcholinesterase, Thèse de Doctorat, université joseph fourier, Grenoble, 2007.
- 16:** G.A. Alles, Hawes RC (1940) Cholinesterases in the blood of man. J Biol Chem, 133, 375-390.
- 17 :** D.L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag et al. The alpha/beta hydrolase fold. Protein Eng, 5, 197-211, 1992.
- 18:** J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science 253, 872–879, 1991.
- 19:** D.A. Dougherty, Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. Science, 271, 163-168, 1996.
- 20:** D.M. Quinn, Acetylcholinesterase - Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition-states. Chem Rev, 87, 955-979, 1987.
- 21:** P. Taylor and Z. Radic, The cholinesterases: from genes to proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 34, 281-320, 1994.
- 22:** G. Alain, D. Bruno, françoise forette - diagnostiqué la maladie d'alzheimer sans savoir la soigner, recherche & santé. n°105. 1er trimestre p : 13, 2006.
- 23:** V. Bruno, R. Phillipe, - Traité sur la maladie d'Alzheimer, Springer France, Paris, P :428, 2013.
- 24:** B. Antoine, C. Alain, la rousse medical, la rousse/VUEF, Parie, 2003.
- 25:** S.H. Messoud, le mémoire et le cerveau, des outils naturels et alimentaire pour améliore le fonctionnement de mémoire et de cerveau, Revue Assiout, Egypte,(25), p :68, 2003.
- 26:** KRID ADEL, mémoire de MAGISTER EN CHIMIE THEORIQUE, Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant, Université Mentouri-CONSTANTINE, 2008.
- 27:** G.V. Ferrari, M.A. Canales, L.M. Weiner, I. Silman, N.C. Inestrosa, Biochemistry, 40, 10447-10457, 2001.
- 28:** L.S. Schneider, P.N. Tariot. Emerging drugs for Alzheimer's disease : mechanisms of actions and prospects for cognitive enhancing medications. Med Clin North Am; 78: 911-34, 1994.

- 29:** S.L. Rogers, L.T. Friedhoff, The efficacy and Safety of Donepezil in Patients with Alzheimer's disease: Results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Dementia*; 7: 293-303, 1996.
- 30:** L. Gustafon, Physostigmine ant tetraaminoacridine treatment of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*; 88 (suppl 149): 39-41, 1993.
- 31:** W.K. Summers, L.V. Majovski, G.M. Marsh, Oral tetrahydro aminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *N Engl J Med*; 315 : 1241-45, 1986.
- 32:** H. Blanche cotte, Tacrine, Dossier CNIMH; 16 (4): 55-83, 1995.
- 33:** Laboratoire Esai. Aricept. Dossier scientifique hospitalier.
- 34:** V. Kuman, Un nouvel inhibiteur du cholinestérase dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. *Int J Geriatr Psychopharmacology*; 1: Editoria, 1998.
- 35:** J.J. Sramek, E.J. Frackiewicz, N.R. Cutler, Exp. Opin. Invest. Drugs, 9, 2393-2402, 2000.
- 36:** P. Camps, D. Munoz-Torro, Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2, 11-25, 2002.
- 37:** M.D. Lopez, F.G. Compoy, and al., Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased monoterpenoide and pheylpropanoids in a concentration_dependent manner, *chemico_biological Interaction* 229, p36_43, 2015.
- 38:** A. Chikhi, Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase Substances antibactériennes à l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. Thèse de doctorat d'université: Biochimie appliquée. Constantine: Université Mentouri de Constantine. Algérie. p: 12 ; 90, 2007.
- 39:** M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.* 261 : 470-489, 1996.
- 40:** C.M. Apfel, H. Locher, S. Evers, B. Takács, C. Hubschwerlen, W. Pirson, Page M. G. P. and Keck W. Peptide deformylase as an antibacterial drug target: target validation and resistance development. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 : 1058-1064, 2001.
- 41:** M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, Multiple automatic base selection: protein ligand docking based on incremental construction without manual intervention. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 11 : 369-384, 1997.
- 42:** M. Rarey, S. Wefing, T. Lengauer, Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 10: 41-54, 1996.
- 43:** J.H. Holland, *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. University of Michigan Press: Ann Arbor, MI, 1975
- 44:** H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 28: 235-242, 2000.

- 45:** B. Al-Lazikani, J. Jung, Z. Xiang, B. Honig, Protein structure prediction. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 : 51-56; 2001.
- 46:** M. Vieth, J.D. Hirst, A. Kolinski, C.L. Brooks, Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.* 19: 1612-1622, 1998.
- 47:** J. Gabb, R.M. Jackson, M.J.E. Sternberg, Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. 50: Mol. Biol.* 272 : 106–120, 1997.
- 48:** P.A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Domini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D.A. Case, T.E. Cheatham, Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models *Acc. Chem. Res.* 33, 889-897, 2000.
- 49:** M. Stahl, M. Rarey, Detailed analysis of scoring functions for virtual screening *J. Med. Chem.*, 44, 1035-1042, 2001.
- 50:** A. Alban, Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Other. Universités d'Orléans. France, 2007.
- 51:** I.D. Kuntz, J.M. Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin: A geometric approach to macromolecule ligand interactions *J. Mol. Bio.*, 161, 269-288, 1982.
- 52:** D.A. Case, D.A. Pearlman, J.W. Caldwell, T.E. Cheatham; J. Wang; W.S. Ross, C.L. Simmering; Darder.
- 53:** G. Jones, P. Willett, R.-C. Glen, A.-R. Leach, R. Taylor: Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking *J. Mol. Biol*, 267, 727-748, 1997.
- 54:** H.-J. Böhm: 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.*, 8, 243-256, 1994.
- 55:** M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, R.P. Mee: Empirical scoring functions: The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 11, 425-445, 1997.
- 56:** A.R. Leach, I.D. Kuntz, Conformational analysis of flexible ligands in macromolecular receptor sites. *J. Comput. Chem.* 13 : 730-748, 1992.
- 57:** H.J. Böhm, LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 6 : 593-606, 1992.

- 58:** H.J. Böhm, 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.*, 8 (3) : 243-256, 1994.
- 59:** E. Thiriot, Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. Thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. p 291, 2009.
- 60:** G. Jones, P. Willett, and R.C. Glen, A. R. Leach, and R.Taylor, *ibid*, 267, 727-748, 1997.
- 61:** J. M. Yang, and C. Y.Kao, *J. Comput. Chem.*, 21, 988-998, 2000.

Référence partie II

- 1 :** D. K. Gehlhaar, G. Verkhivker, P. A. Rejto, D. B. Fogel, L. J. Fogel, S.T. Freer, Docking Conformationally Flexible Small Molecules Into a Protein Binding Site Through Evolutionary Programming. *Proceedings of the Fourth International Conference on Evolutionary Programming*, 615-627, 1995.
- 2:** J-M. Yang, Chen, C-C. GEMDOCK: A Generic Evolutionary Method for Molecular Docking. *Proteins*, 55, 288-304, 2004.
- 3:** M. Vieth, JD. Hirst, A. Kolinski, CL. Brooks, Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.* 19 : 1612-1622, 1998.
- 4:** J. Gabb, R.M. Jackson, M.J.E. Sternberg . Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* 272 : 106–120, 1997.
- 5:** Q. A. Jockey, A. L. Josélia, C P. Angelo, B .A. Ricardo, G. A. Magaly, Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Model* 17:1401–1412, 2011.
- 6:** E.Judith, Criblage virtuel de protéines à visée thérapeutique, thèse de doctorat, l'université de bordeaux 1, bordeaux, 2011.
- 7 :** C. Natalie, A. Rafael, H.O. Edison, A. Fernando, B. Strahil, O. Edison, Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 102: 222–228, 2015.
- 8:** V. Marie, P.Cobra, V. Jérôme, P. Stéphanie, Y. Yavuz, J. Alexandre, S. Ahmad, M. Dominique, Jean-M. K., Flow-through enzyme immobilized amperometric detector for the

rapid screening of acetylcholinesterase inhibitors by flowinjection analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102: 267–275, 2015.

9: D.L. María, J.C. Francisco, J.P-V. María, M-D. Encarnación, J.V. Cecilio, Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner, *Chemico-Biological Interactions* 229: 36–43, 2015.

10: M.D. López, M.J. Pascual-Villalobos ., Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implicationsfor pest control, *Industrial Crops and Products* 31: 284–288, 2010.