



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie moléculaire et santé

Intitulé :

*INHIBITION DE LA BETA-SECRETASE 1, ENZYME CLEF DE LA
MALADIE D'ALZHEIMER, PAR LA METHODE DU DOCKING
MOLECULAIRE.*

Présenté et soutenu par :

Le : 15/06/2015

CHAIB ESMA

GUEMMOUR SELMA

Jury d'évaluation

Président : BENSEGUENI A. Professeur à Université des Frères Mentouri Constantine.

Rapporteur : CHIKHI A Professeur à Université des Frères Mentouri Constantine.

Examineur : MOKRANI E .H. Maître assistant A à Université des Frères Mentouri

Constantine.

Année universitair

2014 – 2015

Remerciements

AVANT TOUT, NOUS REMERCIONS ALLAH QUI NOUS A DONNÉ LA FORCE ET LA PUISSANCE POUR RÉALISER ET ACHEVER CE TRAVAIL DANS DES BONNES CONDITIONS. NOS REMERCIEMENTS LES PLUS CHALEUREUX ET LES PLUS VIFS S'ADRESSENT D'ABORD À NOTRE PROMOTEUR, MONSIEUR **CHIKHI A.** PROFESSEUR À L'UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1, D'AVOIR ACCEPTÉ DE NOUS ENCADRER, POUR SON ENTIÈRE DISPONIBILITÉ AINSI QUE SON AIDE, SES ORIENTATIONS ET CONSEILS. NOUS TENONS À REMERCIER AUSSI MONSIEUR **BENSEGUENI A** PROFESSEUR À L'UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1 DE NOUS AVOIR CONSACRÉ DE SON TEMPS ET NOUS FAIRE L'HONNEUR DE PRÉSIDER LE JURÝ NOS REMERCIEMENTS VONT AUSSI À MONSIEUR **MOKRANI E .H** MAÎTRE ASSISTANT À L'UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1. POUR AVOIR ACCEPTÉ DE JUGER CE TRAVAIL. NOUS REMERCIONS ÉGALEMENT, TRÈS SINCÈREMENT NOS ENSEIGNANTS POUR LEUR SOUTIEN ET LEUR DÉVOUEMENT DURANT TOUTES NOS ANNÉES D'ÉTUDE.

NOUS TÉMOIGNONS NOTRE RECONNAISSANCE À TOUTE PERSONNE AYANT CONTRIBUÉ DE PRÈS OU DE LOIN À LA RÉALISATION DE NOTRE MÉMOIRE.

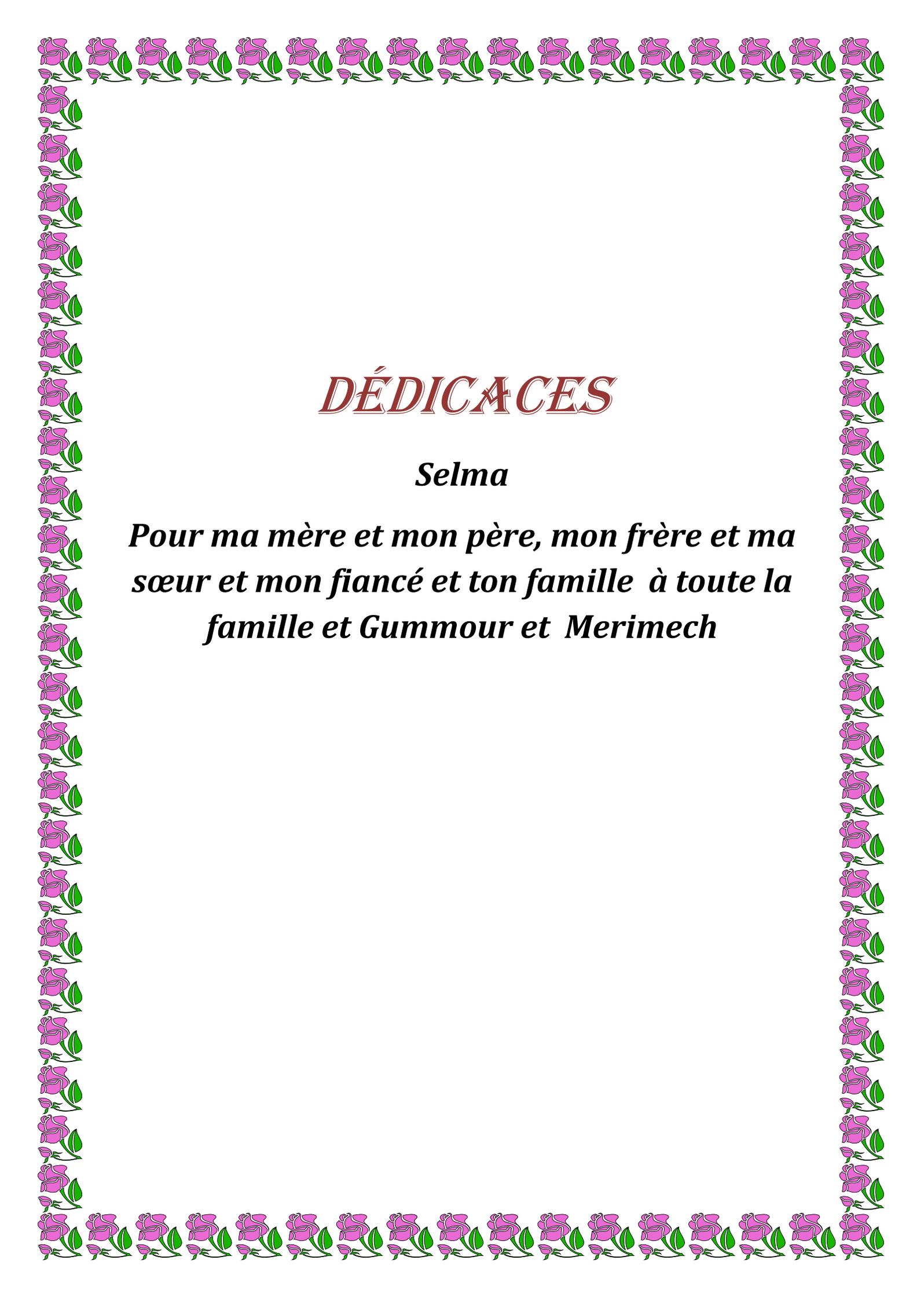
DÉDICACES

ESMA

Je Dédie ce mémoire à mes chers parent, a qui je dois beaucoup .D'amour et respect ; que dieu me les gardes.

Et très particulièrement, ma très chère sœur Ibtišem.

Et à tous mes collègues de la promotion 2014/2015 de Master BMS.



DÉDICACES

Selma

*Pour ma mère et mon père, mon frère et ma
sœur et mon fiancé et ton famille à toute la
famille et Gummour et Merimech*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

CHAPITRE 1 : Revue bibliographique

1. Historique	3
2. Définition.....	3
2.1. Les plaques amyloïdes (ou plaques séniles)	4
2.2. Les dégénérescences neurofibrillaires	5
3. Les différentes formes de la Maladie D'Alzheimer.....	5
3.1 .La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer	5
3.2. La forme familiale de la maladie d'Alzheimer	5
4. Les différents stades de la maladie	6
5. Causes de la maladie d'Alzheimer.....	6
6. Les Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer	7
7. Les symptômes	7
8. Evolution de la maladie d'Alzheimer.....	8
9. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer	8
10. Mécanismes pathologiques	9

L'enzyme BACE1

1. généralité	9
2. Définition de BACE1.....	11
3. La Structure et le caractère de bêta sécrétase	11
4. La Réaction de l'enzyme BACE1.....	12

CHAPITRE 2:LE DOCKING MOLECULAIRE

1/Introduction	14
2/DEFINITION DE DOCKING MOLECULAIRE.....	14
3/PRINCIPE DE DOCKING	14

4. PRINCIPE THEORIQUE	15
5. APPLICATIONS.....	15
6. CRIBLAGE PAR DOCKING à HAUT DEBIT	16
7. LES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND.....	17
7.1. Les interactions entre le ligand et le récepteur.....	17
7.2. Les composantes de l'énergie libre	18

CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL	19
1.1. Microordinateur.....	19
1.2. Programmes.....	19
1.3. La banque de données protéiques (PDB).....	19
2. METHODES	19
2.1. Le protocole d'utilisation des logiciels.....	19
2.1.1. Surflex	19
2.1.2. Le logiciel MSViewer.....	20
2.2. Le test de fiabilité du logiciel Surflex	20
2.2.1. RMSD (root mean square deviation).....	20
2.2.2. Coefficient de corrélation	21
3. INHIBITION DE L'ENZYME DU COMPLEXE 2OHL.....	21
3.1. Choix du complexe 2OHL	21
3.2. Calcul des interactions « enzyme- composés substitués »	22
3.2.1. Les mono-substitutions	22
3.2.2. Les bi-substitutions.....	23
3.2.3. Les Similaires.....	23
3.3. La visualisation des liaisons hydrogènes établies entre le ligand et les acides aminés du site actif	24

CHAPITRE 4 : RESULTAT ET DISCUSSION

1. TESTS DE FIABILITE DES PROGRAMMES DE DOCKING.....	25
1.1. Le test RMSD	25
1.2. Visualisation des molécules superposées.....	26

1.3. Le coefficient de corrélation (r)	26
2. ETUDE ET PROPOSITION DE NOUVELLES MOLECULE	
BIOACTIVES.....	28
2.1. Mono-substitution	28
2.2. Bi-substitution.....	30
2.3. Les similaire	30
3. ETUDE DES INTERACTIONS DES COMPLEXES BACE1 DERIVES SUBSTITUE.....	32
CONCLUSION	33
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
RESUMES	

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau N°01</u> : Les principaux programmes de docking moléculaire.....	16
<u>Tableau N°02</u> : Les mono-substitutions du 2-amino-quinolin.....	22
<u>Tableau N° 03</u> : Les bi-substitutions du 2-amino-quinoline	23
<u>Tableau N°04</u> : Résultats de l'analyse par régression linéaire.....	27
<u>Tableau N° 05</u> : L'affinité de 2-amino-quinoline	28
<u>Tableau N° 06</u> : Les affinités des meilleurs composés mono - substitution.....	29
<u>Tableau N° 07</u> : Les affinités des meilleurs composés bi – substitution.....	30
<u>Tableau N° 08</u> : Les propriétés pharmaceutiques de mono et bi-substitution ; similaire.....	31

LISTE DES FIGURES

<u>Figure N° 01</u> : comparaison d'un cerveau normal âgé (gauche) et du cerveau d'un patient atteint d'une maladie d'Alzheimer (droite).....	3
<u>Figure N° 02</u> : Les lésions de la maladie d'Alzheimer.....	4
<u>Figure N° 03</u> : Composition d'une synapse.....	6
<u>Figure N°04</u> : Neurone.....	8
<u>Figure N°05</u> : Régions du cerveau.....	9
<u>Figure06</u> : Structure tridimensionnelle de BACE1 (Protein Data Bank).....	12
<u>Figure N°07</u> : Principe d'essai.....	13
<u>Figure N°08</u> : La liaison Hydrogène.....	18
<u>Figure N°10</u> : Structure du 2-amino-quinoline.....	22
<u>Figure N°11</u> : Superposition de l'inhibiteur (coloré en rose) et final-0 calculé par Surfex (Coloré en bleu) du complexe 2OHL (RMSD=0,983Å).....	26
<u>Figure N°12</u> : Corrélation entre l'activité biologique (pIC50) des différents complexes (33) et leurs Affinités données par Surfex.....	28
<u>Figure N°13</u> : Les meilleurs Mono - substitué (composé 12, 14,15).....	29
<u>Figure N°14</u> : Les 2 meilleurs Bi - substitué (composé 33 ,34).....	30
<u>Figure N°15</u> : Le meilleur Similaire (6,8-difluoroquinolin-2-amine).....	31
<u>Figure N°16</u> : Interaction entre composé 33 et l'enzyme BACE1... ..	32

LISTE DES GRAPHES

Grphe N°01: Résultats en % obtenus par Surfex à *deux* intervalles de RMSD (Å).....25

LISTE DES ABREVIATIONS

3D: Trois dimensions.

Å: Angström.

AB: Amyloïde beta.

ADME/Tox : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et de Toxicité.

APP : Amyloïde Protéine Précurseur.

APPB : Amyloid B Precursor Protein.

2AQ : 2- Amino-Quinoline.

BACE1: Beta-Sécrétase 1.

C99: Fragment C99 (Possédant 99 acide amines) de l'ABPP.

C59 : Fragment C59 (Possédant 59 acide amines) de l'ABPP.

EMBO: European Molecular Biology Organization.

FAD: Flavine adénine dinucléotide.

IC50: Inhibitory Concentration 50.

génés PS1 : presenile-1.

génés PS2 : presenile-2.

logP : Le coefficient de partition Eau/Octanol.

MA : Maladie Alzheimer.

PDB: Protein Data Bank.

PET : la Tomographie à émission de Position.

PH : potentiel hydrogène.

r : Coefficient de corrélation linéaire.

RMSD: Root Mean Square Deviation.

RTN3: Reticulon 3.

RTN4: Reticulon 4.

SPECT: Single Photon émission Computed Tomography.

génés PS1 : presenile-1.

génés PS2 : presenile-2.

Introduction

Introduction

L'étude proposée concerne une maladie neurodégénérative irréversible, la maladie d'Alzheimer, qui affecte approximativement 15 millions d'individus à travers le monde on connaît la maladie d'Alzheimer depuis plus de 100 ans [1].

C'est une maladie qui fait peur. En effet, les personnes qui en souffrent ont de plus en plus de problèmes dans leur vie quotidienne. Avec le temps, elles finissent par ne plus pouvoir rien faire par elles-mêmes. Ces deux caractéristiques se manifestent sous forme de plaque sénile extracellulaire, qui se compose majoritairement d'un fragment de 42 acide aminés, β -amyloïde, et d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires causée par l'hyper phosphorylation de la protéine tau, [2]. L'ensemble de ces effets sur le cerveau causent une mort neuronale systématique massive [3]. Entraînant l'apparition progressive chez les patients de symptômes touchant la mémoire, le comportement, la parole, le mouvement.

l'importance du processus de glycosylation ou modification des protéines par les sucres est mise en avant avec cette recherche du Riken Institute. L'étude révèle comment les symptômes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer peuvent être réduits lorsque l'on empêche les sucres de se lier à l'une des enzymes clés impliquées dans la maladie, la « BACE1 ». Ces conclusions, présentées dans la revue EMBO Moléculaire Médecine révèlent ainsi l'opportunité de cibler cette liaison sucres-BACE1 pour réduire la formation de plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie.

L'enzyme BACE1 est un facteur essentiel conduisant à la formation de plaques β -amyloïde dans le cerveau. Cette formation intervient lorsque la molécule protéine précurseur de l'amyloïde (APP) est anormalement coupée par l'enzyme BACE1. Pour cette raison, de nombreuses recherches visant le développement de médicaments pour traiter la maladie tentent d'empêcher BACE1 de cliver APP. Mais y parvenir sans perturber les processus vitaux, réglementés par BACE1, dans le cerveau et le corps, reste un véritable défi [4].

La recherche en biologie ne peut, actuellement, se passer des outils informatiques pour traiter le flot de données produites et optimiser ses avancées. L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus précisément l'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo-saxon docking). L'emploi initial du docking moléculaire a été de prédire et reproduire des complexes protéine-ligand. Les succès dans ce domaine et l'essor des techniques de chimie combinatoire ainsi que l'exploitation systématique de la diversité chimique provenant d'autres cibles ont élargi son utilisation à l'optimisation de molécules et au criblage de bases de données.

Ainsi cette méthode, permettant de cribler des milliers de composés sur une protéine cible, est couramment utilisée en pharmacochimie pour l'obtention de nouveaux médicaments. Une telle approche serait difficilement réalisable en biologie traditionnelle où le récepteur est classiquement une protéine ou un oligomère de protéine et le ligand est une petite molécule.

L'objectif du présent travail est de développer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de la BACE1 en testant l'activité inhibitrice de quelques composés mono-substitués, bi-substitués et de similaires de la 2-amino-quinoline, inhibiteur naturel de l'enzyme par la méthode *in silico*. Au préalable, cependant, un test de fiabilité du logiciel de docking moléculaire est nécessaire.

Les résultats de cette étude aideront, probablement, au développement d'un nouvel outil thérapeutique efficace dans la lutte contre la maladie d'Alzheimer.

La démarche choisie pour la présentation de ce travail est la suivante :

- Une partie bibliographique regroupant l'essentiel des connaissances théoriques en rapport avec notre thème et qui comporte deux chapitres : le premier traitant des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et de l'enzyme BACE1 qui est un facteur jouant un rôle essentiel dans la formation de plaques β -amyloïdes dans le cerveau et le deuxième concerne une nouvelle méthode de recherche qui est le docking moléculaire, son principe ainsi que la notion de score.
- Une partie pratique, elle-même divisée en deux : une partie consacrée au matériel utilisé dans notre travail et la méthode suivie ; une deuxième qui traite des résultats obtenus et les interprétations qui en découlent.

Chapitre 1:

Revue Bibliographique

1. Historique

Alois Alzheimer est un médecin psychiatre allemand. Il est originaire d'une petite ville de Bavière et fait ses études médicales à Berlin, Würzburg et Francfort.

En ce temps-là, un état de démence du sujet âgé est considéré par la grande majorité des psychiatres comme normale, lié à l'usure normale du temps, à la trop fameuse artériosclérose.

C'est dans l'un des meilleurs laboratoires du moment, où étaient appliquées les techniques de coloration à l'aniline, découverte de la chimie allemande, et les imprégnations argentiques des alchimistes italiens et espagnols, qu'il s'initie à l'étude microscopique du cerveau, alors à ses débuts, aux côtés d'un des grands fondateurs de cette discipline, Franz Nissl [5,6].

2. Définition

La maladie d'Alzheimer, est un type de démence – une maladie du cerveau qui diminue la capacité d'une personne de vaquer à ses occupations quotidiennes. Elle touche la mémoire, les émotions, l'humeur, le comportement et le langage. Cette maladie, qui est la plus commune parmi un groupe important de maladies appelées « troubles cognitifs », cause la détérioration de la faculté de penser et à la mémoire. Cette maladie apparaît plus fréquemment chez les personnes âgées, mais elle n'est pas une conséquence normale du vieillissement [7].

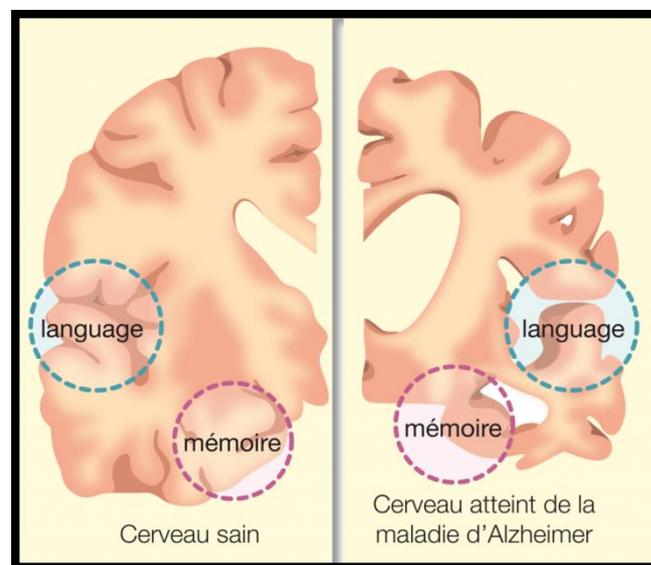


Figure01 : comparaison d'un cerveau normal âgé (gauche) et du cerveau d'un patient atteint d'une maladie d'Alzheimer (droite).

Le fonctionnement du cerveau La maladie d'Alzheimer attaque le cerveau. Il faut donc savoir comment ce dernier fonctionne afin de comprendre cette maladie .

Le cerveau du patient atteint de la maladie d'Alzheimer présente deux types de lésions :

- Les plaques amyloïdes.
- Les dégénérescences neurofibrillaires.

2.1. Les plaques amyloïdes (ou plaques séniles)

Il s'agit 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, normalement de 40 acides aminés, provient d'un mauvais clivage de la Protéine APP (Amyloïde Protéine Précurseur). Ceci participerait à l'entrée massive de calcium dans le neurone et activerait la microglie (réaction inflammatoire), ce qui entraîne la mort inéluctable du neurone par nécrose ou par apoptose. Ces plaques sont essentiellement localisées dans le néocortex et l'hippocampe.

Plusieurs stratégies de thérapies sont envisagées en recherche, comme la création d'un vaccin Anti-peptide $A\beta$, l'augmentation de l'activité de l'enzyme impliquée dans le clivage physiologique de la protéine APP, ou encore la diminution de l'activité de la β -sécrétase, à l'origine de la libération des peptides $A\beta$. Le codage des protéines obéit à des mécanismes biochimiques et moléculaires complexes, à dessin d'assumer des fonctions normales de vie ou de mort (apoptose) de nos cellules.

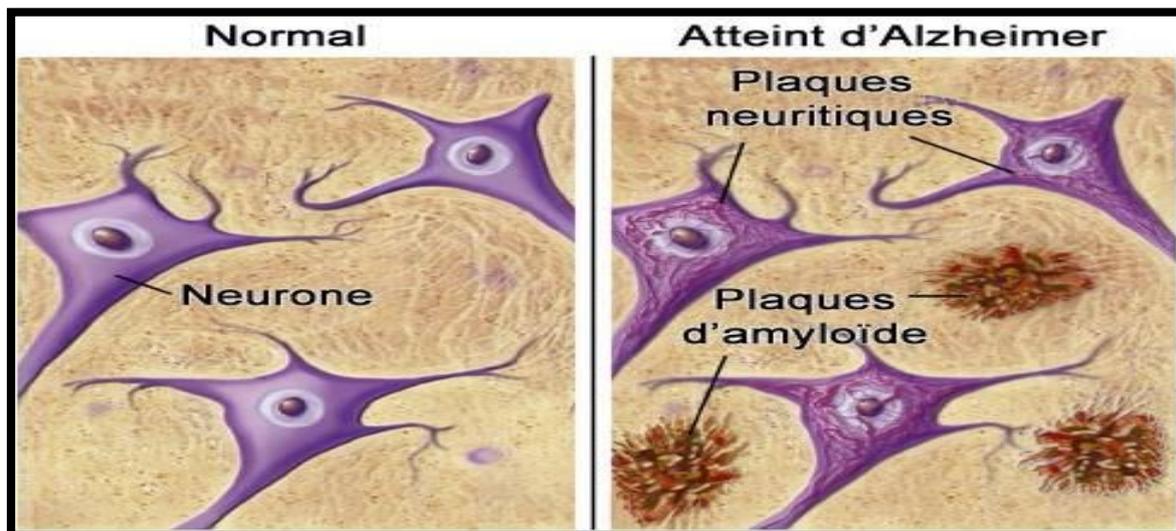


Figure02 : Les lésions de la maladie d'Alzheimer.

Les dégénérescences neurofibrillaires se caractérisent par des "ordelettes" de protéines tau à l'intérieur des neurones, et les plaques séniles par des dépôts d'amyloïdes- β qui apparaissent sous la forme de " pastilles " situées entre les cellules.

2.2. Les dégénérescences neurofibrillaires

Il s'agit de lésions cellulaires secondaires à l'accumulation de la protéine tau (protéine d'association aux microtubules qui font partie du cytosquelette) hyper phosphorylées, responsable de la formation de filaments appariés. Lorsque la protéine tau est hyper phosphorylée, elle va se conformer en paire de filaments hélicoïdaux, puis s'agréger pour former les neurodégénérescences fibrillaires. Les substances nécessaires au bon fonctionnement du neurone ne pourront donc plus être acheminées jusqu'au corps cellulaire et le neurone va mourir mourir [8].

➤ Remarque

La protéine tau, comme toutes les autres est codée par nos gènes et tout être humain fabrique de la protéine tau qui est normalement non pathogène. Le gène codant la protéine tau est situé sur le chromosome 17. La protéine tau est une protéine fortement exprimée dans les neurones et se situe principalement dans les axones.

Elle est associée aux microtubules et interagit avec les microtubules via des domaines spécifiques de liaison aux microtubules et favorise leur assemblage et leur stabilité. L'interaction de la protéine tau avec les microtubules est régulée par phosphorylation. Tau est une phosphoprotéine qui contient environ 80 sites potentiels de phosphorylation [9].

3. Les Différentes formes de la Maladie d'Alzheimer

Il existe deux formes de la maladie d'Alzheimer

-La forme sporadique de la maladie d'Alzheimer : est la forme la plus courante (plus de 95% des cas) et elle touche principalement les personnes âgées de plus de 65 ans.

-La forme familiale de la maladie d'Alzheimer : est une forme d'origine génétique d'apparition plus précoce (avant l'âge de 60 ans). Ces formes particulièrement sévères (appelées formes autosomiques dominantes) restent rares et représentent moins de 5% des cas. Elles sont dues à des mutations identifiées sur le gène de l'APP (qui code la protéine dont est issu l'A β) et sur les gènes PS1 et PS2 (qui codent les enzymes nécessaires à la production de l'A β) [10].

4. Les différents stades de la maladie

L'évolution de la maladie d'Alzheimer suit généralement certaines étapes, ou stades, qui entraîneront des changements dans la vie des personnes atteintes et celle de leur famille. Parce que la maladie affecte chaque personne différemment, les symptômes, l'ordre de leur apparition et la durée de chacun des stades de la maladie varient selon les personnes. Dans la plupart des

cas, la maladie d'Alzheimer progresse lentement. Les symptômes peuvent chevaucher plus d'un stade et en estomper les limites) [11].

Pour en savoir plus:

- *Le stade léger*
- *Le stade modéré*
- *Le stade avancé*
- *La fin de vie*

5. Causes de la maladie d'Alzheimer

Elles demeurent inconnues. De nombreuses théories ont été formulées, mais aucune d'entre elles n'est pleinement satisfaisante ou complètement vérifiée.

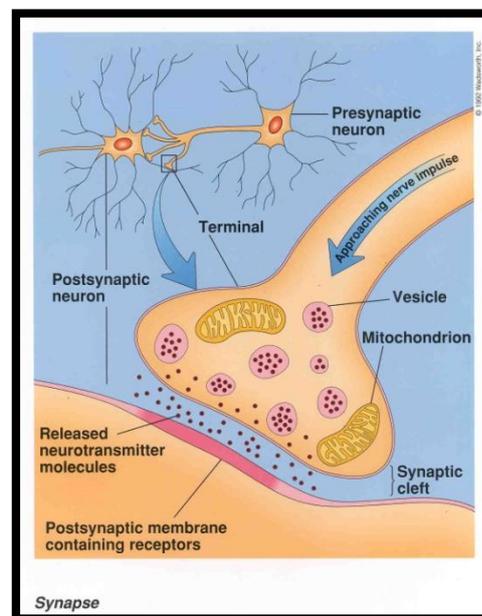


Figure03: Composition d'une synapse.

L'hypothèse neurochimique repose sur une diminution des taux d'une enzyme, la choline - acétyl -transférase, dans différentes zones du cerveau (cortex et hippocampe). Ce déficit entraînerait une diminution de l'acétylcholine, un neurotransmetteur (substance chimique assurant la transmission de l'influx nerveux), mais il n'explique pas la dégénérescence nerveuse.

L'hypothèse génétique repose sur des études épidémiologiques révélant l'existence d'antécédents familiaux de la maladie chez 15 % des sujets atteints (→ maladie héréditaire). Dans ces familles, on constate également une augmentation de la probabilité de naissance d'un enfant trisomique 21, sans que l'on ait déterminé les raisons de cette association.

L'hypothèse virale est soulevée par analogie avec la maladie de Creutzfeldt-Jakob, une maladie cérébrale rare atteignant les personnes âgées. Toutefois, s'il existe un agent infectieux responsable de la maladie d'Alzheimer, il aurait besoin d'un certain contexte génétique, immunitaire ou toxique pour s'exprimer.

L'hypothèse immunologique repose sur la diminution globale du nombre de lymphocytes circulants et la présence accrue d'auto anticorps. Toutefois, ces perturbations sont fréquentes avec l'âge en dehors de toute démence.

L'hypothèse vasculaire et métabolique est étayée par une réduction du débit sanguin cérébral, de l'oxygénation du sang et de sa capacité à capter le glucose. Cependant, ces déficits peuvent être la conséquence et non la cause de la détérioration cérébrale.

L'hypothèse toxique repose sur l'augmentation des taux d'aluminium dans le cerveau. Mais des concentrations 5 fois supérieures chez les dialysés ne produisent pas de dégénérescence nerveuse.

L'hypothèse des radicaux libres repose sur le fait que le vieillissement est dû, en partie, aux effets destructeurs de ceux-ci. Elle fait actuellement l'objet de nombreuses recherches [12].

6. Les Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

A ce jour, les causes précises de la maladie d'Alzheimer n'ont pas encore été identifiées. Malgré tout, il existe des facteurs à risques qui peuvent être plus ou moins liés au déclenchement d'Alzheimer, l'âge étant bien sûr le plus gros facteur à risque du développement de la maladie, et malheureusement celui contre lequel on ne peut rien [13].

- *L'âge.*
- *Les antécédents familiaux.*
- *Le sexe.*
- *Le style de vie.*
- *Les maladies cardiovasculaires.*
- *Le diabète.*
- *L'état émotionnel.*
- *Les blessures à la tête.*
- *Le niveau d'activité intellectuelle.*
- *le syndrome de Down (trisomie 21).*

7. Les symptômes

Sont :

1. Pertes de mémoire qui nuisent aux activités quotidiennes de la personne.
2. Difficultés à exécuter des tâches familières.

3. Problèmes de langage.
4. Perte de l'orientation (temps et espace).
5. Jugement amoindri.
6. Difficultés à exécuter une tâche abstraite.
7. Objets égaré.
8. Changements d'humeur ou de comportement.
9. Changements dans la personnalité.
10. Perte d'intérêt [14].

8. Evolution de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer évolue de manière lente, sournoise et insidieuse pendant 8 à 10 ans. Perte d'autonomie, dépendance et hospitalisations accompagnent le quotidien des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer

L'évolution de la maladie d'Alzheimer est très progressive. Dans la phase la plus avancée, le malade a perdu toute autonomie et doit être assisté dans tous les actes de la vie quotidienne tels que marcher, se lever, manger ou faire sa toilette. Une incontinence totale est souvent inévitable [15].

9. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

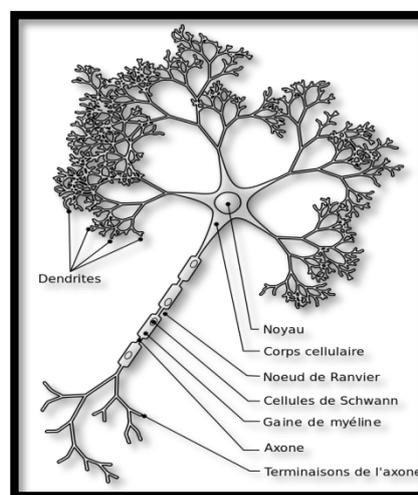


Figure04 : Neurone

C'est souvent à un stade avancé de la maladie d'Alzheimer que les patients consultent pour la première fois leur médecin et que leur entourage commence réellement à s'inquiéter. À l'examen, le médecin détecte d'importants troubles de la mémoire avec, notamment, l'oubli quasi immédiat d'une consigne ou de l'idée que le patient voulait exprimer s'il interrompt sa phrase. Des tests psychologiques font apparaître une diminution des capacités intellectuelles. Pour optimiser la prise en charge, il est important de faire le diagnostic le plus précocement

possible, c'est-à-dire au stade de « déclin cognitif lié à l'âge » ou « mild cognitive impairment » (MCI des Anglo-Saxons). Il s'agit alors, à l'aide d'examen complémentaires (tests psychométriques, techniques d'imagerie, biologie) d'identifier les patients susceptibles d'évoluer vers une maladie d'Alzheimer [16 ; 17]

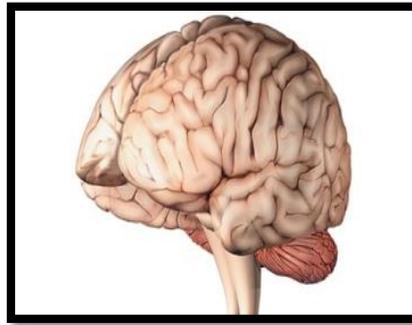


Figure05 : Régions du cerveau.

En l'absence de marqueur biologique ou radiologique de la maladie d'Alzheimer (des marqueurs du liquide cébrospinal et peut-être sériques pourront dans un avenir proche faire poser un diagnostic précoce), le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments. Il faut avant tout s'assurer que le patient n'est pas atteint d'une affection donnant des symptômes proches de ceux de la maladie d'Alzheimer : hypothyroïdie, syphilis, anémie de Biermer, déficit en vitamine B12 ou en folates, tumeur cérébrale, hématome sous-dural ou lésions vasculaires cérébrales, hydrocéphalie à pression normale. Le scanner et l'imagerie par résonance magnétique (I.R.M.) montrent une atrophie cérébrale. Si celle-ci n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer (elle s'observe chez nombre de sujets normaux), son aggravation entre deux scanners successifs et sa prédominance dans la zone pariéto-occipitale ont une certaine valeur diagnostique. Il en est de même pour l'atrophie précoce de l'hippocampe.) [18].

Les caméras à émission mono photonique (SPECT) ou à positons (PET) peuvent aider à établir le diagnostic ou à suivre l'effet de certains médicaments. Mais seule l'étude au microscope d'un fragment de cortex cérébral prélevé chirurgicalement peut apporter une certitude. De telles biopsies ne sont pratiquées que très exceptionnellement. L'I.R.M. fonctionnelle aide à mieux localiser les zones cérébrales atteintes, et à en suivre l'évolution, notamment en réponse aux traitements. Le diagnostic précoce conduit à traiter rapidement le malade afin de ralentir l'évolution déficitaire de la maladie [19].

10. Mécanismes pathologiques

Lors de la maladie d'Alzheimer, le cerveau du patient est victime d'un double processus de dégénérescence et d'inflammation. Il est caractérisé par deux types de lésions, chacune causée par une accumulation de protéines qui entraîne un dysfonctionnement de la cellule. Les

progressions différentes de ces deux types de lésion participent à une lésion plus globale du cerveau [20,21].

- au niveau extracellulaire, l'accumulation du peptide β -amyloïde provoque des plaques amyloïdes .
- au niveau intracellulaire, l'accumulation de protéine Tau s'appelle neurofibrilles.

En fonction de ces différentes possibilités, plusieurs traitements ont déjà été expérimentés. Mais comme on peut le voir, ces traitements se sont basés sur les plaques amyloïdes et non sur l'aspect qui fait référence à la protéine tau. Les recherches se fondent donc seulement sur un des deux aspects de la maladie explicités dans la section mécanismes [22].

L'enzyme BACE1

1. généralité

La β -sécrétase suscite un intérêt particulier puisque c'est elle qui initie le catabolisme dérégulé de l'APP à l'origine des plaques amyloïdes. L'étude des propriétés et de l'activité de cette enzyme est donc essentielle à l'avancement des connaissances sur la maladie.

La protéine BACE1 joue un rôle clé dans la production du peptide amyloïde. Plusieurs hypothèses soutiennent l'implication du peptide amyloïde dans la cascade d'événements menant à la dégénérescence neuronale observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Une accumulation du peptide amyloïde est par ailleurs observée autant dans la forme sporadique que la forme familiale de la maladie. Pour toutes ces raisons, le développement d'inhibiteurs de la protéine BACE1 semble une approche extrêmement intéressante dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Depuis sa découverte en 1999, la protéine BACE1 a fait l'objet d'intensives recherches pourtant, plusieurs aspects de la protéine demeurent peu connus. Une fonction précise de la protéine n'a été proposée que tout récemment. BACE1 jouerait un rôle essentiel dans la régulation de la myélination des cellules neuronales. La nature peu connue de BACE1 et la récente découverte d'un rôle pour cette dernière suggèrent une certaine prudence quant à l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre cette protéine. Par contre, une inhibition partielle de la protéine ou la modulation de son activité pourraient s'avérer être des stratégies anti-amyloïde à la fois efficaces et sécuritaires, en n'interférant pas avec la fonction physiologique de BACE1. En se basant sur cette dernière stratégie, nous avons imaginé un système permettant d'identifier les protéines pouvant modifier l'activité de la protéine BACE1. Ce système permettrait le criblage à grande échelle de diverses protéines afin d'identifier des modulateurs de l'activité de BACE1. Ces modulateurs de l'activité de BACE1 pourraient éventuellement être ciblés de façon à réduire la production de peptide amyloïde dans la cellule [23].

2. Définition de BACE1

Le bêta-sécrétase 1 (BACE1), également connu sous le nom de bêta place protéine précurseur amyloïde clivage enzymatique 1, bêta site de clivage APP enzyme 1, associée à la

membrane aspartique protéase 2, mémapsine-2, l'aspartyl protéase de 2, ASP2, le BACE1 est une protéase aspartique-acide important dans la formation de la gaine de myéline dans les cellules nerveuses périphériques. La protéine transmembranaire contient deux résidus aspartate le site actif dans son domaine extracellulaire de la protéine et peut fonctionner comme un dimère. Enzyme que chez l'homme est codée par le gène de la BACE1.

BACE1 est lointainement apparenté au pathogène protéase aspartique de plasmepsine-acide, qui est une cible potentielle pour les futurs médicaments antipaludiques. B-sécrétase, également appelée BACE (β place de la protéine précurseur de l'amyloïde enzyme de clivage) et mémapsine 2, est une aspartyl protéase trouvé chez l'homme. B-sécrétase joue un rôle important dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Cela a fait de β -sécrétase une cible thérapeutique pour une intervention pharmacologique [24].

3. La Structure et le caractère de bêta- sécrétase

Structurellement, BACE1 appartient à la famille d'aspartyl protease, et contient une structure bilobée formant par une N- et C-terminal domaines. Les deux extrémités N- et C-domaines sont formés par hautement structures β feuilles torsadées et chaque domaine contribue un acide aspartique au module catalytique de l'enzyme. Il est donc proposé que les ligands contenant un groupement chargé positivement puissent être favorables à contrecarrer le site actif négativement chargé.

β -sécrétase est constitué de deux résidus aspartate: Asp32 et Asp228. Les groupes R des deux aspartates coordonner une molécule d'eau unique entre les deux d'entre eux, permettant une attaque nucléophile de se produire sur les carbonyles.

Il existe deux autres caractéristiques importantes de β -sécrétase. La première est la boucle en épingle à cheveux β sur le site actif, connu sous le nom "rabat". Le rabat est constitué des résidus 67 à 77. Bien que le site actif reste inactif, le clapet reste dans sa conformation ouverte. Cependant, le volet est fermé est stabilisé pendant plus de son substrat ou d'un autre inhibiteur.

Structurellement, BACE1 appartient à la famille d'aspartyl protéase, et contient une structure bilobée formant par une N- et C-terminal domaines. Les deux extrémités N- et C-domaines sont formés par hautement structures β feuilles torsadées et chaque domaine contribue un acide aspartique au module catalytique de l'enzyme. Il est donc proposé que les ligands contenant un groupement chargé positivement pourraient être favorables à contrecarrer le site actif négativement chargé [25].

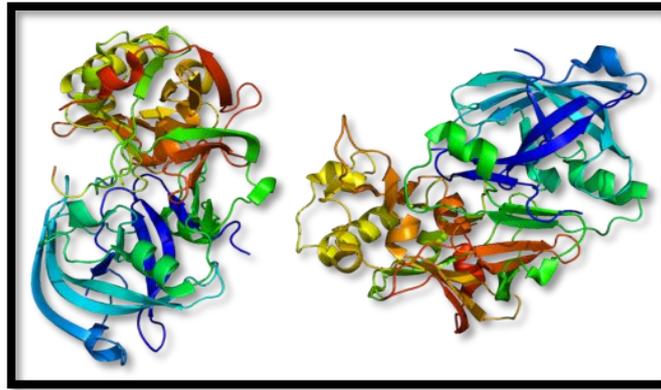


Figure06: Structure tridimensionnelle de BACE1 (Protein Data Bank).

Les trois parties se réunissent pour former une sorte de poche pour les substrats ou des inhibiteurs de β -sécrétase contraignant. La liaison au site actif active le volet se referme et initie la liaison par la boucle de 10s, le tout pour aider à stabiliser la structure.

4. La Réaction de l'enzyme BACE1

Traitement de l'APP et la génération A β et les mutations qui affectent clivage β -sécrétase. A. L'APP est une protéine membranaire de type I qui est successivement clivée par deux protéases aspartiques pour générer A β . Tout d'abord, l'enzyme de β -sécrétase APP coupe (1) pour créer l'extrémité N-terminale d'A β . Deux fragments APP sont produits: C99 lié à la membrane et sécrétées sAPP β ectodomaine. Ensuite, C99 est clivé par l'enzyme de γ -sécrétase (2) pour générer l'extrémité C-terminale d'A β . A β est alors libéré dans le lumen de l'endosome et sécrétée dans le milieu extracellulaire. Un domaine intracellulaire, C59, est également produit. B. Les acides aminés dans et autour du domaine A β de l'APP sont représentés par des cercles bleus. Les acides aminés qui affectent le traitement β -sécrétase de l'APP chez les humains sont des cercles verts, dans lequel le résidu de type sauvage est identifié par le code d'acides aminés à une seule lettre. Le K670N / M671L (suédois) et des mutations de A673V provoquer FAD en augmentant β -sécrétase clivage et la production d'A β , tandis que la mutation A673T protège contre la MA en faisant le contraire. Les trois mutations se produisent à l'intérieur ou un acide aminé du site de clivage de β -sécrétase. Ciseaux indiquent les sites de clivage des différents sécrétases [26].

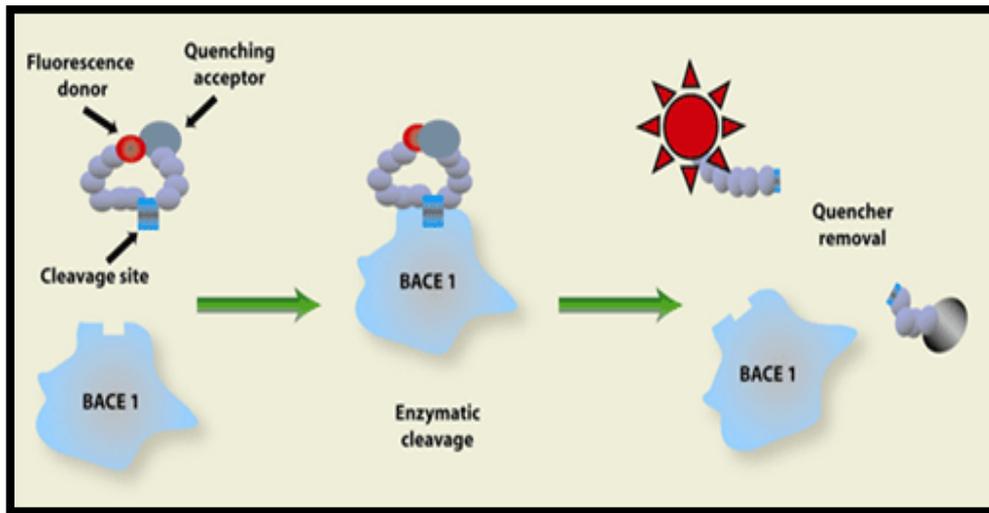


Figure 07 : Principe de l'essai.

Chapitre 2:

Le Docking Moléculaire

1/Introduction

La recherche en biologie ne peut, actuellement, se passer des outils informatiques pour traiter le flot de données produites et optimiser ses avancées.

L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus précisément l'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo-saxon docking). L'emploi initial du docking moléculaire a été de prédire et reproduire des complexes protéines-ligand.

Tous les programmes de docking peuvent se décomposer en deux étapes, la partie de recherche des conformations possibles du ligand et la partie d'évaluation de ces conformations ou fonction de score. Celle-ci doit permettre d'attribuer le meilleur score au complexe le plus réaliste déterminé expérimentalement. Pour effectuer ce choix la fonction de score est basée classiquement sur la complémentarité stérique des fonctions et des groupements chimiques.

Il existe de nombreuses fonctions de score mais envisager tous les paramètres physico-chimiques qui entrent en jeu dans les interactions intermoléculaires est pour l'instant irréalisable.

Le premier objectif de ce travail est d'évaluer les programmes disponibles pour effectuer un docking moléculaire entre une protéine enzymatique et des ligands divers.

Pour cela, deux programmes parmi les plus utilisés actuellement ont été choisis : MSviwer et Surfex.

Il s'agit là d'une approche "*in silico*" de la biologie traditionnelle qui complète les approches classiques "*in situ*" (dans le milieu naturel), "*in vivo*" (dans l'organisme vivant) et "*in vitro*" (en éprouvette) [27 ; 28 ;29] .

2/DEFINITION DE DOCKING MOLECULAIRE

Le docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe formé par deux molécules [30] .La formation de ces complexes est fondée sur la reconnaissance de la structure tridimensionnelle d'un ligand par site récepteur et contrôle de l'activité de nombreuses molécules .le processus de docking consiste à faire interagir une petite molécule organique avec le récepteur, généralement de nature protéique.

Des études ont montré que certains algorithmes de docking sont plus fiables que d'autres pour reproduire le mode de fixation expérimentale de ligands [31 ; 32 ; 33].

3/PRINCIPE DE DOCKING

Le docking moléculaire se déroule en deux étapes principales : [34].

-La première consiste à rechercher et générer toutes les conformations possibles et donc générant les modes d'interaction possibles entre la protéine et le ligand. Cette étape doit parcourir au mieux l'espace conformation elle pour trouver l'énergie minimale globale.

-La deuxième est une donnée numérique dite fonction de score capable de déterminer la conformation qui représentera le mode d'interaction le plus juste pour chaque ligand par rapport à son récepteur.

En calculant rapidement l'énergie libre totale du complexe protéine-ligand formé : c'est l'étape de marquage de score [35].

4. PRINCIPE THEORIQUE

Docking (ancrage ou amarrage en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interactions entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire (cible de docking) dont la structure tridimensionnelle est connue et d'une petite molécule (ligand).

Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine [36].

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes :

Le docking proprement dit et le scoring

- La première (le docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- La deuxième (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées [37 ; 38].

5. 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 [39].

La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate.

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 conformationnelle. L'échantillonnage dans ce cas est incomplet et n'a pas permis de trouver le conformère correspondant au minimum global d'énergie potentielle dans le cas où le score de docking serait bien plus bas que celui de la structure cristalline il s'agit d'une erreur de la fonction de score.

Pour remédier à ces problèmes, dans le premier cas il faut augmenter le nombre de conformères évalués, dans le deuxième il faut revoir la fonction de score. Il s'agit là de cas classiques qui supposent que l'espace conformationnelle autour de la structure expérimentale est parfaitement parcouru et que la structure cristalline est bien celle correspondant au minimum global d'énergie potentielle. Il faut donc l'adapter selon son propre calcul [40].

Pour optimiser les molécules à activité pharmacologique, le programme doit être capable de ranger correctement des molécules semblables chimiquement. La fonction de score doit être capable de limiter les faux positifs et les faux négatifs. Pour vérifier la capacité à différencier du logiciel, il faut disposer d'un. Banque expérimentale de complexes.

Il convient d'avoir une structure cristallographique pour au moins un complexe protéine-ligand proche des molécules testées [41].

6. Criblage par docking à haut débit

Le docking (ou ancrage) à haut débit consiste à prédire à la fois la conformation active et l'orientation relative de chacune des molécules de la chimio thèque sélectionnée par rapport à la cible d'intérêt.

Très généralement, la recherche se focalise sur le site actif tel qu'il aura pu être déterminé expérimentalement (par mutagenèse dirigée par exemple).

Il est important de prendre en compte à ce stade la notion de débit que l'on veut atteindre.

Il faudra en effet considérer le meilleur compromis entre rapidité et précision. En général, le docking à haut débit nécessite une rapidité voisine de 1-2 minute/ligand. De nombreux programmes de docking sont disponibles [42].

Principaux programmes de docking moléculaire :

Tableau 01 : Les principaux programmes de docking moléculaire.

Nom	Editeur	Site Internet
Auto Dock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	Open Eyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Ligand Fit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

Ces méthodes utilisent toutes le principe de complémentarité stérique (Dock, Fred) ou d'interactions moléculaires (AutoDock, FlexX, Glide, Gold, ICM, Ligand Fit, Surflex) afin de placer un ligand dans le site actif d'une cible.

Généralement, la protéine est considérée comme rigide alors que la flexibilité du ligand est prise en compte relativement bien jusqu'à une quinzaine de rotules.

Trois principes sont généralement utilisés dans le traitement de la flexibilité du ligand :

- un ensemble de conformations du ligand est préalablement calculé et celles-ci sont dockées de manière rigide dans le site (ex: Fred).
- le ligand est construit de manière incrémentale fragment après fragment (ex: Dock, FlexX, Glide, Surflex).
- une analyse conformationnelle plus au moins exhaustive est conduite sur le ligand de manière à générer les conformations les plus propices au docking (ex: ICM, Gold, Ligand Fit).

Généralement, plusieurs poses du ligand sont générées et classées par ordre de probabilité décroissante selon une fonction d'évaluation [43]. qui au mieux essaiera d'approximer l'énergie libre de liaison du ligand à sa cible (c'est-à-dire son affinité) ou plus simplement classera les molécules de la chimio thèque par énergie d'interaction avec le site de la protéine cible.

La précision d'outils de docking moléculaire peut être évaluée en comparant prédictions et solutions expérimentales sur un ensemble représentatif de complexes protéines-ligand issus de la Protein Data Bank.

L'expérience montre que si l'on considère les 30 solutions les plus probables, un ligand est généralement bien ancré dans environ 75% des cas. La « meilleure solution » (la plus proche de la solution expérimentale) n'est pas toujours celle prédite comme la plus probable par la fonction d'évaluation (seulement dans 50 % des cas environ) ce qui complique singulièrement l'analyse prédictive de solutions de docking [44].

De nombreuses raisons existent pour expliquer ces imperfections, dont le traitement peut s'avérer plus ou moins compliqué.

7. LES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND

7.1. Les interactions entre le ligand et le récepteur

Les interactions entre une protéine et un ligand sont en général de nature non covalente.

L'énergie libre de Gibbs se calcule selon l'Équation 01 [45].

$$\Delta G = -RT \ln K_i = \Delta H - T\Delta S$$

Équation 01. Energie libre de Gibbs

R: constante des gaz (8,314 J. K⁻¹ mol⁻¹)

T: Température (K).

K_i: constante d'inhibition.

La grandeur du ΔG en solution aqueuse est comprise entre -10 et -70 KJ/mol.

7.2. Les composantes de l'énergie libre

Sont :

1/la complémentarité géométrique, stérique et de surface entre le ligand et le récepteur.

2/ les contacts présents entre deux régions lipophiles des deux entités.

3/les liaisons hydrogène.

- ❖ La liaison hydrogène résulte de l'interaction électrostatique entre un élément très électronégatif portant au moins un doublet non liant et un atome d'hydrogène lié à un élément très électronégatif [46].

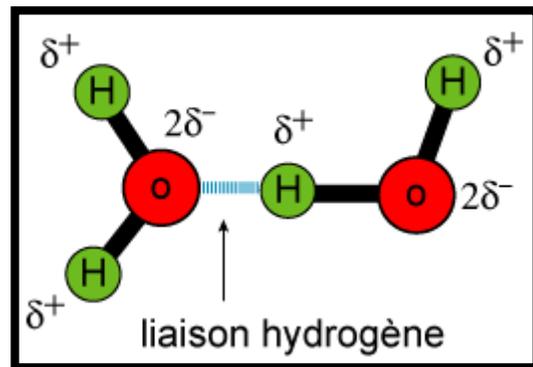


Figure08: La liaison Hydrogène.

Chapitre 3 :

Matériel et Méthodes

1. MATERIEL

1.1. Microordinateur

Dans notre étude nous avons utilisé :

- ❖ deux micro-ordinateurs puissants avec une mémoire vive de 4 GO et 2 GO respectivement.

1.2. Programmes

Les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7.

1/ Surfex v 1.3, 2 [47] : logiciel de docking.

2/ MSViewer v 4.2 : programme de visualisation des molécules.

3/Open Babel (2.0.2) est le dernier logiciel utilisé dans cette étude. C'est un programme libre visant à faciliter l'inter conversion des données chimiques d'un format à un autre de fichiers de divers types (pdb, mol, mol2...etc.).

Une banque de données appelée la PDB (Protein Data Bank) [48] : c'est la principale source de données de biologie structurale, elle permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie.

- Le réseau internet comme outil principal pour le téléchargement des programmes, des complexes et des ligands dont on a besoin

1.3. La banque de données protéiques (PDB)

La PDB est la principale source de données de biologie structurale et permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique la majorité est sous forme de complexes.

Les principales différences entre ces complexes sont :

- Le microorganisme : Helicobacter pylori , Salmonella enterica....
- Oligo-éléments : Ca, K...
- Divers ligands.

2. METHODES

2.1. Le protocole d'utilisation des logiciels

2.1.1. Surfex

Pour réaliser l'arrimage il faut passer par :

- La séparation de la protéine et du ligand : pour cela il y a deux méthodes, l'une consiste à utiliser le format texte, et l'autre c'est la technique que nous avons choisie et qui est plus rapide, elle consiste en l'utilisation du logiciel MSViewer :

1. Cliquer sur le menu File/Open.

2. Choisir le complexe.

3. Cliquer sur Window /New Hierachy Window ou bien le raccourci Ctrl+ H.

4. Cliquer sur le signe + pour obtenir le contenu du complexe (les chaînes de la protéine, les ligands et les molécules d'eau).
5. Pour obtenir la protéine seule il faut garder l'une des chaînes et supprimer le reste.
6. Pour obtenir le ligand seul il faut garder l'un des ligands de la même chaîne et supprimer le reste.
7. Enregistrer les modifications sous format pdb et les renommer en ajoutant la lettre P pour la protéine et L pour les ligands.
 - Réalisation du docking en utilisant l'invite de commandes MS Dos :
1. Création du site d'interaction (Protomol) en lançant la commande suivante :
Surflex-dock proto ligand.pdb proteine.pdb pl
2. Le docking :
Surflex-dock dock ligand.pdb pl-protomol.mol2 proteine.pdb
3. Le calcul de RMS :
Surflex-dock rms final-0.mol2 ligand.pdb
4. En cas de l'obtention d'un rms supérieur à 2 et inférieur ou égal à 3, on peut lancer la commande suivante pour optimiser le résultat.
Surflex-dock oprms final-0.mol2 ligand.pdb

2.1.2. Le logiciel MSViewer

Après l'arrimage vient l'étape de la visualisation par le biais de MSViewer:

1. Cliquer sur file/open dans la barre des menus pour ouvrir les différents fichiers :
 - ✓ La protéine.
 - ✓ Le ligand de référence.
 - ✓ Le final-0.
 - ✓ L'optrms dans certains cas.

2.2. Le test de fiabilité du logiciel Surflex (v1.3, 2005)

Les performances d'un programme de docking peuvent être jugées au moyen de deux critères : détermination du RMSD suivi d'une visualisation et du coefficient de corrélation.

2.2.1. RMSD (root mean square deviation)

Correspond à la moyenne de la déviation de chacun des atomes du ligand (ligand de calcul) par rapport à ceux de la molécule d'origine (le ligand de référence). Les performances d'un programme de docking sont évaluées en termes de capacité à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Le mieux possible signifie que la valeur du RMSD (Root Mean Square Déviation) entre la pose du ligand calculée par le logiciel et la conformation dans le complexe expérimental est la plus petite possible. Le positionnement, c'est-à-dire l'identification correcte du site de liaison sur la protéine, l'orientation et la conformation du ligand influent sur la valeur du RMSD.

133 complexes protéines-ligands tirés de la PDB ont été testés façon aléatoire .

2.2.2. Coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation linéaire quantifie la force du lien linéaire entre les deux caractères d'une distribution. Par définition, la valeur d'un coefficient de corrélation se situe entre -1 et 1. Le coefficient de corrélation linéaire est habituellement noté r (Voir Figure10).

Ce test consiste à évaluer le degré de corrélation qui existe entre l'affinité des inhibiteurs simulés par docking moléculaire à l'aide du programme Surflex et les valeurs de leurs IC50 (la concentration anti bactérienne inhibant 50 % de la multiplication bactérienne) déterminées expérimentalement par des essais in vitro et obtenues à partir de la littérature [49].

La liste des complexes protéines-ligands testés sera retrouvée dans l'Annexe-2.

3. INHIBITION DE L'ENZYME DU COMPLEXE 2OHL

3.1. Choix du complexe 2OHL

Nous avons choisi le complexe 2OHL ; en raison de son rmsd (0,983Å) et sa bonne affinité (4.05M⁻¹) par rapport aux autres complexes testés.

Chaque médicament éventuel doit de se conformer à plusieurs critères de base, tels son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité (filtre ADME/Tox) [50] . En 1997, Lipinski a défini un ensemble de critères permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure 2D. Selon cette règle un composé possède toutes les chances d'être disponible oralement s'il respecte au moins 3 des 5 critères suivantes:

1. Ne possède pas plus de 5 donneurs de ponts hydrogène (OH et NH).
2. Ne possède pas plus de 10 accepteurs de ponts hydrogène (O et N).
3. Possède une masse moléculaire inférieure à 500 daltons.
4. Un coefficient de partition octanol/eau (log P) ou une lipophile entre -2 et 5.
5. le nombre de liaisons rotatable inférieur à 15

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur Molinspiration [51].

3.2. Calcul des interactions « enzyme- composés substitués »

Dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de la BACE1, nous avons utilisé comme structure de départ le meilleur inhibiteur étudié la 2-amino-quinoline.

Afin d'améliorer l'affinité de le 2-amino-quinoline, plusieurs groupements fonctionnels présentant la capacité d'engager des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme ont été introduits sur différentes positions de la molécule. Il s'agit des fonctions : acide (-COOH) ; amine (-NH₂) ; amide (CONH₂), hydroxyle(OH). (Voir Figure10).

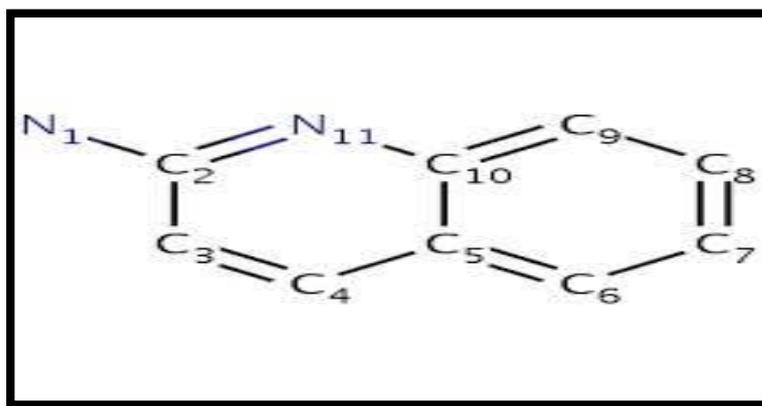


Figure 10: Structure du 2-amino-quinoline.

3.2.1. Les mono-substitutions

Les mono-substitutions ont été réalisées de la façon suivante :

Tableau 02 : Les mono-substitutions du 2-amino-quinoline.

Composé	Mono -substitution						
	C2	C3	C4	C6	C7	C8	C9
1	OH						
2		OH					
3			OH				
4				NH2			
5					NH2		
6						NH2	
7							CONH2
8	CONH2						
9		CONH2					
10			COOH				
11	COOH						
12				COOH			
13					OH		
14						COOH	
15							OH

3.2.2. Les bi-substitutions

Les bi-substitutions ont été réalisées telles que mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau 03: Les bi-substitutions du 2-amino-quinoline.

Composé	Bi - substitution						
	C2	C3	C4	C6	C7	C8	C9
16	OH				OH		
17				OH			COOH
18	COOH	COOH					
19	CONH2	OH					
20	CONH2				OH		
21	CONH2						COOH
22			NH2			OH	
23				OH			COOH
24	COOH		OH				
25	OH			NHO			
26	OH				NH2		
27	OH					CONH2	
28		NH2					NH2
29		NH2				NH2	
30	OH				CONH2		
31				COOH	COOH		
32						COOH	OH
33				COOH		OH	
34				COOH			COOH

3.2.3. Les Similaires

L'affinité de 32 similaires du ligand 2AQ a été calculée, après leur conversion du format .sdf au format .pdb.

Une comparaison de l'affinité des 3 types de molécules (mono-substituées, bi-substituées et similaires) sera faite en vue de proposer les meilleurs inhibiteurs de l'enzyme.

3.3. La visualisation des liaisons hydrogènes établies entre le ligand et les acides aminés du site actif

- ❖ Ouvrir le fichier du final -0 de la protéine, ou de l'optrms via MSViewer.
- ❖ Sélectionner le ligand, puis et le coller au niveau du site d'interaction de la protéine en cliquant sur Edit/Copy puis Paste dans la barre des menus, ou bien appuyer sur le raccourcis Ctrl+ C puis Ctrl+V.

- ❖ Sélectionner le ligand une fois collé dans le site actif, puis cliquer sur tools/Monitor/Hbonds pour visualiser les liaisons hydrogènes établies entre le ligand et les acides aminés du site d'interaction.
- ❖ Cliquer sur chacun des atomes reliés avec le ligand par un trait discontinu en vert, puis marquer cet acide aminé en cliquant par le bouton droit de la souris et choisir l'option Label : changer la couleur et s'assurer des options suivante résidu, Name ensuite cliquer sur les boutons Apply/Ok.
- ❖ L'acide aminé sélectionné apparait en bas de l'écran.
- ❖ Ensuite faire la même chose avec le final-0 du similaire (meilleure affinité) choisi pour comparer les deux résultats.

Chapitre 4: Résultats et Discussion

1. TESTS DE FIABILITE DES PROGRAMMES DE DOCKING

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de BACE1 par diverses molécules, à savoir le 2-Amino-Quinoline, ses dérivés mono et bi-substitués ainsi que certains de ses similaires, nous avons commencé par évaluer d'abord la performance du programme Surflex en faisant appel à trois tests différents :

- ❖ L'écart quadratique moyen ou le RMSD (Root mean square deviation).
- ❖ L'analyse visuelle.
- ❖ Le coefficient de corrélation linéaire (r).

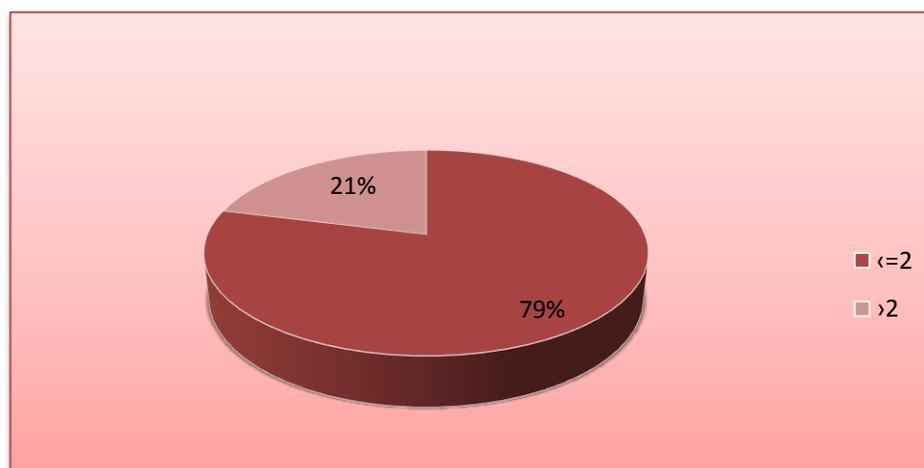
1.1. Le test RMSD

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB.

La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms. La performance du logiciel Surflex a été évaluée sur 133 complexes protéines-ligands tirés de façon aléatoire de la PDB.

Les écarts quadratiques moyens entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par Surflex, ont été calculés. Une prédiction correcte (résultat positif) est définie par un RMSD entre le mode d'interaction prédit et la structure cristalline inférieur à 2 Å.

Dans le graphe suivant, les résultats sont donnés en pourcent (%) à deux intervalles de RMSD.



Graph 01: Résultats en % obtenus par Surflex à deux intervalles de RMSD (Å).

Nous remarquons d'après ces résultats que le programme Surfex reproduit bien les données expérimentales. En effet 79 % des valeurs de RMSD sont inférieures ou égales à 2 Å et 21 % supérieures à 2 Å.

Ces résultats montrent que le programme Surfex peut être utilisé en arrimage moléculaire pour la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

1.2. Visualisation des molécules superposées

L'analyse visuelle par surflex est une étape essentielle pour confirmer les résultats du RMSD. La comparaison de la meilleure conformation du ligand obtenue par le logiciel Surfex et appelée Final-0 (coloré en bleu) superposée à la pose expérimentale du ligand naturel (coloré en rose) du complexe 2OHL est montrée dans la figure suivante :



Figure 11 : Superposition de l'inhibiteur (coloré en rose) et final-0 calculé par Surfex (Coloré en bleu) du complexe 2OHL (RMSD=0,983Å).

Avec un RMSD de 0.983Å, on obtient une superposition presque parfaite des deux molécules, celle du ligand originel et celle générée par le programme de docking (figure 11).

1.3. Le coefficient de corrélation (r)

L'affinité calculée par Surfex de trente trois complexes téléchargés à partir de la PDB et les valeurs de leurs IC50 correspondantes sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 04: Résultats de l'analyse par régression linéaire.

<i>N</i>	<i>CODE</i>	<i>IC50 (nM)</i>	<i>pIC50</i>	<i>AFFINITE (M⁻¹)</i>
1	2OHL	800000	-5,903	4,05
2	3L38	100	-2	6,30
3	4KE1	2,5	-0,397	4,86
4	4FRI	2850	-3,454	2,81

5	4FRJ	280	-2,447	2,24
6	3VF3	1370	-3,136	8,97
7	3VV7	4500	-3,662	4,34
8	3VV8	17100	-4,232	3,82
9	4FRS	11	-2,924	2,69
10	4DJW	630	-2,799	3,55
11	3WB4	220000	-5,342	3,96
12	4HA5	68	-1,832	4,79
13	3S7L	80	-1,903	5,87
14	3S7M	10	-1	4,25
15	4J00	36830	-4,566	3,52
16	4JP9	24	-1,38	4,11
17	4JPC	94	-1,973	4,49
18	4JPE	48	-1,681	3,66
19	4LXM	88	-1,944	3,41
20	4L7G	99300	-4,996	4,07
21	4B00	2,44	-0,387	6,29
22	4DPF	400	-2,602	3,93
23	4DPI	78	-1,892	3,53
24	3UDM	3300	-3,518	3,98
25	3UDJ	242000	-5,383	1,25
26	4B78	10000	-4	4,03
27	4B77	7900	-3,897	5,99
28	4B72	630	-2,799	5,84
29	3UDR	11000	-4,041	6,12
30	4ACX	77,6	-1,889	3,10
31	4ACU	40,7	-1,609	3,50
32	4FS4	840	-2,924	3,70
33	4FM8	2400	-3,38	0,78

L'analyse par régression linéaire a permis d'obtenir la courbe de corrélation Suivante
(Voir figure12).

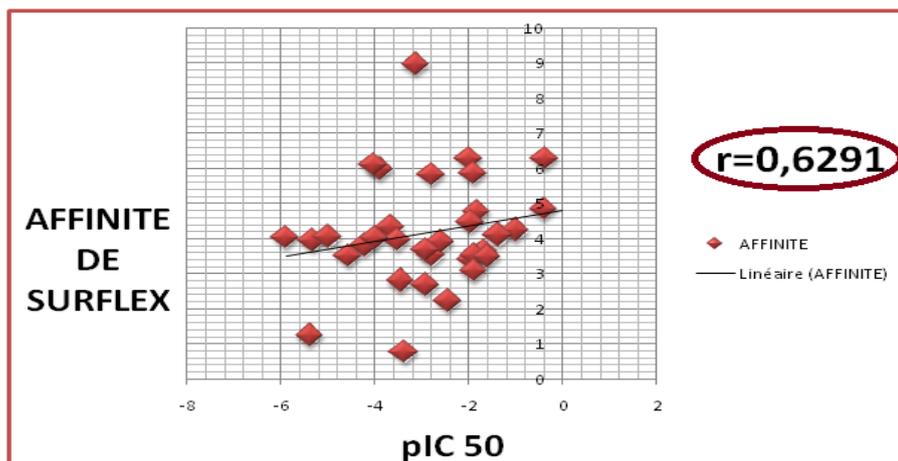


Figure12 : Corrélation entre l’activité biologique (pIC50) des différents complexes (33) et leurs affinités données par Surfex.

Le programme de docking moléculaire est performant quand la valeur absolue du coefficient de corrélation linéaire dépasse 0.5, ce qui est en parfait accord avec les résultats trouvés. Comme le montre la figure N°12, il existe une forte corrélation entre l’affinité et les pIC50 des inhibiteurs étudiés, avec un coefficient de corrélation égal à 0.6291.

En conclusion nous retenons le programme Surfex pour poursuivre notre étude de docking moléculaire.

2- ETUDE ET PROPOSITION DE NOUVELLES MOLECULES BIOACTIVES

Le tableau suivant présente l’affinité du ligand naturel du 2AQ .

Tableau05 : L’affinité du ligand naturel 2AQ.

Composés (ligand)	Affinités (M ⁻¹) .pdb
2- Amino-Quinoline (2AQ)	4,05

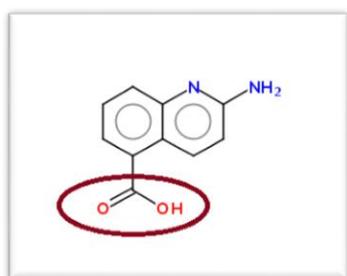
Les tableaux suivants présentent les meilleures affinités des composés mono, bi-substitués et des similaires du 2AQ.

2.1. Les mono-substitutions

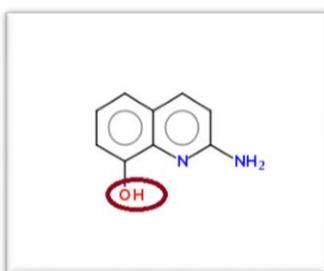
Nous avons testé 15 composés mono – substitués parmi lesquels 3 seulement présentent une amélioration de leur affinité à l’enzyme (voir figure14 et le Tableau 06).

Tableau06 : Les affinités des meilleurs composés mono - substitués.

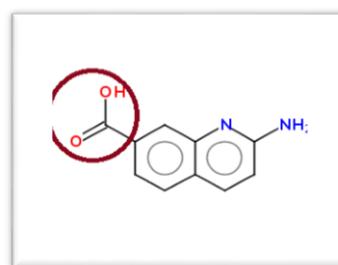
Composés	Affinités (M^{-1}) .pdb
Composé 12	5,71
Composé 14	4,35
Composé 15	4,24



Composé 12



composé 15

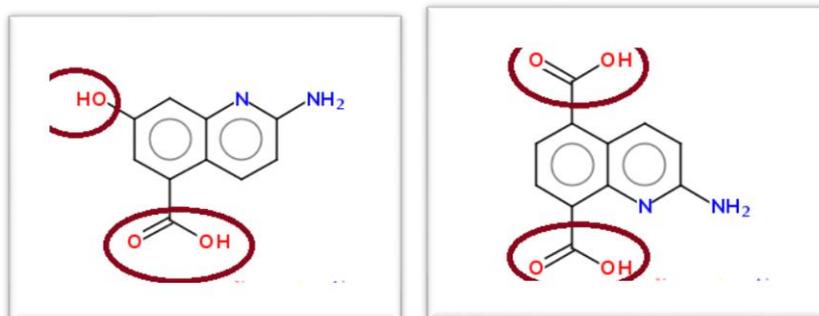


composé 14

Figure13: Les meilleurs Mono - substitués (composés 12, 14,15).

La meilleure affinité est obtenue par le composé 12 (substitution par un COOH en position 6) avec une valeur de $5,71 M^{-1}$ supérieure à celle du ligand naturel qui est de $4,05 M^{-1}$

✓ Exemple d’Affinité de composé 12 par le Surflex.

Composé 33Composé 34**Figure14: Les 2 meilleurs composés bi-substitués (composés 33 et 34).**

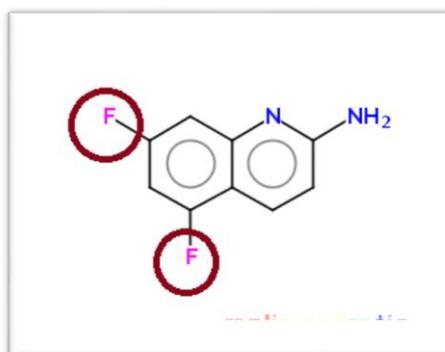
Parmi les 19 composés bi - substitués, seuls 2 composés ont présenté des affinités supérieures à 4.05 M^{-1} , le composé 33 ($5,29 \text{ M}^{-1}$) et le composé 34 ($5,06 \text{ M}^{-1}$). Ces deux composés dérivent du composé 15 avec une deuxième substitution par un OH au niveau du carbone 8 pour le composé 33 et par un COOH au niveau du carbone 9 pour le composé 34.

La liste des affinités des composés mono et bi-substitués testés sera retrouvée dans l'annexe 1.

2.3. Les similaires

L'affinité de 32 composés similaires du ligand 2AQ a été calculée après transformation de leur format .sdf au format .pdb par le logiciel Openbabel.

La meilleure affinité ($4,61 \text{ M}^{-1}$) a été obtenue par le composé 20 (voir figure16).

**Figure15: Le meilleur Similaire (6,8-difluoroquinolin-2-amine).**

La liste des affinités des similaires testés sera retrouvée dans l'annexe 3.

- ✓ **Application de la règle de Lipinski sur les meilleurs composés (les mono, les bi substitués et les similaires)**

Le tableau ci-dessous présente les résultats de la règle de 5 de Lipinski des six composés présentant une affinité supérieure à celle du composé 2 amino-quinoline.

Tableau08: Les propriétés pharmacologiques des composés mono, bi-substitués et des composés similaires.

	Les composés	Log P	PM	AH	DH	LR
Le similaire	6,8-difluoroquinolin-2-amine	2,30	180,16	2	2	0
Les mono - substitués	Composé 12	1,59	188,19	4	3	1
	Composé 14	1,65	188,19	4	3	1
	Composé 15	1,50	160,18	3	3	0
Les bi- substitués	Composé 33	1,70	204,19	5	4	1
	Composé 34	1,12	232,19	6	4	2

Nous remarquons que les 6 composés répondent favorablement aux différents critères de la règle de Lipinski.

3- ETUDE DES INTERACTIONS DE L'ENZYME AVEC LES DIFFERENTS COMPOSES PROPOSES

Pour étudier les différents types d'interactions réalisées entre l'enzyme et les inhibiteurs, nous avons pris comme exemple le composé bi-substitué n°33. Ces interactions sont représentées dans la figure suivante :

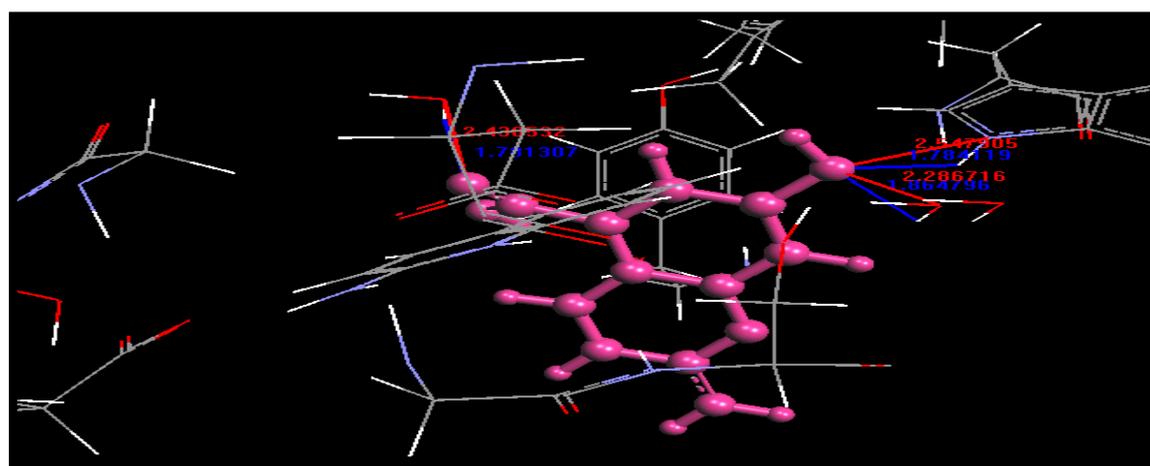


Figure 16: Interaction entre le composé 33 et l'enzyme BACE1.

Nous observons la présence de 3 liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur bi -Substitué (Composé 33) dont :

La 1^{ère} avec une distance (d=2.286) entre l'atome d'oxygène (6090 O) du résidu (460HOH) et l'atome d'oxygène (6221 O) de l'inhibiteur.

La 2^{ème} avec une distance ($d=2.547$) entre l'atome d'azote (1218 N) de l'acide aminé (76TRP) et l'atome d'oxygène (6221 O) de l'inhibiteur.

La 3^{ème} avec une distance ($d=2.438$) entre l'atome d'oxygène (6144 O) du résidu (478HOH) et l'atome d'oxygène (6219 O) de l'inhibiteur.

De plus le complexe enzyme-composé 33 est stabilisé par des interactions hydrophobiques avec de nombreux résidus dont les trois suivants : (108PHE), (115TRP) et (118 ILE).

CONCLUSION

L'objectif de ce travail, basé sur l'étude de modélisation moléculaire par Docking utilisant le programme Surflex, est de développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la BACE1.

Ce programme a été développé pour aider principalement à la mise au point de nouveaux composés bioactifs. Le docking moléculaire sert souvent à déterminer l'orientation de petites molécules liées à leurs protéines cibles afin de calculer leur affinité et niveau d'activité, dans notre cas, contre la formation de plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

L'enzyme BACE1 est porteuse de la seule activité enzymatique capable de cliver la β APP au niveau du site β sur l'APP. L'activité de la β -sécrétase augmente de façon significative dans les cerveaux de patients atteints de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer.

Nous avons d'abord testé la performance du programme Surflex par l'évaluation de deux paramètres, le RMSD et le coefficient de corrélation, suivie d'une analyse visuelle. Le premier test consiste à calculer le RMSD (Root-Mean-Square Dérivation) pour bien juger la déviation de la géométrie du ligand simulée par Surflex avec celle déterminée expérimentalement (retrouvée dans les complexes tirés de la banque de données protéiques (PDB)). Le second test permet la détermination du coefficient de corrélation entre l'activité biologique (IC50) et le score de docking moléculaire. Enfin une analyse visuelle a été faite pour confirmer les résultats des deux tests précédents.

A l'issue de cette première étude, nous avons jugé le programme Surflex assez performant puisqu'il reproduit les résultats expérimentaux avec 79% des valeurs de RMSD inférieures ou égales à 2 Å.

Nous avons ensuite déterminé l'affinité du composé 2AQ ou 2- amino-quinoline ($4,05 M^{-1}$), considéré comme inhibiteur naturel de l'enzyme BACE1.

Enfin, nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs en prenant comme structure de base le 2AQ. L'activité inhibitrice de ce dernier a pu être améliorée grâce à une approche très utilisée dans le domaine de la conception rationnelle des médicaments : la mono substitution (15 composés), la bi substitution (19 composés) et l'utilisation de similaires (32 composés).

Le composé 12, résultant de la mono substitution de la 2- amino-quinoline par l'introduction d'un groupement acide sur le carbone 6, présente une nette amélioration de l'affinité qui passe de $4,05 M^{-1}$ à $5,71 M^{-1}$.

Aussi, une amélioration de l'affinité des deux composés 14 et 15 résultants de la mono-substitution du 2- Amino-Quinoline est observée. En effet, l'introduction d'un hydroxyle sur le C9 pour le composé 14 donne une affinité de $4,35 M^{-1}$ et celle d'une fonction carboxylique sur le C6 pour le composé 15 une affinité égale à $4,24 M^{-1}$.

Nous avons également constaté une amélioration de l'affinité des deux composés bi-substitués (33 et 34), obtenus par l'introduction d'un groupement acide sur C6 et un groupement hydroxyle sur C8 pour le composé 33, et l'introduction de 2 groupements acide sur C6 et C9 pour le composé 34.

Un seul similaire parmi les 32 composés étudiés a présenté une bonne affinité ($4,61 M^{-1}$) par rapport au ligand naturel ($4,05 M^{-1}$), il s'agit du composé 20.

De ce fait, nous proposons tous les composés ayant présenté une meilleure affinité que celle du ligand naturel comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme, cependant des tests *in vitro* et *in vivo* sont indispensables pour valider ces résultats.

Il faut enfin noter que tous ces composés proposés sont conformes aux critères imposés par la règle de Lipinski.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Puglielli L. , B. C. Ellis , 2003. Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor Protein -cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. J Biol Chem 278(22): 19777-83.
- [2] Price, tanzi et al. 1998, Van protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzeimer locus .Science,vol.235,p.880-4.
- [3] smale, Nicholas et al .1995. Nicholas, M., Obier, L. K., Albert M. L., & Helm-Estabrooks, N. (1985) .Empty speech in Alzheimer 's disease and tluent aphasia. Journal of Speech and Hearing Research, 28, 405-410.
- [4] (Fukumoto et al . , 2002; Holsinger et al. , 2002; Tyler et al., 2002). Etude de la production et de la dégradation du peptide amyloïde dans la maladie d'Alzheimer.soutenue le 1 décembre 2008.
- [5] Christian Derouesng. , 1994 .La Maladieb d'Alzheimer Eds L'esprit du temps.182 pages.
- [6] Historique de la maladie d'alzheimer .Apartir du sit de l'Unité de Neurologie Compportementale et Dégénérative de Montpellier pour les lésions histologiques : <http://WWW.alzheimer-montpellier.org/historique.html>
- [7] Société Alzheimer du Canada. La maladie d'Alzheimer : L'évolution de la maladie d'Alzheimer. Introduction. Octobre 2005. Accessible à l'adresse [En ligne] <http://www.alzheimer.ca/french/disease/progression-3stages.htm>. Site consulté [le 23 novembre 2008].
- [8] La maladie d'Alzheimer - Corporation des Professionnels Ostéopathes du Québec (CPOQ) [en ligne]. Marie-Josée Leclerc D.O., 2007. Disponible sur : http://www.cpoq.org/pathologies/fichiers/pathologies_19.pdf
- [9] Société Alzheimer du Canada. La maladie d'Alzheimer : Obtenir un diagnostic. Octobre 2005. Accessible à l'adresse <http://www.alzheimer.ca/french/disease/diagnosis.htm>. Site consulté le 3 février 2009
- [10] Marechal L, Champion D, Hannequin D., Formes familiales de la maladie d'alzheimer. Presse Med. 2003; 32:756-763

[11] Petersen RC, « *The current status of mild cognitive impairment—what do we tell our patients?* », *Nat Clin Pract Neurol*, vol. 3, n° 2, février 2007, p. 60–61. (PMID [17279076](#), DOI [10.1038/ncpneuro0402](#))

[12] Förstl H, Kurz A, « *Clinical features of Alzheimer's disease* », *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, vol. 249, n° 6, 1999, p. 288–290.

[13] Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry Jr CP, Zhou J, Whitmer RA, « Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia » [archive] *Arch*; 171:333-339.

[14] *Intern Med*. 2011 Société Alzheimer du Canada. La maladie d'Alzheimer : L'évolution de la maladie d'Alzheimer. Les trois phases. Octobre 2005. Accessible à l'adresse

<http://www.alzheimer.ca/french/disease/progression-3stages.htm>. Site consulté le 23 novembre 2008

[15] http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/maladie_d_Alzheimer/ [En ligne] 05.05.2015

[16] HASEGAWA Tohru, MIKODA Nobuyuki, KITAZAWA Masashi, LAFERLA Frank M. « *Treatment of Alzheimer's Disease with Anti-Homocysteic Acid Antibody in 3xTg-AD Male Mice* », *PLoS ONE* 5(1): e8593 - 20/01/2010 - doi:10.1371/journal.pone.0008593.

[17] Cummings JL. Treatment of Alzheimer's disease. *Clin Cornerstone*. 2001;3:27-39.

[18] Chandra V, Pandav R, Dodge H H, Johnston J M, Belle S H, DeKosky S T, Ganguli M., « Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study » *Neurology* 2001;57(6):985-9. PMID [11571321](#)

[19] Grégoria Kalpouzos, Francis Eustache, Béatrice Desgranges *Réserve cognitive et fonctionnement cérébral au cours du vieillissement normal et de la maladie d'Alzheimer*, Inserm, *Psychologie et NeuroPsychiatrie du vieillissement*. Volume 6, Numéro 2, p. 97-105, juin 2008, Article intégral

[20] Wenk GL, « *Neuropathologic changes in Alzheimer's disease* », *J Clin Psychiatry*, vol. 64 Suppl 9, 2003, p. 7–10. (PMID [12934968](#))

- [21] Desikan R S, Cabral H J, Hess C P, « Automated MRI measures identify individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease », *Brain*, vol. 132, n° Pt 8, août 2009, p. 2048–2057. (PMID [19460794](#), PMCID [2714061](#), DOI [10.1093/brain/awp123](#))
- [22] Wilson R S., *The relation of cognitive activity to risk of developing Alzheimer's disease. Neurology*, 27 juin 2007.
- [23] Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., (1999).
- [24] (Cruts et al., 2001; Liu et al., 2003). Etude de la production et de la dégradation du peptide amyloïde dans la maladie d'Alzheimer
- [25] (Devlin et al., et Tyler et al., 1997- 2002) le vieillissement normal et dans la maladie d'Alzheimer: mise à l'épreuve du modèle de la structure conceptuelle
- [26] J H Stockley, C O'Neill - Cellular and molecular life sciences, 2008 – Springer Page 1. Review Understanding BACE1
- [27] Levinthal C., Wodak S.J., Kahn P., Dadvanian A.K. 1975. Hemoglobin interaction in sickle cell fibers. I. Theoretical approaches to the molecular contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1330–34.
- [28] Kuntz I.D., Blaney J.M., Oatley S.J., Langridge R., Ferrin T.E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* 161 : 269–88.
- [29] Apfel C. M., Locher H., Evers S., Takács B., Hubschwerlen C., Pirson W., Page M. G. P. and Keck W. 2001. Peptide deformylase as an antibacterial drug target: target validation and resistance development. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 : 1058-1064.
- [30] B. Daunay. Couplage haptique pour des applications de docking moléculaire. Edition Robotique : Paris 6, P150. 2007.,
- [31] Schrödinger, Portland, OR 97201
- [32] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.-C.; Leach, A.-R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking *J. Mol. Biol.* 1997, 267, 727-748.
- [33] Kontoyianni, M.; McClellan, L.; Sokol, G.S. Evaluation of docking performance
- [34] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, et al the protein data bank nucleic acid research 2000, 28:235-242.
- [35] Kerrouch I, Benguedouar F Etude in silico de l'inhibition de la dihydroorotate deshydrogenase de Plasmodium falciparum dans le cas du paludisme mémoire de master en biochimie option : analyse protéomique et santé Constantine. Université Constantine 1 Algérie 2011. 31p comparative data on docking algorithms *J. Med. Chem.* 2004, 47, 558-565
- [36] Warren G. L., Andrews C.W., Capelli A. M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S. F., Senger S., Tedesco G., Wall I.D., Woolven J. M., Peishoff C. E., Head M. S. 2006. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring

- Functions. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49: 5912-5931.
- [37] Warren G. L., Andrews C.W., Capelli A. M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S. F., Senger S., Tedesco G., Wall I.D., Woolven J. M., Peishoff C. E., Head M. S. 2006. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49: 5912-5931.
- [38] Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 2002; 47: 409-443.
- [39] Vieth M., Hirst J D., Kolinski A., Brooks CL. 1998. Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.* 19 : 1612-1622
- [40] Gabb J., Jackson R.M., Sternberg M.J.E. 1997. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* 272 : 106-120
- [41] Verkhivker G.M., Bouzida D., Gehlhaar D.K., Rejto P.A., Arthurs S., *et al.* 2000. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 14 : 731-751.
- [42] Taylor R.D., Jewsbury P.J., Essex J.W. (2002) A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput Aided Mol. Des.* 16:151-166
- [43] d'évaluation Gohlke H., Klebe G. (2001) Statistical potentials and scoring functions applied to protein-ligand binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:231-235
- [44] (Kellenberger et al. 2004). Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D. (2004) Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins* 57:225-242
- [45] Maréchal, Y. The hydrogen bond and the water molecule Elsevier Science & Technology 2007.
- [46] Interactions électrostatiques - Université Virtuelle Paris 5 [En ligne] www.medatice-grenoble.fr
- [47] Jay A., Jain N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *J Comput Aided Mol Des.* 2007, 21:281-306.
- [48] Protein Data Bank (PDB) Biological Macromolecular Resource <http://www.rcsb.org/pdb/> page Consulté le 24/3/2014.
- [49] Hansch. C. and T. Fujita, r-s-p Analysis; method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 1964. 86(8): p. 1616- 26.
- [50] Miteva M.A., Violas S., Montes M., Gomez D., Villoutreix B. O. FAF-Drugs: free ADME/tox filtering of compound collections. *Nucleic Acids Research* . 2006 ; 34: 738-744.
- [51] Molinspiration. [En ligne]. <http://www.molinspiration.com/>. Consulté le : [15/05/2015].

ANNEXES

ANNEXE 1

❖ L'affinité des composés mono –substitués

<i>Composé</i>	<i>Affinité (M⁻¹).pdb</i>
1	3,11
2	3,23
3	2,90
4	3,52
5	3,13
6	3,06
7	2,61
8	3,16
9	3,50
10	3,49
11	3,41
12	5,71
13	2,71
14	4,35
15	4,24

❖ L'affinité des composés bi -substitués.

<i>Composé</i>	<i>Affinité (M⁻¹).pdb</i>
16	3,45
17	3,82
18	3,26
19	3,19
20	3,38
21	3,50
22	2,68
23	4,95
24	2,77
25	3,05
26	3,26
27	3,39
28	3,09
29	3,61
30	3,85
31	4,48
32	4,96
33	5,29
34	5,06

ANNEXE 2

➤ *Liste de 133 complexes et leur RMSD utilisés pour tester le programme Surfex.*

NUMERO	CODE SUIVANT DE PDB	AFFINITE (M ⁻¹)	RMSD (A°) Surfex
1	3PTB	-0,82	10,422
2	2OHL	4,05	0,983
3	3KMX	-2,19	7,158
4	2ZHR	-3,53	8,737
5	3LHG	5,26	1,864
6	3L38	6,30	0,835
7	3OOZ	6,76	0,789
8	4KE1	4,86	2,035
9	4RCD	3,15	4,601
10	4RCE	5,56	1,243
11	4WTU	11,41	0,856
12	4RCF	6,58	0,426
13	2ZJH	4,79	1,543
14	2ZJJ	7,10	0,213
15	4R8Y	5,64	1,982
16	4FRI	2,81	0,976
17	4FRJ	2,24	0,530
18	4FRK	5,52	2,154
19	3VG1	9,71	0,733
20	4XKX	2,64	5,381
21	3VF3	8,97	0,439
22	4D85	8,98	0,906
23	4D88	9,49	1,475
24	4D89	9,43	1,666
25	3RSX	6,74	0,287
26	3RTH	5,09	1,922
27	3VEU	13,05	0,794
28	3RTM	5,10	1,601
29	3RU1	5,82	1,473
30	3RTN	7,92	0,932
31	3RSV	5,76	1,135
32	3RSX(1)	6,74	0,287
33	2ZJN	2,93	2,031

ANNEXES

34	2ZJK	9,66	1,076
35	2ZJI	4,31	1,202
36	2ZJM	6,35	0,960
37	3VV6	5,50	1,012
38	3VV7	4,34	1,653
39	3ZLQ	4,98	1,627
40	3VV8	3,82	0,142
41	4FRS	2,69	2,571
42	4RRN	2,25	5,176
43	4PZX	3,05	5,709
44	4PZW	2,84	2,027
45	4N00	3,42	0,051
46	4IVS	7,57	1,980
47	3S7M	4,25	2,063
48	3S7L	5,87	1,917
49	4HA5	4,79	2,157
50	3WB4	3,96	1,695
51	4K9H	-4,86	22,144
52	3VV6(1)	5,50	1,012
53	4DJU	2,67	1,776
54	4DJW	3,55	0,135
55	2VJ9	9,78	0,98
56	2XEJ	13,31	0,965
57	2IQG	11,68	1,788
58	1FKN	0,66	1,634
59	4J00	3,52	1,507
60	4JP9	4,11	5,208
61	4JPC	4,49	4,951
62	4JPE	3,66	0,126
63	4LXM	3,41	5,288
64	3DUY	23,13	1,683
65	4DVF	-22,13	0,452
66	4H1E	10,24	0,814
67	4H3F	5,16	1,764
68	4H3G	5,62	1,119
69	4H3I	5,23	1,813
70	4H3J	3,96	0,789

ANNEXES

71	4L7G	4,07	0,115
72	4R5N	3,28	2,633
73	4RRO	5,62	1,371
74	4RRS	3,59	7,257
75	3MSK	5,14	1,586
76	4B00	6,29	0,474
78	4B0Q	6,13	2,780
79	4DPF	3,93	0,522
80	4DPI	3,53	1,654
81	4X7I	4,76	2,071
82	4B72	5,84	0,139
83	3UDM	3,98	1,740
84	3NSH	17,29	1,308
85	3UDJ	1,25	0,969
86	3UDN	5,41	1,274
87	3UDR	6,12	1,273
88	4B77	5,99	0,882
89	4B78	4,03	2,221
90	4FS4	3,70	1,847
91	4LC7(1)	3,76	1,436
92	2VNN	8,09	1,088
93	2VNM	8,09	1,088
94	2WJO	4,32	1,707
95	2XFI(1)	2,31	2,280
96	4ACU	3,50	2,960
97	4ACX	3,10	1,580
98	3K5G	31,29	1,927
99	4GMI	13,03	1,261
100	2HM1	10,24	1,003
101	2VA6	5,15	0,180
102	2VA7	5,51	1,294
103	2WF2	12,75	0,721
104	2VIE	13,57	1,100
105	2VIJ	15,05	1,800
106	2VIY	15,71	0,571
107	2WF4	14,54	0,618
108	2VIZ	7,22	1,768
109	2VJ6	9,55	1,125

110	2VJ7	12,89	0,721
111	2WFO	12,51	1,131
112	2WEZ	14,79	1,475
113	2WF1	11,13	0,627
114	4FM8	0,78	0,284
115	4EWO	5,66	1,550
116	4DUS	9,93	0,906
117	2XFK	17,85	0,677
118	4DH6	6,76	1,560
119	1UJK	3,57	4,985
120	2XFL	2,36	3,44
121	3ZOV	-0,23	4,965
122	2XFJ	13,31	0,965
123	2VA5	6,29	1,495
124	4WTU(1)	11,41	0,856
125	4KE1(1)	4,86	2,035
126	2ZJL	3,60	6,462
127	4H1E(1)	10,24	0,814
128	3MSK(1)	5,14	1,586
129	2WF2(1)	12,75	0,751
130	2VA7(1)	5,51	1,294
131	2WJ0	4,42	0,419
132	2B0Q	6,13	2,780
133	2VNN(1)	8,09	1,088

ANNEXE 3

➤ *Liste de 133 complexes et leur RMSD utilisés pour tester le programme Surfex .*

<i>Les Similaires</i>	<i>AFFINITE (M⁻¹)</i>
(4-methylquinolin-2-yl)azanuim	1,37
2(1H)-Quinolinimine	2,38
2-AMINOQUINOLINE	3,53

ANNEXES

2-amino quinoline-3-carboximidamide	2,30
2-quinolin-2-ylguanidine	2,81
3,4-didehydroquinolin-2-amine	3,47
3,4-dimethylquinolin-2-amine	3,28
3-ethylquinolin-2-amine	3,25
3-methylquinolin-2-amine	2,90
3-pentylquinolin-2-amine	2,33
3-prop-2-enylquinolin-2-amine	3,57
3-propylquinolin-2-amine	3,51
4-(2-methylpropyl)quinolin-2-amine	2,76
4-(2-methylpropyl)quinolin-2-amine	2,76
4-ethylquinolin-2-amine	3,04
4-methylquinolin-2-amine	2,87
4-pentylquinolin-2-amine	1,86
5,7-difluoroquinolin-2-amine	2,96
6,7-difluoroquinolin-2-amine	2,43
6,8-difluoroquinolin-2-amine	4,61
7,8-difluoroquinolin-2-amine	2,76
7-fluoroquinolin-2-amine	2,59
8-ethyl-4-methylquinolin-2-amine	2,02
8-fluoroquinolin-2-amine	2,77
8-iodoquinolin-2-amine	2,20
8-propylquinolin-2-amine	2,33
N-bromoquinolin-2-amine	1,85
N-chloroquinolin-2-amine	1,19
N-fluoroquinolin-2-amine	1,33
N'-quinolin-2-ylethanimidamide	2,17
N'-quinolin-2-ylethanimidamide	2,19
Quinoline-2,4-diamine	2,05

RESUMES

ABSTRACT

The objective of our work was to develop in silico new inhibitors of β -secretase enzyme involved in Alzheimer's disease.

We used for this Surflex the molecular docking program after confirmation of its reliability by the following three tests: the RMSD, visual analysis and the correlation coefficient.

The inhibitory activity of 2AQ compound or 2-amino-quinoline (4.05 M^{-1}), natural inhibitor of the enzyme could be improved through a widely used approach in the field of rational design of drugs: mono substitution, Bi substitution and the use of similar compounds.

We obtained an improvement in the affinity for six molecules of which mono-substituted 3 (12, 14 and 15), bi-substituted 2 (33 and 34) and a similar compound (20). The best affinity, 5.71 M^{-1} , with that of compound 12.

Therefore, we offer these six compounds as potential new inhibitors of the enzyme, however, in vitro and in vivo tests are needed to validate these results.

It should finally be noted that all these proposed compounds meet the criteria imposed by the rule of Lipinski.

Key words: Molecular Docking, Surflex, Affinity, the RMSD, visual analysis and correlation coefficient, 2AQ, β -secretase.

وكان الهدف من عملنا لتطوير مثبطات جديدة في سيليكون شسيلاتتمكط بط - سيكريطاز من انزيم المعنية في مرض الزهايمر.

استخدمنا لهذا سيرفلكس برنامج الالتهام او الارشاء الجزيئي بعد التأكد من موثوقيتها من الاختبارات الثلاثة التالية: جذر متوسط مربع الانحراف. ، التحليل البصري ومعامل الارتباط.

ويمكن تحسين النشاط المثبطة للمركب 2-الأمين كينولين (4.05)، مثبت طبيعي للأنزيم من خلال النهج المتبع على نطاق واسع في مجال التصميم الرشيد للأدوية: استبدال أحادي، واستبدال بي واستخدام مركبات مماثلة حصلنا على حدوث تحسن في تقارب لمدة ستة جزيئات منها 3 استبدال أحادي (12 و 14 و 15)، 2ثنائية الاستبدال 2 (33 و 34) ومركب مماثل (20). أفضل تقارب، 5.71 مع مجمع (12).

ولذلك، ونحن نقدم هذه المركبات ستة باسم مثبطات جديدة محتملة للأنزيم، ولكن في التجارب المختبرية والتجارب المجراة هناك حاجة للتحقق من صحة هذه النتائج.

و ينبغي أخيرا تجدر الإشارة إلى أن جميع هذه المركبات المقترحة تفي بالمعايير التي تفرضها سيادة بينسكي

الكلمات الرئيسية الإرساء الجزيئية، سرفلك، الألفة، جذر متوسط مربع الانحراف، التحليل البصري و معامل

الارتباط 2-الأمين كينول ، بط - سيكريطاز

L'objectif de notre travail a été de développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la β -sécrétase, enzyme engagée dans la maladie d'Alzheimer.

Nous avons utilisé pour cela le programme de docking moléculaire Surflex après confirmation de sa fiabilité par les trois tests suivants : le RMSD, l'analyse visuelle et le coefficient de corrélation.

L'activité inhibitrice du composé 2AQ ou 2- amino-quinoline ($4,05 \text{ M}^{-1}$), inhibiteur naturel de l'enzyme, a pu être améliorée grâce à une approche très utilisée dans le domaine de la conception rationnelle des médicaments : la mono substitution, la bi substitution et l'utilisation de composés similaires.

Nous avons obtenu une amélioration de l'affinité pour six molécules dont 3 mono-substituées (12, 14 et 15), 2 bi-substituées (33 et 34) et un composé similaire (20). La meilleure affinité, $5,71 \text{ M}^{-1}$, étant celle du composé 12.

De ce fait, nous proposons ces six composés comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme, cependant des tests *in vitro* et *in vivo* sont indispensables pour valider ces résultats.

Il faut enfin noter que tous ces composés proposés sont conformes aux critères imposés par la règle de Lipinski.

Mots clés : Docking moléculaire, Surflex, Affinité, le RMSD, l'analyse visuelle et le coefficient de corrélation, 2AQ, β -sécrétase.

Présenté par
CHAIB ESMA
GUEMMOUR SELMA

Dirigé par : Pr CHIKHIA

Soutenu le : 15/06/2014

Thème

INHIBITION DE LA BETA-SECRETASE 1, ENZYME CLEF DE LA MALADIE D'ALZHEIMER, PAR LA METHODE DU DOCKING MOLECULAIRE.

Résumé :

L'objectif de notre travail a été de développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la β -sécrétase, enzyme engagée dans la maladie d'Alzheimer.

Nous avons utilisé pour cela le programme de docking moléculaire Surflex après confirmation de sa fiabilité par les trois tests suivants : le RMSD, l'analyse visuelle et le coefficient de corrélation.

L'activité inhibitrice du composé 2AQ ou 2- amino-quinoline ($4,05 \text{ M}^{-1}$), inhibiteur naturel de l'enzyme, a pu être améliorée grâce à une approche très utilisée dans le domaine de la conception rationnelle des médicaments : la mono substitution, la bi substitution et l'utilisation de composés similaires.

Nous avons obtenu une amélioration de l'affinité pour six molécules dont 3 mono-substituées (12, 14 et 15), 2 bi-substituées (33 et 34) et un composé similaire (20). La meilleure affinité, $5,71 \text{ M}^{-1}$, étant celle du composé 12.

De ce fait, nous proposons ces six composés comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme, cependant des tests *in vitro* et *in vivo* sont indispensables pour valider ces résultats.

Il faut enfin noter que tous ces composés proposés sont conformes aux critères imposés par la règle de Lipinski.

Mots clés : Docking moléculaire, Surflex, Affinité, le RMSD, l'analyse visuelle et le coefficient de corrélation, 2AQ, β -sécrétase.

Devant le jury:

Président : BENSEGUENI A.

Rapporteur : CHIKHI A.

Examineur : MOKRANI E .H.

Professeur à Université Constantine 1.

Professeur à Université Constantine 1.

Maître assistant à l'Université Constantine 1.