



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 :

Contribution à la mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase par docking moléculaire.

Présenté et soutenu par : **Farouk CHIBAT et Abdelaziz GUECHIRI**

Le : 15/06/2015

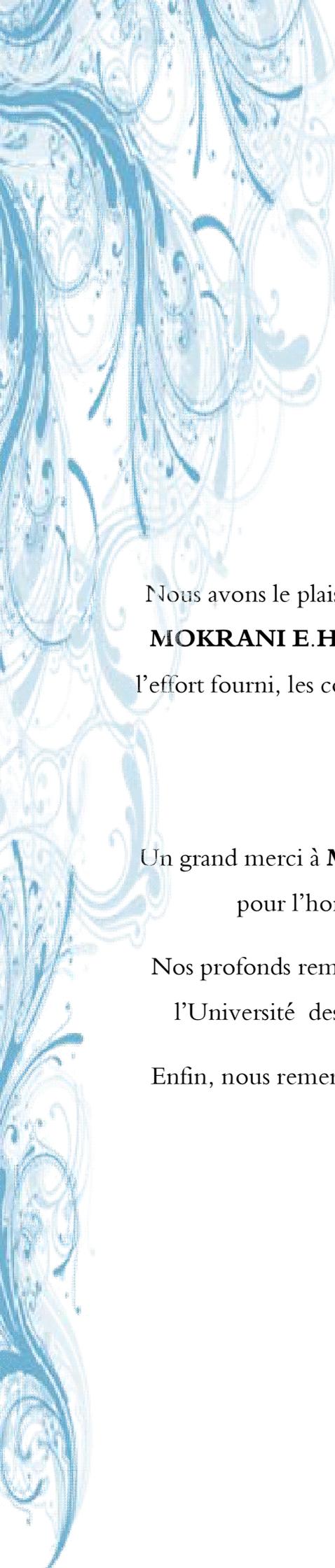
Jury d'évaluation :

Président du jury : **CHIKHI A.** (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : **MOKRANI E.H.** (Maître assistant «A» - UFM Constantine).

Examineurs : **BENSEGUENI A.** (Professeur - UFM Constantine).

Année universitaire : 2014 – 2015



REMERCIEMENTS

Nous avons le plaisir d'exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Mr **MOKRANI E.H.** Maître assistant «A» à l'Université des frères Mentouri pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi de ce travail.

Merci encore **Mr MOKRANI.**

Un grand merci à **Mr .CHIKHI A.** professeur à l'Université des frères Mentouri pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider ce Jury.

Nos profonds remerciements vont aussi à **Mr .BENSEGUENI A.** professeur à l'Université des frères Mentouri, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, nous remercions toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.



Table des matières

Introduction.....1

Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer

1. Epidémiologie3

2. Symptômes et évolution de la maladie.....3

3. Les facteurs de risque de l'Alzheimer.....4

 3.1.L'âge.....4

 3.2. Les antécédents familiaux et la génétique4

 3.3.Le Sexe4

 3.4.Les maladies cardiovasculaires.....5

 3.5. Le diabète5

 3.6.Le syndrome de Down5

 3.7.La déficience cognitive légère (DCL).....5

 3.8.Les lésions à la tête.....6

4. Le traitement de la maladie d'Alzheimer6

 4.1.Les antiglutamates.....7

 4.2.Les anticholinestérasiques.....7

Chapitre 2 :Les structures mises en jeu

1. Introduction.....8

2. Description structurale de l'Acétylcholinestérase.....9

3. Rôle physiologique.....10

4. Le site actif et la triade catalytique13

 4.1. Le site estérasique.....14

 4.2. Le site anionique.....14

5. Le site périphérique.....14

6. Les inhibiteurs de l'AChE.....	14
6.1. Selon leur origine.....	14
6.1.1. Origine naturel.....	14
6.1.1.1. Les alcaloïdes	14
6.1.1.1.A. Galantamine.....	15
6.1.1.1.B. La Physostigmine.....	15
6.1.1.1.C. Huperzine A.....	15
6.1.1.2. Les flavonoïdes.....	15
6.1.2. semi synthétique.....	15
6.1.2.1. Miotine.....	15
6.1.3. Inhibiteur synthétique.....	16
6.1.3.1. Donepezil.....	16
6.1.3.2. Rivastigmine.....	16
6.1.3.3. Tacrine.....	16
6.2. Selon leur mode d'action.....	17
6.2.1. Inhibiteurs irréversibles.....	17
6.2.2. Inhibiteurs pseudo-irréversibles.....	17
6.2.3. Les inhibiteurs réversibles.....	17
6.2.3.A. Les aminoacridines.....	17
6.2.3.B. Les N-Benzylpiperidines.....	17
6.2.3.C. Les alcaloïdes.....	18

Chapitre 3 : Criblage virtuel

1. Introduction.....	19
2. Criblage virtuel <i>in silico</i>	19
2.A. Le criblage virtuel « ligand-based » (pharmacophore).....	20
2.B. Le criblage virtuel « structure-based »	20
3. Outils du criblage virtuel.....	22
3.1. La cible.....	22
3.2. chimiothèques.....	22
3.2.1. Chimiothèque nationale Française.....	23
3.2.2. Pubchem.....	23
3.2.3.Zinc.....	23
3.3. Le programme.....	23

Chapitre 4 : Matériels et Méthodes

1. Matériels.....	25
1.1.Microordinateur.....	25
1.2.Programmes.....	25
2. Méthode.....	25
2.1.préparation du récepteur.....	25
2.2.Préparation des ligands.....	26
2.3.Criblage virtuel avec AutoDock vina.....	26
2.4.Analyse des résultats.....	26
3. Filtrage des meilleurs inhibiteur.....	27

Chapitre 5 : Résultats et Discussions

1. Tests de fiabilité du programme de docking.....	29
1.2. L'analyse visuelle.....	29
1.3. Coefficient de corrélation (r).....	30
1.4. Conclusion.....	33
2. Etude des interactions AChE-anti cholinestérase par PyRx.....	33
2.1.Composé 1.....	33
2.2.Composé 2.....	33
2.3.Composé 3.....	34
2.4.Composé 4.....	35
2.5.Filtrage ADME/Tox.....	35
2.6.Conclusion.....	36
3. proposition de nouveaux inhibiteurs de la AChE.....	36
3.1.Criblage virtuel d'une collection DE molécules.....	36
4. Filtrage ADME/Tox	39
5. Conclusion	41

Liste des tableaux

<u>Tableau N° 1</u> : Corrélation entre les énergies d'interaction des 43 inhibiteurs de l'ACHé et leur activité biologique (IC ₅₀).....	29
<u>Tableau N° 2</u> : Critères de la règle de Lipinski pour les inhibiteurs étudiés.....	35
<u>Tableau N° 3</u> : Energie d'interaction des meilleurs similaires envers l'ACHé.....	36
<u>Tableau N° 4</u> : Critères de la règle de Lipinski pour les composés 201 et 209.....	39

Liste des figures

<u>Figure N°1</u> : représentation graphique montre le pourcentage des cas d'Alzheimer en fonction de l'âge.....	4
<u>Figure N°2</u> : la réaction entre le neurotransmetteur et la cholinestérase.....	8
<u>Figure N°3</u> : Représentation schématique en ribbon de la structure 3-D du monomère de T. Californica AChE.....	9.
<u>Figure N°4</u> : Représentation schématique de la structure 3D du AChE.....	10
<u>Figure N°5</u> : la réaction entre AChE et Acétylcholine.....	11
<u>Figure N°6</u> : Représentation schématique du mécanisme d'action de la AChE.....	12
<u>Figure N°7</u> : La synthèse de la miotine à partir de la physostigmine.....	16
<u>Figure N°8</u> : Déroulement d'une expérience de criblage virtuel par docking.....	21
<u>Figure N°9</u> : Position de la boîte d'amarrage dans le site actif de la 4M0E.....	26
<u>Figure N°10</u> : Superposition des géométries des quatre inhibiteurs obtenues par cristallographie (colorées en violet) et par docking avec Vina (colorées en vert).....	29
<u>Figure N°11</u> : Corrélation entre l'activité biologique (IC50) de 44 ligands et leur énergie d'interaction vis-à-vis de l'AChE.....	30
<u>Figure N°12</u> : Structure du composé 1.	31
<u>Figure N°13</u> : Structure du composé 2.	31
<u>Figure N°14</u> : Structure du composé 3.	32
<u>Figure N°15</u> : Structure du composé 4.	32
<u>Figure N°16</u> : Mode d'interaction du composé 1 dans le site actif de l'AChE.....	32
<u>Figure N°17</u> : Mode d'interaction du composé 2 dans le site actif de l'AChE.....	33
<u>Figure N°18</u> : Mode d'interaction du composé 3 dans le site actif de l'AChE.....	33

Liste des figures

<u>Figure N°19</u> : Mode d'interaction du composé 4 dans le site actif de l'AChE.....	34
<u>Figure N°20</u> : Mode d'interaction de la molécule 201 dans le site actif de l'AChE.....	37
<u>Figure N°21</u> : Structure du composé 201.....	37
<u>Figure N°22</u> : Mode d'interaction de la molécule 209 dans le site actif de l'AChE.....	38
<u>Figure N°23</u> : Structure composé 209.....	38

Liste des abréviations

3D: Trois dimensions.

2D: Deux dimensions.

Å: Angström.

ACh: acétylcholine.

AChE: Acétylcholinestérase.

AM 1: La méthode semi-empirique Austin Model 1.

AVC : Accident vasculaire cérébrale.

BuChE: butyryl-cholinestérase.

DCL: La déficience cognitive légère.

FDA: Food and Drug Administration

FFMA : La forme familiale de la maladie d'Alzheimer.

HTS: highthroughput screening.

IC₅₀ : inhibitory concentration 50.

KDa: Kilo Dalton.

Kcal : Kilo calorie.

Log P : coefficient de partage octanol/eau.

LCR : liquide Céphalo Rachidien.

PAS: periphericanionic site.

PDB: Protein Data Bank.

PM: Poids Moléculaire.

RMSD: RootMean Square Deviation.

THS: Le traitement hormonal substitutif.

TMA: tétraméthylammonium.

Introduction

Avec le vieillissement de la population, la maladie d'Alzheimer est devenue un problème majeur de santé publique. C'est une maladie neuro-dégénérative des tissus cérébraux entraînant la perte progressive et irréversible des fonctions mentales. Principale cause de démence chez les personnes âgées, la maladie d'Alzheimer touche environ 24 millions de personnes à travers le monde [1].

De nombreuses études indiquent que les lésions engendrées lors de la maladie d'Alzheimer touchent principalement les voies cholinergiques. Il en résulte une diminution parfois massive des taux de neurotransmetteurs circulant dans le cerveau. Le déficit en acétylcholine peut atteindre jusqu'à 90% dans les stades sévères de la maladie et concerne le néocortex, l'hippocampe, le noyau basal de meynert, le striatum et le thalamus [2]. Pour compenser le déficit en Acétylcholine, les médecins font habituellement appel aux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Ces molécules empêchant la dégradation de l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique ont montré leur efficacité en soulageant quelques symptômes liés à la maladie d'Alzheimer [3]. C'est à cette approche du traitement par inhibition de l'AChE que nous nous intéressons dans le présent travail.

Afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de l'AChE, nous avons fait appel aux approches par criblage virtuel *in silico*. Ces méthodes consistent à prédire l'affinité d'un très grand nombre de molécules (collectées en chimiothèques) pour le site actif ciblé, ce qui est plus facile à mettre en œuvre pour un coût bien moindre que les criblages expérimentaux. Initié au début des années 1980, le criblage virtuel s'est développé pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs car les industries pharmaceutiques consacrent près de 10% de leur budget à la recherche de médicaments assistée par ordinateur. Parmi les logiciels de criblage virtuel, nous citons Gold, Glide, FlexX et AutoDock Vina [4]. Ce dernier a été utilisé, dans le présent travail, afin de proposer de nouveaux inhibiteurs de l'AChE par criblage virtuel.

L'objectif du présent travail est, dans un premier temps, de tester la fiabilité du programme AutoDock vina au moyen de deux tests. Le premier test consiste à analyser visuellement les poses des inhibiteurs de l'AChE simulées par le logiciel en les comparant avec celles déterminées expérimentalement par cristallographie. Le deuxième test consiste à déterminer le coefficient de corrélation linéaire existant entre les valeurs expérimentales de l'IC50 des molécules retenues dans cette étude et leur énergie d'interaction simulée par Vina.

Dans un deuxième temps, nous avons jugé utile d'étudier les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de l'AChE par divers molécules tout en évaluant leur énergie d'interaction. Ce nous permettra de déterminer l'inhibiteur le plus puissant envers l'AChE connu jusqu'à présent et qui servira, dans une dernière partie, comme structure de départ pour la conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs encore plus puissants et sélectifs envers l'AChE. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous permettra de nous renseigner sur les propriétés pharmacocinétique (parfois désignée sous le nom de « l'ADME ») des composés proposés.

Chapitre 1 :

La maladie d'Alzheimer



La maladie d'Alzheimer, est 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. Ainsi, les symptômes engendrés s'aggravent avec le temps. La nature neurodégénérative de la maladie d'Alzheimer se traduit par des lésions histopathologiques bien précises qui sont les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires et qui sont associées à une perte neuronale avec atrophie corticale. Ces lésions cérébrales, dont l'association est caractéristique de la maladie, sont décrites pour la première fois en 1907 par Aloïs Alzheimer [1].

1. Epidémiologie :

La maladie d'Alzheimer est désormais en passe de devenir un véritable fléau qui ronge de plus en plus la santé des personnes âgées aux quatre coins du monde. Première cause de démence des sujets âgés, cette maladie est responsable de 75 % de l'ensemble des démences soit près de 35,6 millions de personnes [5]. Si rien n'est fait pour lutter contre cette maladie, cette prévalence devrait doubler d'ici à 2030 (65,7 millions) et tripler d'ici à 2050, dépassant les 110 millions de personnes atteintes [6]. En Algérie, près de 100 000 personnes sont atteintes cette maladie. Une étude effectuée en 2004 par des neurologues et des psychologues a montré que parmi 3 000 personnes, toutes âgées de plus de 65 ans, qui se sont présentées au CHU de Bab-El- Oued pour diagnostic, 30% souffraient de troubles de la mémoire [7]. Ces chiffres alarmants expliquent en partie les raisons ayant motivé notre choix d'étudier la maladie d'Alzheimer dans le cadre de la réalisation de notre mémoire de master.

2. Symptômes et évolution de la maladie :

L'Alzheimer commence toujours par une phase asymptomatique qui peut durer plus de 20 ans, au fur et à mesure qu'elle affecte les régions du cerveau, elle va entraîner la perte de certaines fonctions ou habiletés [2]. Le début est insidieux; marqué par l'installation progressive de troubles mnésiques, phasiques, de problèmes de praxies et de gnosies ainsi que par une atteinte des fonctions exécutives. Il existe également des manifestations psycho-comportementales associées aux troubles cognitifs perturbations de l'humeur (anxiété, dépression), instabilité psychomotrice, hallucinations, idées délirantes. La durée moyenne de son évolution est de 5 à 9 ans, à terme, la maladie provoque une détérioration de l'état général [8]. Les troubles des conduites alimentaires et les difficultés de déglutition sont souvent à l'origine d'un amaigrissement important avec altération des défenses immunitaires. Cela favorise les complications infectieuses qui sont souvent à l'origine du décès [9].



3. Les facteurs de risque de l'Alzheimer:

3.1.L'âge :

En vieillissant, les mécanismes naturels de réparation de l'organisme sont moins efficaces. Ce changement se produit dans le cerveau à différents rythmes selon les personnes et ces différences contribuent à la susceptibilité d'une personne de développer la maladie d'Alzheimer avec l'âge [5] (voir la figure N° 1).



Figure N° 1 : représentation graphique montrant le pourcentage des cas d'Alzheimer en fonction de l'âge.

3.2.Les antécédents familiaux et la génétique :

Un faible pourcentage (5 à 7 %) des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ont la forme « familiale » de cette maladie (FFMA) (autrefois appelée « forme précoce de la maladie d'Alzheimer »). À un moment donné de l'histoire familiale, certains gènes ont subi une mutation et ont développé les caractéristiques anormales qui causent la FFMA. Ces gènes héréditaires ont une grande influence: si l'un des parents a la FFMA, chacun des enfants aura une probabilité de 50% d'hériter de la maladie. Si les deux parents ont la FFMA, tous leurs enfants développeront la maladie d'Alzheimer à l'âge adulte [10].

3.3.Le Sexe :

Deux fois plus de femmes que d'hommes ont la maladie d'Alzheimer. Certains pensent que ceci est attribuable en grande partie aux changements hormonaux qui surviennent à la ménopause, particulièrement la diminution de l'œstrogène, une hormone importante.



Auparavant, on prescrivait souvent de l'œstrogène pour soulager les symptômes de la ménopause et réduire le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Toutefois, une étude clinique à grande échelle assez récente recommandait d'interrompre le traitement hormonal substitutif (THS) en raison de ses effets secondaires potentiellement dangereux. Plusieurs chercheurs cliniques considèrent cependant que le THS devrait faire l'objet d'études plus poussées dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Toute décision quant à son usage devrait être faite en consultation avec un médecin [10].

3.4. Les maladies cardiovasculaires :

Tous les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (comme l'hypertension et l'hypercholestérolémie) sont aussi des facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer et de la maladie cérébro-vasculaire. Les AVC et les « mini-AVC », généralement détectés lors d'exams ultérieurs, sont aussi des facteurs de risque bien établis pour la maladie d'Alzheimer et la maladie cérébro-vasculaire [10].

3.5. Le diabète :

On sait depuis plusieurs années que le diabète de type 2 (diabète adulte) est un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. On croyait généralement que ces deux maladies étaient liées aux problèmes cardiaques, qui sont associés au diabète et constituent des facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer. On savait aussi que le glucose était moins bien assimilé dans le cerveau des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, une situation similaire aux diabétiques de type 2, dont l'organisme assimile mal le glucose [10].

Les chercheurs ont en effet découvert que chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, la production d'insuline dans le cerveau est réduite et que les neurones y sont moins sensibles (la production de l'insuline dans le cerveau est indépendante de la production de l'insuline dans le pancréas, le principal organe de production d'insuline).

3.6. Le syndrome de Down :

Le cerveau de la plupart des adultes atteints du syndrome de Down qui atteignent la quarantaine développera les changements anormaux caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (plaques et écheveaux) [10].

3.7. La déficience cognitive légère (DCL) :

Dans la DCL, le niveau de détérioration cognitive et/ou des troubles de la mémoire est supérieur à celui enregistré dans le processus normal de vieillissement, mais il n'est pas suffisamment avancé pour qu'on puisse parler d'Alzheimer ou de maladie apparentée. On



estime que 85 % des personnes qui ont reçu un diagnostic de DCL, généralement au début de la quarantaine ou de la cinquantaine, développeront la maladie d'Alzheimer dans les dix années suivantes, ce qui fait de la DCL un facteur de risque important. Les chercheurs savent maintenant que les changements cérébraux anormaux qui caractérisent la maladie d'Alzheimer peuvent commencer à apparaître chez les personnes qui ont reçu un diagnostic de DCL au moins 20 ans avant tout signe visible d'Alzheimer ou de maladie apparentée. L'imagerie cérébrale pourrait permettre de repérer les personnes atteintes de DCL les plus à risque de développer la maladie [10].

3.8. Les lésions à la tête :

Les lésions à la tête, notamment les commotions à répétition, sont considérées par la plupart des cliniciens comme des facteurs de risque de développement ultérieur de la maladie d'Alzheimer.

En plus des facteurs de risque précités, tous les éléments suivants ont été recensés comme facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer : les inflammations chroniques (indiquant possiblement une défaillance du système immunitaire), des épisodes passés de dépression clinique, le stress et le manque d'exercice du cerveau. D'autres facteurs de risque comme le tabagisme, la consommation excessive d'alcool et les toxicomanies restent moins fondés [10].

4. Le traitement de la Maladie d'Alzheimer :

Dans l'état actuel des connaissances de la médecine, aucun traitement curatif ne permet de guérir de la maladie d'Alzheimer, encore moins pour la prévenir. Cependant, certains médicaments ont la capacité de ralentir parfois la progression des symptômes de la maladie, tels que la perte de mémoire, les problèmes de langage et de raisonnement et les difficultés motrices. Ces traitements peuvent améliorer la qualité de vie durant plusieurs années. Leur efficacité est très variable d'une personne à l'autre et les effets secondaires peuvent également être importants. Certaines personnes ne réagissent pas du tout à ces médicaments. A l'heure actuelle, il existe une dizaine de médicaments commercialisés à travers le monde appartenant à deux grandes familles à savoir : les antiglutamates et les anticholinestérasiques [11].



4.1. Les antiglutamates :

Cette classe thérapeutique, apparue en 2002, ne contient qu'un seul médicament : la mémantine (Ebixa®). Il est indiqué chez les patients plus avancés, des stades modérément sévère à sévère de la maladie d'Alzheimer [11].

Les antiglutamates visent à bloquer les récepteurs du glutamate, molécule responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ils ont pour effet de retarder la perte des fonctions cognitives allant parfois jusqu'à les améliorer chez certains patients. On note aussi des effets positifs sur les activités quotidiennes et les troubles du comportement. La mémantine est par ailleurs bien tolérée par les malades [11].

4.2. Les anticholinestérasiques :

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par des lésions du cerveau (plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires). Ces lésions sont accompagnées d'une diminution de l'acétylcholine. Ce dernier est un neurotransmetteur qui permet aux neurones de la mémoire de communiquer. Les anticholinestérasiques ont pour action d'empêcher la dégradation de cette molécule [3].

Indiqués dans les formes légères à modérément sévères, les anticholinestérasiques ont montré leur efficacité dans les domaines de la cognition. L'entourage du patient note généralement une amélioration globale, tant au niveau du comportement que dans les gestes quotidiens. En revanche, il n'y a pas d'amélioration significative en termes de mémoire. Les anticholinestérasiques regroupent trois molécules différentes mais de même efficacité : donépézil (Aricept®), galantamine (Reminyl®) et rivastigmine (Exelon®). Ils présentent toutefois des effets indésirables fréquents au niveau digestif (nausées, perte d'appétit, diarrhées) [11]. C'est à cette famille de médicaments que nous nous intéressons dans le présent travail en contribuant à la conception *in silico* de nouveaux anticholinestérasiques par criblage virtuel.

Chapitre 2 :

Les structures mises en jeu



1. Introduction :

La Cholinestérase est une famille d'enzymes qui catalyse l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) pour donner la choline et l'acide acétique (voir figure N° 2) [12].

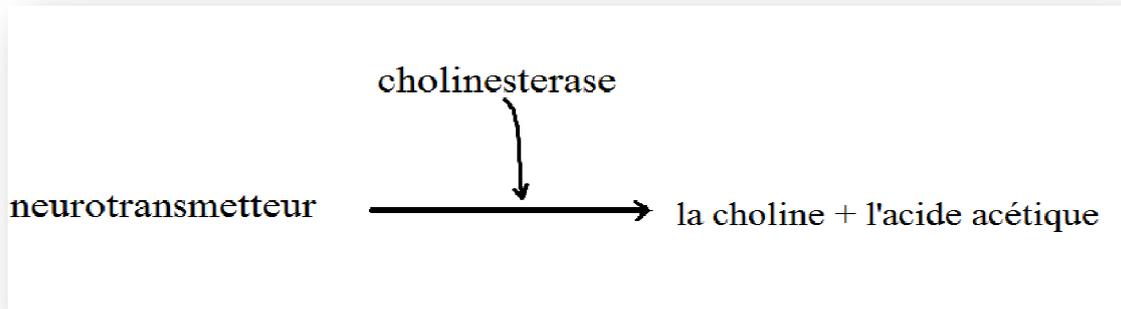


Figure N° 2 : la réaction entre le neurotransmetteur et la cholinestérase.

C'est une réaction nécessaire pour permettre à un neurone cholinergique de revenir à son état de repos après son activation.

Cette famille d'enzymes comporte deux grandes classes :

- **Pseudo-cholinestérase (BuChE) :**

aussi connu comme la cholinestérase plasmatique, butyryl-cholinestérase, ou acylcholine acylhydrolase, se trouve principalement dans le foie. Différent de l'acétylcholinestérase, la BuChE hydrolyse la butyrylcholine plus rapidement que l'acétylcholin [13].h

- **Acétylcholinestérase (AChE) :**

Se retrouve dans de nombreux types de tissus citons les nerfs, les muscles, les tissus centraux et périphériques, les fibres motrices et sensorielles, et cholinergique et enfin les fibres cholinergiques [13].



2. Description structurale de l'Acétylcholinestérase :

L'acétylcholinestérase est une protéase à sérine, regroupant 537 acides aminés (75 kDa), exprimée dans les systèmes nerveux et sanguins des eucaryotes supérieurs. Son rôle physiologique dans les systèmes circulatoires reste encore à élucider contrairement à celui du système nerveux, qui est parfaitement caractérisée. Elle se trouve notamment au niveau des synapses dites cholinergiques utilisant le neurotransmetteur acétylcholine (ACh). De telles synapses sont retrouvées au niveau des jonctions neuromusculaires, ainsi que dans les zones du cortex en charge des fonctions cognitives (mémoire, orientation, jugement...etc.) [14].

L'AChE a été identifiée pour la première fois en 1867 à partir du poison torpille (*Torpedo californica*). La cristallographie aux rayons X nous révèle des informations précieuses sur sa structure tridimensionnelle. En effet, cette enzyme doit être sous forme dimérique pour agir en tant que protéase à sérine. Chaque sous unité contient 11 feuillet- β standards entourés de 15 α -hélices, ainsi que d'une courte portion de feuillet, à l'extrémité N-terminale, qui n'est engagée dans aucune interaction avec le reste de la structure. De même, il est remarqué la présence de 3 courts standard feuillets β qui ne sont pas reliés par des ponts hydrogène au niveau du cœur de l'enzyme (voir figure N°3) [14].

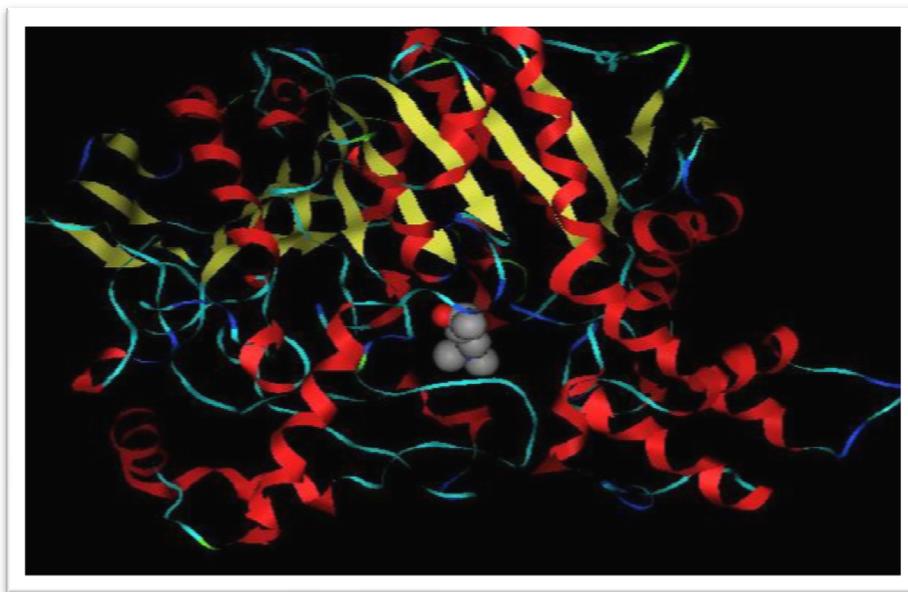


Figure N°3: Représentation schématique en ribbon de la structure 3-D du monomère de *T. Californica* AChE.



Le repliement global de l'enzyme est typiquement celui de la famille des hydrolases. Dans le dimère, les deux monomères sont liés, l'un à l'autre, par un « paquet » de 4 hélices (ou « 4-helix bundle ») : deux hélices de chaque monomère, dont l'hélice C-terminale, participent à la mise en place d'un accolement inter-résidus très stable. Les cystéines C-terminales (Cys537) de chacun des deux monomères établissent entre elles un pont disulfure inter-chaînes qui stabilise la structure quaternaire de l'enzyme. On distingue, dans un monomère d'AChE, deux domaines indépendants l'un de l'autre, et disposé de part et d'autre de la gorge menant au site actif. Ces domaines correspondent en fait aux deux moitiés de la chaîne polypeptidique: le domaine constitué des résidus 1 à 305 s'accrole sur l'autre, constitué des résidus 306 à 537 [14].

L'examen plus détaillé de la structure 3D de l'AChE révèle l'existence de deux zones essentielles pour la catalyse enzymatique : le site périphérique, à l'entrée de la gorge, et le site actif, au fond, où se trouve la machinerie catalytique. Le site actif et le site périphérique seront ainsi deux cibles potentielles en vue de l'inhibition de l'AChE par des composés thérapeutiques (voir figure N°4).

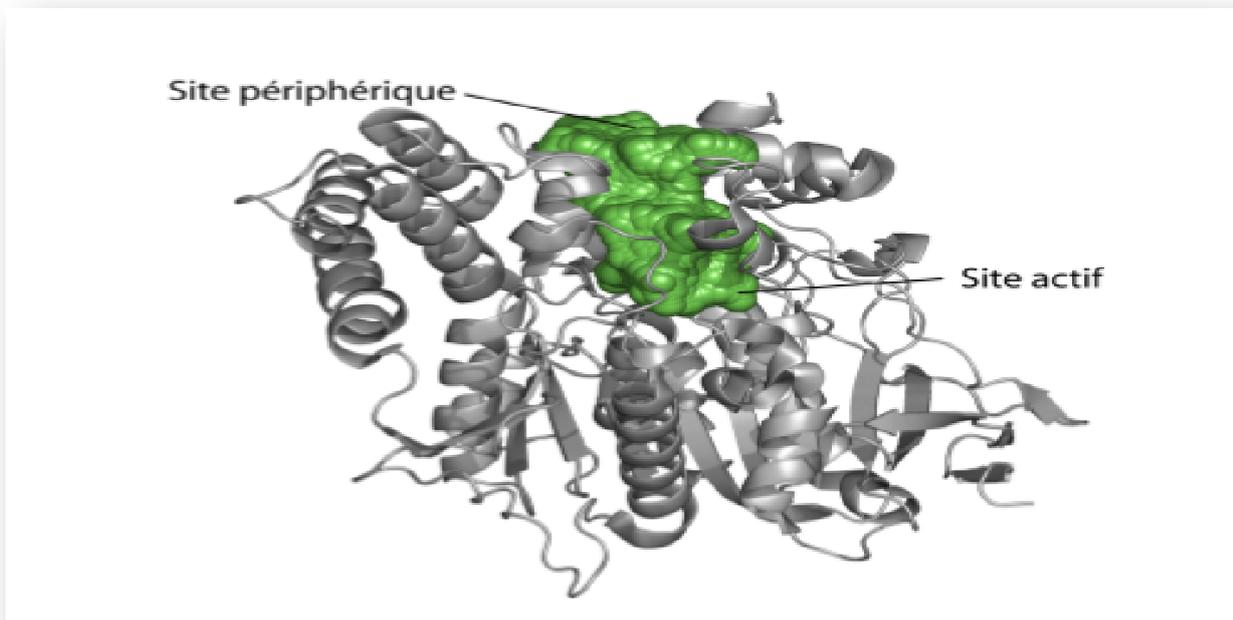


Figure N°4: Représentation schématique de la structure 3D de l'AChE .

3. Rôle physiologique :

L'acétylcholine est un des neurotransmetteurs les plus étroitement impliqués dans les fonctions de stockage en mémoire, la consolidation et le rappel. C'est un messager chimique



clé utilisé par les neurones à transmettre des signaux à l'autre qui souscrivent à notre traitement cognitif ainsi que nos pensées de base. Les niveaux optimaux de l'acétylcholine peuvent contribuer à une meilleure capacité de travail ou de mémoire à court terme, plus grand intelligence fluide, le raisonnement et la pensée logique compétences, pensée créative, fonction exécutive, contrôle de l'attention, ainsi que plus vives rêves la nuit. Après transmission du signal, l'ACh doit être décomposé le plus rapidement possible afin d'éviter la surexcitation des neurones. C'est à ce niveau là qu'intervient l'AChE. La principale fonction physiologique de cette enzyme est de contrôler beaucoup d'excitation cholinergique se produisant dans le cerveau en décomposant rapidement l'excès de l'acétylcholine. Il est important de noter que l'AChE se présente parmi les enzymes les plus rapides existant avec un « turn-over » de 1000 à 20000 molécules par secondes selon l'espèce considérée. Or, plusieurs études ont montré de faibles niveaux d'acétylcholine chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'inhibition de l'AChE contribue sans nul doute, à l'amélioration des niveaux de l'ACh en soulageant ainsi les symptômes liés à la maladie d'Alzheimer (Voir Figure N°5) [15].

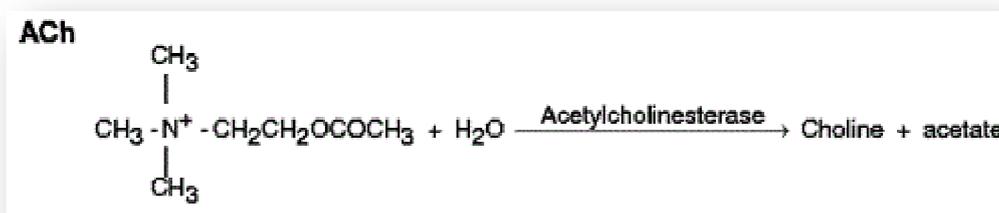


Figure N° 5 : la réaction entre AchE et Acétylcholine.

Le mécanisme d'action de l'acétylcholine-estérase est proche de celui de la chymotrypsine (une enzyme digestive fabriquée au niveau du pancréas et qui donne son nom à une des grandes catégories de protéinases à sérine présentes chez l'Homme). Un résidu à sérine nucléophile réagit avec l'acétylcholine, qui possède un groupement ester formant ainsi un complexe intermédiaire « acétyl-enzyme ». Par la suite il va y'avoir clivage de l'ACh pour libérer la choline en premier lieu. Il reste alors le complexe acétyl-enzyme qui sera hydrolysé dans une dernière étape pour donner l'acide acétique. Les produits de cette réaction sont retransportés vers la terminaison pré-synaptique pour ensuite reformer l'acétylcholine qui servira à transmettre d'autres signaux (voir figure N°6) [14].

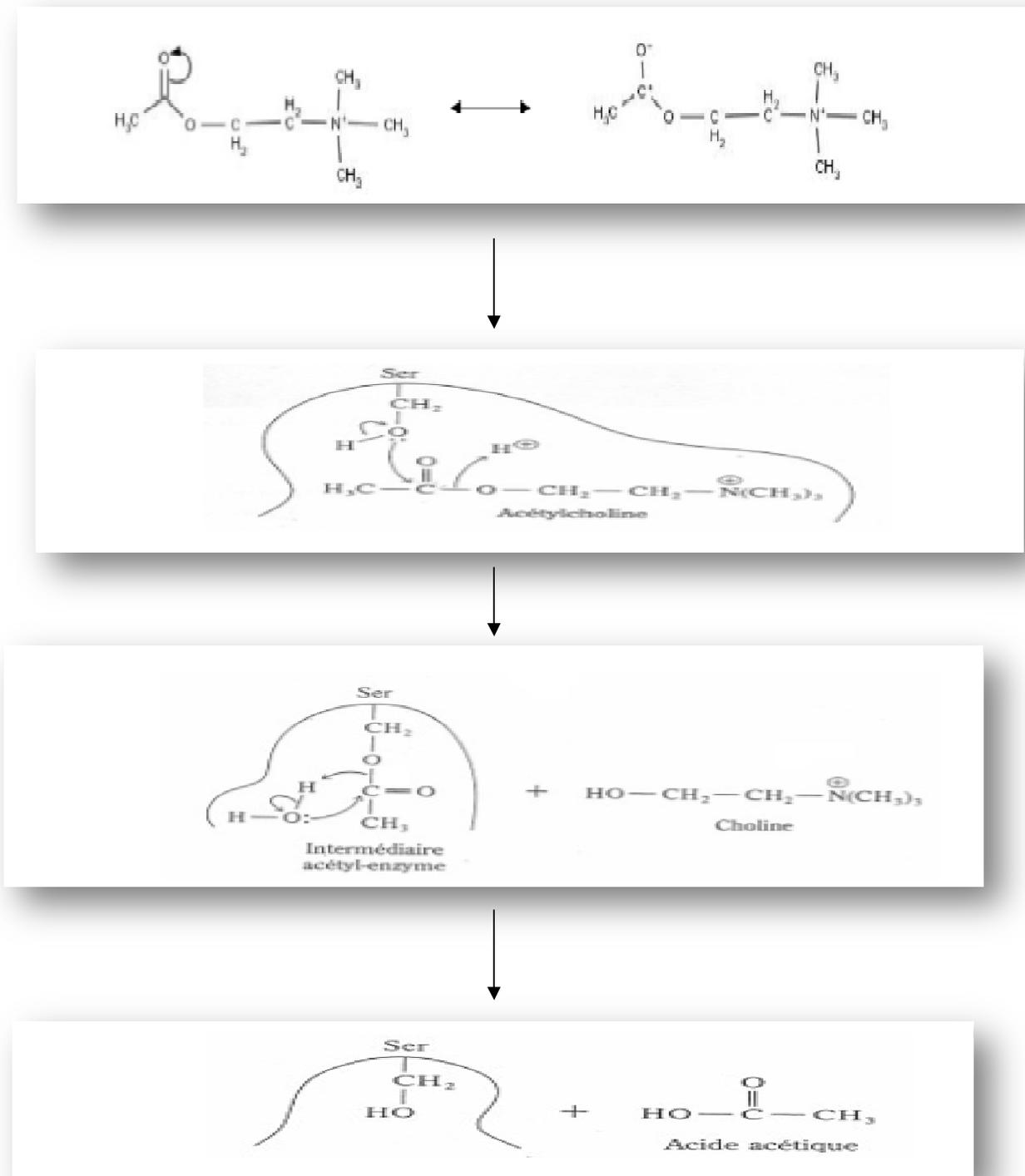


Figure N°6 : Représentation schématique du mécanisme d'action de l'AChE.



4. Le site actif et la triade catalytique :

L'AChE est une enzyme dimérique de 537 acides aminés. Structuralement parlant, son site actif comprend quelques acides aminés spécifiques jouant un rôle clé dans la stabilité du complexe AChE-ACh. Selon une étude récente réalisée par *J. Sussman, et al* en 1991, le site actif de l'AChE est représenté notamment par les acides aminés Glu 327, His440 et la Ser200 qui se trouvent à la base d'une gorge étroite de 20 Å de profondeur. A ce niveau, on distingue deux 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. L'ACh est alors clivée, libérant ainsi la choline et l'intermédiaire « enzyme-acylé ». Ensuite a lieu la déacétylation, qui régénère l'enzyme libre et l'acétate. La triade catalytique est composée des résidus Ser200, Glu327 et His440. C'est au niveau de la sérine catalytique (200) que se fixe la portion carbonyle de la molécule d'ACh. De son côté, L'His440 se comporte comme un catalyseur acido-basique pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire « acétyl-enzyme ». 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, respectivement. L'enzyme devra pouvoir stabiliser l'oxygène du carbonyle de l'ACh, qui se charge négativement lors de la formation de l'intermédiaire «acétyl-enzyme ». De même, on constate, au niveau du site éstérasique, la présence d'une petite cavité hydrophobe nommée la «poche acyle», constituée des résidus Trp233, Phe288, Phe290 et Phe331. Cette poche joue un rôle clé dans la stabilité du fragment hydrophobique du substrat [16].

Le site anionique tient son nom plus de l'histoire que de sa réalité propre. En effet, l'ACh portant une charge positive, il avait été postulé que le site actif de l'AChE puisse être constitué par un amas de résidus acides (chargés négativement au pH physiologique) qui aurait eu la charge de stabiliser le substrat durant la catalyse. En réalité, ce site au niveau duquel la portion tétraméthylammonium (TMA) du substrat sera stabilisée est plutôt aromatique qu'anionique ; il est constitué des résidus Trp84, Glu199 et Phe330. 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 des noyaux aromatiques environnant. Ce sous-site anionique est capital pour la catalyse : on estime que plus de 50% de l'énergie de stabilisation du substrat lui est directement imputable.



Les résidus Trp84 et Phe330 seront les deux plus importants contributeurs à cette énergie de stabilisation [16].

5. Le site périphérique :

Des études ont montré que les résidus Trp 279 et Tyr 70 ainsi que les deux séries d'acides aminés (270-278 et 251-266) constituent ce qu'on appelle le site périphérique (PAS : peripheric anionic site) se localisant au bord de la cavité (gorge) de l'enzyme. L'association d'un ligand au site périphérique permet l'accès du substrat dans la gorge (via un empêchement stérique). Ce site sera donc une cible potentielle en vue de l'inhibition de l'AChE [17].

6. Les inhibiteurs de l'AChE:

Avec le vieillissement, les taux d'acétylcholine commencent à décliner naturellement conduisant à des pertes de plasticité cérébrale et des difficultés d'apprentissage. En effet, les neurones cholinergiques sont connus à mourir à un rythme accéléré. L'utilisation des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase s'est avérée très efficace pour stimuler la capacité de mémoire chez ces individus en compensant la faible activité cholinergique naturellement. A l'heure actuelle, un bon nombre d'inhibiteurs de l'AChE sont mis en évidence pouvant être classés selon leur origine et/ou mécanisme d'inhibition [18].

6.1. Selon leur origine :

6.1.1. Origine naturel :

Désormais, les compagnies pharmaceutiques s'orientent de plus en plus vers l'extraction, la purification et l'identification de molécules issues de matrices naturelles capable d'inhiber l'AChE avec très peu, voire même sans effets secondaires. A l'heure actuelle, plusieurs familles de molécules naturelles sont réputées pour leur effet inhibiteur vis-à-vis de cette enzyme ; citons à titre d'exemple les alcaloïdes et les flavonoïdes [18].

6.1.1.1. Les alcaloïdes :

Ce sont des composés organiques d'origine naturelle le plus souvent végétale, azotés plus ou moins basiques, de distribution restreinte et dotés à faible dose de propriétés pharmacologiques marquées. A présent, plusieurs alcaloïdes sont considérés comme inhibiteurs de l'AChE [19].



6.1.1.1. a. Galantamine :

La galantamine, alcaloïde tertiaire, est un inhibiteur spécifique, compétitif et réversible de l'acétylcholinestérase. Isolée pour la première fois des fleurs de *Galanthus Caucasius*, cette molécule est approuvée sous le nom de (**Reminyl®**) pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Par la suite, plusieurs dérivés ont été mis en évidence montrant un effet inhibiteur plus puissant que la galantamine. [20].

6.1.1.1.b . Physostigmine :

Aussi appelée éserine est un alcaloïde inhibant potentiellement l'AChE avec un IC50 égale à 0.15 uM. Elle fut isolée pour la première fois en 1864 comme étant le principe actif de la fève de Calabar *physostigma venenosum*. L'utilisation de la physostigmine a montré chez des patients atteints de l'Alzheimer une amélioration de leur mémoire et leurs fonctions cognitives. Cependant l'intérêt de cette molécule est limité par sa courte demi-vie [21].

6.1.1.1.c.Huperzine A :

C'est un autre alcaloïde inhibant l'AChE. Isolée à partir d'une herbe médicinale chinoise *Huperzia serrata*, cette molécule possède un très bon effet inhibiteur avec un degré de toxicité très bas. elle a été prise comme composé *lead* dans le *design* de plusieurs dérivés [22].

6.1.1.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent le plus grand groupe de composés polyphénoliques issus des plantes supérieures. Ils sont très réputés par leurs effets anti-viral, anti-radicalaires, anti-allergiques, anti-tumoral, anti-inflammatoires et anti-cancéreux. Certains flavonoïdes, flavonols notamment, sont également connus pour leur effet inhibiteur vis-à-vis de l'AChE. Dans cette optique, une étude menée par Jung M et al en 2007, montre que la phase acétate d'éthyle de l'extrait de la plante *Agrimonia pilosa* s'avère efficace pour diminuer l'activité biologique de l'enzyme en question. Par la suite, une étude plus poussée dans la même optique révèle la quercétine, tiliroside, 3-méthoxy quercétin et quercitrin comme inhibiteurs de l'AChE [23].

6.1.2. Hémi synthèse :

6.1.2.1. Miotine :

C'est un inhibiteur obtenu par hémi-synthèse à partir de la physostigmine (voir figure N°7). Premier inhibiteur appartenant à la famille de carbamates, la miotine a été approuvée par l'agence Européenne pour l'évaluation des médicaments en 1998 et par FDA en 2000 [24].

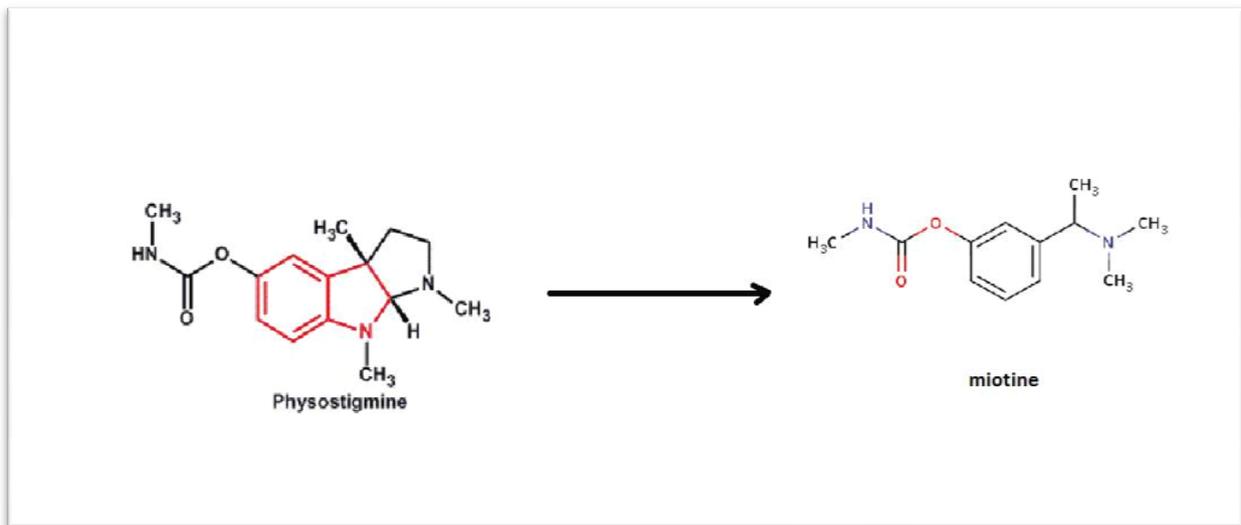


Figure N°7 : la synthèse de la miotine à partir de la physostigmine.

6.1.3. inhibiteur synthétique :

6.1.3.a . Donepezil :

Approuvé par la FDA en 1996, le donépézil, présent sous la forme de chlorhydrate de donépézil, est le deuxième inhibiteur de l'AChE mis sur le marché sous le nom de Aricept®. Selon une étude publiée dans *The New England Journal of Medicine*, le donépézil, traitement courant contre les phases précoces de la maladie d'Alzheimer, est aussi bénéfique dans ses formes plus sévères [25].

6.1.3.b. Rivastigmine :

La rivastigmine est un inhibiteur irréversible de l'AChE. Commercialisé sous le nom de **Exelon®**, cette molécule agit aussi bien sur l'AChE ou la BuChE en formant un complexe lié par une liaison covalente entraînant une inactivation transitoire des enzymes. Chez le sujet sain jeune, une dose de 3 mg par voie orale entraîne une diminution d'environ 40 % de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le LCR dans l'heure et demie après administration. L'activité enzymatique revient à son niveau initial 9 heures environ après le pic d'activité inhibitrice [25].

6.1.3.c. Tacrine :

La tacrine est une molécule employée dans le traitement des troubles de la mémoire chez les malades souffrant de la maladie d'Alzheimer et a permis pour la première fois d'obtenir un certain degré d'amélioration. Premier inhibiteur de l'AChE mis à disposition, la tacrine est distribuée depuis 1993 aux États-Unis et depuis 1994 en France sous le nom (**Cognex®**). Ce médicament peut entraîner des effets indésirables liés à l'excès



d'acétylcholine : nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales, sécrétion excessive de salive. Il semble en outre que la prise de doses très importantes de tacrine soit toxique pour les cellules du foie [26].

6.2. Selon leur mode d'action :

Selon leur mode d'action, les inhibiteurs de l'AChE se regroupent en 3 classes à savoir les inhibiteurs irréversibles, pseudo-irréversibles et réversibles.

6.2.1. Inhibiteurs irréversibles :

Les organophosphates sont des molécules inhibant irréversiblement l'AChE. La metrifonate faisant partie de ce groupe présente une activité inhibitrice modérée vis-à-vis l'enzyme. A cause des effets secondaires engendrés par cette molécule (affaiblissement musculaire, problèmes respiratoires...etc.), elle a été retirée du marché [27].

6.2.2. Inhibiteurs pseudo-irréversibles :

Cette classe d'inhibiteurs inclue les composés ayant un groupement fonctionnel carbamate. Ils sont carbamylés par la triade catalytique de l'AChE. La vitesse d'hydrolyse de ces complexes avec la Ser200 est plus lente que celle du complexe ACh-AChE. Le premier inhibiteur de cette classe qui a été étudié pour le traitement de la maladie d'Alzheimer était la physostigmine, mais du fait que cet inhibiteur possède une courte demi-vie, il a été rejeté. Afin de prouver son potentiel, plusieurs analogues ont été étudiés. La Rivastigmine qui est un dérivé de la Miotine est un autre inhibiteur pseudo-irréversible possédant le groupement carbamate [18].

6.2.3. Les inhibiteurs réversibles :

Ce sont des molécules capable d'inhiber l'AChE en faisant intervenir des liaisons faibles de type Hydrogène, interactions hydrophobiques, Van der Waals...etc. on distingue :

6.2.3.1. Les aminoacridines :

Approuvée par la FDA en 1993, la Tacrine (Cognex) est le premier inhibiteur de l'AChE mis en marché (Cognex comme nom commercial). Avec un IC50 égale à 8.2 nM, la tacrine se présente parmi les inhibiteurs les plus puissants de l'AChE. Par la suite, le squelette de base de la tacrine a servi pour la synthèse d'autre composés présentant une activité inhibitrice plus ou moins similaire avec moins d'effets secondaires, citons à titre d'exemple Valnacrine et le Suronacrine[28].

6.2.3.2. Les N-Benzylpiperidines :

Donepezil est le deuxième inhibiteur de l'AChE approuvé par la FDA. Il présente une sélectivité plus importante pour l'AChE que la BuChE. Dans cette famille de molécule



s'illustre également TAK-147. Bien que cette molécule présente un pouvoir inhibiteur inférieur à celui de la Donepezil, les essais cliniques sont en cours de réalisation [27].

6.2.3.3. Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont considérés également comme inhibiteurs réversibles de l'ACHE citons à titre d'exemple la Galantamine (Reminyl) Huperzine, physostigmine ...etc.

Chapitre 3 :

Criblage virtuel



1. Introduction :

La découverte de nouveaux médicaments est un processus extrêmement long et fastidieux qui dure en moyenne une dizaine, voire une quinzaine d'années en dépensant près d'un milliard de dollar. La méthode classique pour concevoir un nouveau médicament était basée sur le criblage à haut débit (high throughput screening, HTS) où un grand nombre de composés sont testés *in vitro* sur une cible thérapeutique donnée (enzyme, récepteur...etc.) afin d'identifier des touches ("*hits*" ou encore composés promoteurs) qui seront par la suite optimisés et testés *in vivo*. Néanmoins, le criblage à haut débit s'est rapidement trouvé confronté à de nombreux problèmes scientifiques, techniques, méthodologiques, financiers et organisationnels. Si l'on teste un grand nombre de molécule sur une cible donnée, on finira sans nul doute par trouver une molécule active sur cette cible, mais quand et à quel prix ? C'est à ces deux questions que le développement de nouvelles approches telles que le criblage virtuel par docking moléculaire était nécessaire [30].

2. Criblage virtuel *in silico*:

Le criblage virtuel *in silico* est une nouvelle stratégie de développement de nouveaux médicaments consistant à prédire l'affinité d'un très grand nombre de molécules (collectées en chimiothèques) pour le site actif ciblé afin d'aboutir à une liste très réduite de molécules présentant l'activité souhaitée. Seules, ces molécules seront testées expérimentalement pour valider la prédiction. Etant plus facile et moins coûteuse que les criblages expérimentaux, cette démarche est aujourd'hui couronnée de succès en mettant sur le marché un bon nombre de médicament, citons à titre d'exemple : indinavir ; un inhibiteur puissant de protéases du VIH et célécoxib inhibant sélectivement la cyclo-oxygénase 2. [31]

Suivant la nature de l'information expérimentale disponible, on distingue deux approches pour le criblage virtuel. La première reposant sur la connaissance d'un nombre suffisant d'informations concernant une ou plusieurs molécules actives de référence, est appelée "*ligand-based virtual screening*". La seconde, basée sur la structure de la cible est connue sous le nom de "*structure-based virtual screening*". Bien que ces deux approches soient surtout utilisées de manière exclusive (souvent parce que la nature des données de départ ne laisse qu'un seul choix possible), leur



combinaison lors d'une campagne de criblage permet de maximiser les chances de succès pour identifier de nouvelles touches.

2.1. Le criblage virtuel « ligand-based » (pharmacophore) :

Un pharmacophore est un ensemble de points caractéristiques que doit posséder une molécule pour être active. Un modèle pharmacophorique est un arrangement spatial de points résultant de l'alignement de molécules dont le mode de liaison à un récepteur est connu ou supposé. A chaque point de ce modèle correspond des coordonnées 3D, un volume (généralement sphérique) ainsi que des propriétés physico-chimiques (lipophilie, donneur/accepteur de liaisons hydrogène). Son élaboration passe tout d'abord par la sélection de composés actifs pour la cible en question. Des conformations sont ensuite générées et le choix hypothétique de l'une d'elle est effectué. Un alignement des poses sélectionnées permet par la suite de déduire les points significatifs responsables de l'affinité avec le récepteur. L'intérêt de coupler cette technique au docking est d'une part de pouvoir éliminer directement les molécules indésirables et donc d'économiser du temps de calcul. Par ailleurs, une telle stratégie permet de guider la construction incrémentale du ligand au sein du site actif [4].

2.2. Le criblage virtuel « structure-based » :

De son côté, l'approche "*structure-based*" se rapporte souvent aux algorithmes de docking protéine-ligand. Ces méthodes consistent à estimer la complémentarité structurale de chaque molécule criblée avec le site actif considéré. Ainsi, contrairement à l'approche basée sur des ligands de référence, cette approche peut potentiellement identifier de nouvelles classes de molécules actives. En revanche, ces méthodes sont généralement plus coûteuses en puissance de calcul et leur emploi requiert souvent une expertise plus importante [4].

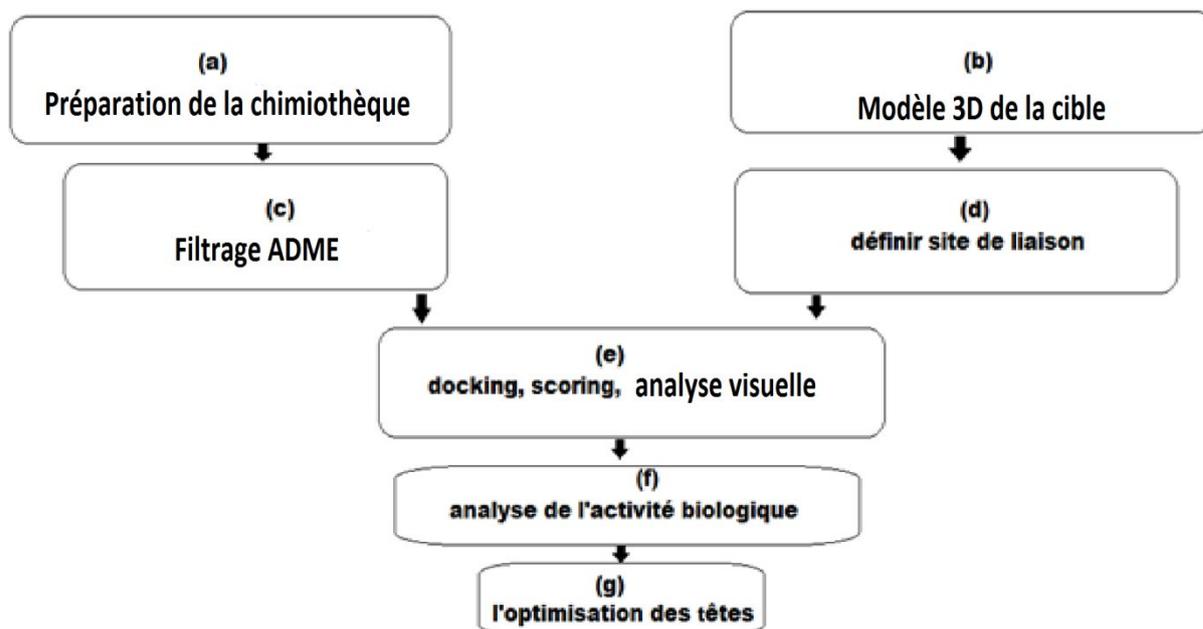
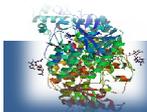
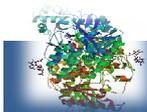


Figure N° 8 : Déroulement d'une expérience de criblage virtuel par docking.

Dans un premier temps, la chimiothèque à cribler (*a*) est préparée, puis pré-filtrée (*c*). Concernant la cible, il faut disposer d'une structure tridimensionnelle fiable de la protéine ciblée (en particulier au niveau de son site actif) (*b*), qui peut être issue de techniques expérimentales telles que la diffraction aux rayons-X ou par RMN ou encore provenir d'un modèle par homologie validé. Une fois la cible sélectionnée et préparée, le site actif de celle-ci est défini ; cela consiste à déterminer les résidus clés du site de liaison qui forment le lieu de reconnaissance moléculaire avec les ligands de référence (*d*).

Quand les petites molécules et la cible sont prêtes, un algorithme de docking, associé à sa fonction de score, est employé afin d'identifier les composés de la chimiothèque ayant les meilleures affinités avec la cible (*e*). Une inspection visuelle des solutions de docking des ligands les mieux classés par la fonction de score peut avoir lieu, afin de vérifier leurs modes d'interaction avec les résidus clés du site actif (*e*). Les molécules candidates obtenant les meilleures prédictions d'affinité constituent enfin des touches potentielles qu'il faut valider en les soumettant aux tests expérimentaux (*f*). A l'issue de ces essais, les composés démontrant une activité



biologique peuvent passer en phase d'optimisation en vue de déterminer des têtes de série (*g*). [32]

3. Outils du criblage virtuel:

3.1. La cible :

La structure tridimensionnelle de la protéine cible utilisé dans le présent travail provient de la PDB. C'est la plus grande base de donnée structurales de macromolécules (protéines, ADN, ARN...etc.). Elle a été établie en 1971 en comportant uniquement 7 structures. Depuis cette époque, le nombre de structures 3D de macromolécules ne cesse à croître arrivant au juin 2015 à environ 110 000 structures dont 101 300 protéines. La grande majorité des structures présentes dans la PDB sont issues de la cristallographie aux rayons X mais on trouve également un certain nombre de structures obtenues par RMN et par microscopie électronique [33].

Il est important de signaler que certaines protéines ne sont pas encore disponibles dans cette banque de donnée et si cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, il devient alors possible de construire la structure 3D de la cible souhaitée, en faisant appel à la modélisation par homologie [34].

3.2. Chimiothèques:

Le criblage virtuel consiste à tester *in silico* l'activité d'un très grand nombre de molécules vis-à-vis une cible donnée. Les compagnies pharmaceutiques ont donc dû créer des collections pour organiser cette masse de données. Ces collections sont aussi appelées chimiothèques. Il existe à l'heure actuelle deux grands types de chimiothèques : les chimiothèques réelles et les chimiothèques virtuelles. Les chimiothèques réelles sont souvent sous forme de plaques de puits contenant chacun un produit différent. Ces plaques sont donc prêtes à être testées. Les chimiothèques virtuelles qui nous intéressent dans le présent travail sont un ensemble d'informations plus ou moins organisées et hiérarchisées regroupant tout ou partie des données concernant un ensemble de composés. Dans ce type de chimiothèques, les coordonnées de chaque composé sont enregistrées dans des fichiers avec les formats *SMILES*, *SDF*, *MOL2* et *PDB*. Parmi les chimiothèques virtuelles nous citons : La chimiothèque Nationale Française, ZINC, PubChem [35].



3.2.1. Chimiothèque nationale Française:

La Chimiothèque nationale, coordonnée dans un Groupement de service du CNRS, a été créée en 2003 par une convention entre le CNRS et 17 organismes d'enseignement supérieur de recherche. Elle fédère les collections de produits de synthèse et d'extraits naturels existants dans les laboratoires publics français et en assure la valorisation scientifique et industrielle. En mars 2015, la chimiothèque nationale française répertorie environ 57 000 molécules à vendre en vrac ou en plaques [36].

3.2.2. Pubchem :

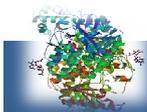
PubChem est une banque de données américaine de molécules chimiques gérée par le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), branche de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis, sous l'autorité de la *National Institutes of Health* (NCI). La PubChem répertorie environ 68 373 220 de composés en mettant en ligne, gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres : chimique, biochimique, pharmacologique, production, toxicologie, environnemental, ...etc. [37]

3.2.3. Zinc :

C'est une base de données contenant des composés disponibles à vendre appropriés pour le criblage virtuel. Elle compte actuellement environ 90 millions de composés qui peuvent être achetés tout simplement. Gouvernée par le Laboratoire Shoichet dans le département de chimie pharmaceutique à l'Université de Californie à San Francisco (UCSF), cette base est accessible gratuitement pour l'ensemble des scientifiques [38].

3.3.Le programme :

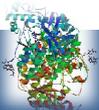
De nombreuses publications ont proposé des expériences parallèles menées avec un bon nombre de programmes de criblage virtuel (commerciaux ou non). Les plus fréquemment utilisés sont: AutoDock Vina, Gold, Flex X, Glide et Surflex. Ces programmes reposent sur l'ajustement de fragments, commençant par construire un modèle «en négatif» du site actif dit *protomol*. Ce modèle est constitué par le volume accessible du site et les points d'interaction tels que les sites de liaison hydrogène, les charges ou les sites lipophiles. Ces algorithmes sont dits aussi de fragmentation/reconstruction car, dans un premier temps, la molécule est découpée en parties rigides



et en liaisons flexibles. Par la suite, les parties rigides sont positionnées en premier et le ligand est reconstruit de proche en proche, explorant diverses conformations lors de la mise en place des liaisons flexibles. Cette approche permet un criblage rapide de vastes librairies de composés. [34]

Chapitre 4 :

Matériels et Méthodes



1. Matériels :

1.1. Microordinateur :

Nous avons utilisé dans le présent travail deux micro-ordinateurs puissants avec une mémoire vive de 4 GO sous Windows version 8.1.

1.2. Programmes :

Pour les calculs de docking moléculaire, nous avons utilisé la version la plus récente du programme AutoDock Vina intégrée dans PyRx 0.8. Ce dernier est une interface graphique regroupant les programmes AutoDock, AutoDock Vina et OpenBabel facilitant ainsi le criblage virtuel. Le deuxième programme utilisé dans cette étude est « Titan ». Il permet la construction moléculaire tridimensionnelle des ligands issus de la littérature avec minimisation de leur énergie intramoléculaire. Nous avons également utilisé l'interface graphique AutoDock Tools version 1.5.6 afin de fournir des fichiers de ligands et de l'enzyme en format *pdbqt*, requis pour le succès des calculs de docking moléculaire avec AutoDock Vina.

L'interface graphique ViewerLite 4.2 a été utilisée afin de visualiser les interactions AChE-Ligands simulées par Vina. 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.).

2. Méthode :

La procédure de simulation par le programme Vina se décompose en 4 étapes :

2.1. préparation du récepteur :

La structure 3 D de L'AChE, objet de notre étude, a été téléchargée sous format *pdb* via la banque de donnée *Protein Data Bank* sous le code 4M0E. Il s'agit d'une structure correctement définie par cristallographie aux rayons X avec une résolution égale à 2.00 Å. Ce code représente la structure 3D de l'AChE sous forme homodimérique en complexe avec un inhibiteur. Avant son utilisation par Vina, la chaîne B a été supprimée afin de conserver uniquement la chaîne A. Celle-ci a été séparée de son ligand afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre tout en supprimant les molécules d'eau. Par la suite, tous les hydrogènes manquants sont rajoutés et les charges partielles de type « Kollman » sont calculées grâce au programme AutoDock Tools. Enfin, le fichier de la protéine ainsi préparée a été enregistré en format *pdbqt*.



2.2. Préparation des ligands :

Les 43 inhibiteurs utilisés pour l'étude de corrélation linéaire (voire Annexe 1) proviennent tous de la littérature. Il était indispensable de faire appel au programme Titan afin de construire manuellement les structures 3D de ces ligands. Lors de cette étape, il est très important de tenir compte de l'état d'hybridation de chaque atome. La méthode semi-empirique Austin Model 1 (AM1) a été utilisée pour atteindre une conformation de basse énergie. Les structures 3D des ligands obtenues ont été enregistrées en *pdb* par Titan puis converties en *pdbqt* à l'aide du script *prepare_ligand4.py* fourni par AutoDock Tools.

De son côté, La chimiothèque utilisée dans notre travail comporte 210 molécules. Les fichiers des structures 3D de ces molécules ont été téléchargés à partir de la PubChem sous extension *SDF*, puis convertis en *PDB* à l'aide du programme OpenBabel. Comme pour l'enzyme, les fichiers des ligands ont été convertis en *pdbqt* ; format d'entrée requis pour le docking avec Vina bien entendu.

2.3. Criblage virtuel avec AutoDock vina :

Le criblage virtuel a été réalisé avec le programme Autodock Vina version 1.0.2. La protéine a été gardée rigide pendant le docking tandis que les ligands ont été considérés comme flexibles. Les torsions sur les ligands sont attribuées automatiquement lors de la conversion du *PDB* au *PDBQT*. Par la suite, le site actif a été défini manuellement de manière à englober la totalité de l'espace couvert par le ligand de référence dans la structure d'origine (4M0E). Le centre de la boîte de recherche conformationnelle résultante a été déterminé par les coordonnées X : -17,111 Y : -42,224 et Z : 28,0830 avec les dimensions 19.5257 * 20.9146 * 22.3402 Å (Voire Figure N° 9). La boîte qui en résulte englobe largement le site actif de l'enzyme en permettant la libre rotation des ligands étudiés dans cet éventuel site.

Pour le docking avec vina, les paramètres par défaut ont été utilisés, soit:

- exhaustiveness = 8
- nombre de poses générées = 9



Les fichiers de sortie de Vina en SDF ont été convertis en *PDB* à l'aide d'OpenBabel intégré dans PyRx.

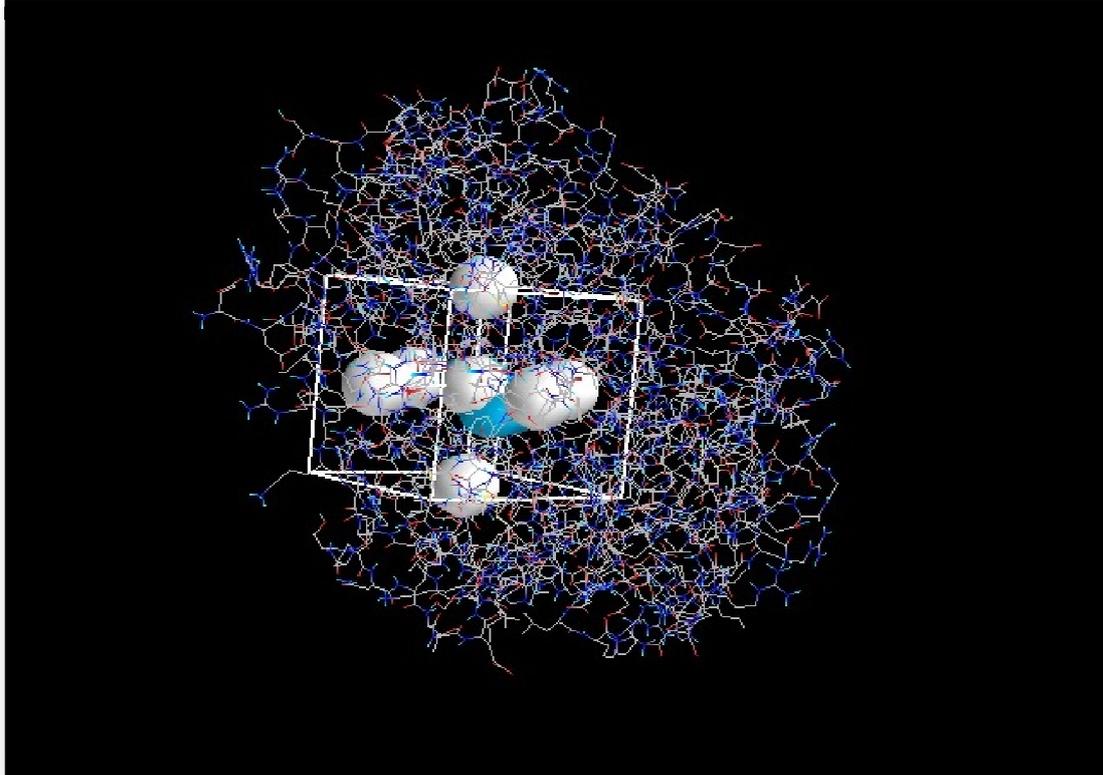


Figure N° 9 : Position de la boîte d'amarrage dans le site actif de la 4M0E.

2.4. Analyse des résultats :

L'interface graphique du programme PyRx a été utilisée pour classer les inhibiteurs en fonction de leur énergie d'interaction (Kcal/mol) vis-à-vis le site actif de l'enzyme. Par la suite, nous avons utilisé le programme ViewerLite afin de visualiser les interactions mis en jeu dans la formation des meilleurs complexes.

3. Filtrage ADME:

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 lipophilie entre -2 et 5.
5. le nombre de liaisons rotatable inférieur à 15 [39].

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur Molinspiration[40].

Chapitre 5 :

Résultats et discussions

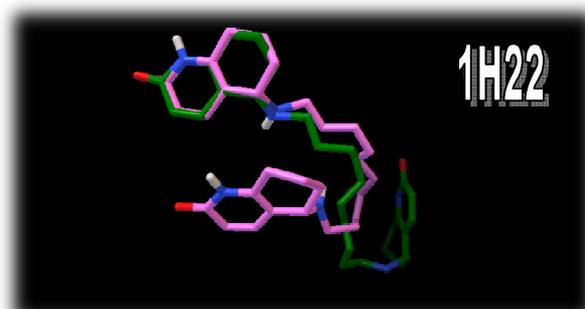
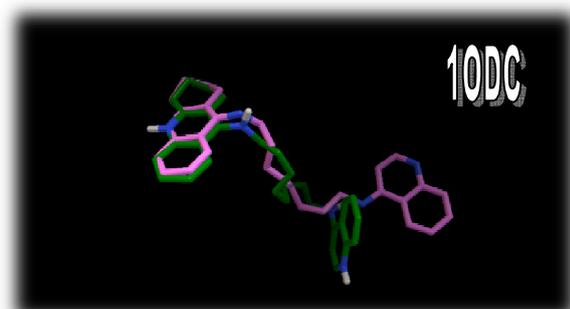


1. Tests de fiabilité du programme de docking :

Avant de se lancer dans le travail de recherche *in silico*, il est indispensable tout d'abord d'évaluer la fiabilité du programme de docking moléculaire Vina utilisé dans cette étude. Souvent, les performances d'un programme de docking moléculaire sont évaluées en termes de capacité à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Cela dit qu'un programme de docking est aussi performant s'il est capable à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Cette capacité est habituellement jugée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD qui représente la moyenne des différences de positions du ligand simulée par le programme vis-à-vis celle déterminée expérimentalement existant au niveau de la PDB. Selon les auteurs, le ratio admis est une différence maximum de 2 Å, au-delà de laquelle, la prédiction est considérée comme non pertinente. Etant un programme construit spécialement pour des calculs de criblage virtuel, Vina ne contient, malheureusement, aucun script pour le calcul de RMSD entre la conformation de référence et celle simulée d'un ligand. Dans cette mesure, nous avons jugé utile de vérifier la fiabilité de vina au moyen de deux tests ; l'analyse visuelle et le test de corrélation linéaire.

1.1. L'analyse visuelle :

Afin de nous assurer de la fiabilité du programme Vina pour étudier *in silico* l'inhibition de l'AChE, nous nous sommes servis de quatre complexes AChE- inhibiteurs disponibles dans la PDB. Rappelons que ces complexes portent les codes suivants : 1H22, 1UT6, 4M0E, 1ODC [41, 42, 43,44], La visualisation des résultats du docking moléculaire réalisée à l'aide de l'interface graphique de PyRx, montre que les modèles des ligands simulés par Vina sont correctement placés dans le site actif de l'AChE. Ils présentent des conformations spatiales parfaitement superposables à celles déterminées expérimentalement par cristallographie (voir figures N° 10).



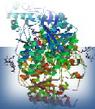


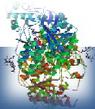
Figure N°10: Superposition des géométries des quatre inhibiteurs obtenues par cristallographie (colorées en violet) et par docking avec Vina (colorées en vert).

1.2. Coefficient de corrélation (r) :

Ce test consiste à calculer le coefficient de corrélation linéaire en traçant la droite de régression linéaire entre les valeurs de l'énergie d'interaction (ΔG) des inhibiteurs de la AChE simulés avec Vina et les valeurs de leur $\log IC_{50}$. Dans notre cas, nous avons utilisé 43 inhibiteurs de la AChE, issus de la littérature et appartenant à 3 familles différentes (chaque couleur dans le tableau N°1 correspond à une famille de molécules). Les résultats des énergies d'interaction des inhibiteurs étudiés ainsi que leur $\log IC_{50}$ sont représentés dans le tableau N°1.

Tableau N°1: Corrélation entre les énergies d'interaction des 43 inhibiteurs de l'AChE et leur activité biologique (IC_{50}).

N°	Log IC_{50}	IC_{50} nM	ΔG	Référence
1	0,81	6.9	-11,3	[45]
2	1,11	13	-11,1	[45]
3	1,2	16.2	-11	[45]
4	1,63	43	-10,9	[45]
5	0,52	3.33	-10,6	[45]
6	1,04	11	-10,6	[45]
7	1,67	47.5	-10,6	[45]
8	0,17	1.5	-10,5	[46]
9	0,74	5.5	-10,5	[45]
10	1,7	50.6	-10,5	[45]
11	1,7	50.2	-10,4	[45]
12	1,72	53.4	-10,4	[45]
13	0,47	3.0	-10,3	[46]
14	0,97	9.5	-10,3	[46]
15	1,9	80	-10,3	[46]



16	0,97	9.5	-10,2	[46]
17	1,63	43	-10,2	[45]
18	0,3	2	-10,1	[46]
19	0,6	4	-10,1	[46]
20	0,75	5.7	-10,1	[46]
21	2,09	1000	-10	[46]
22	2,46	295	-10	[45]
23	0,94	8.9	-9,9	[46]
24	2	100	-9,8	[46]
25	2,35	227	-9,8	[45]
26	3,38	2440	-9,8	[45]
27	4,01	10270	-9,8	[45]
28	2,9	868	-9,7	[45]
29	1,59	39.2	-9,6	[45]
30	2,2	160	-9,6	[46]
31	2,32	210	-9,6	[45]
32	2,81	653	-9,6	[45]
33	2,68	480	-9,4	[46]
34	2,85	723	-9,4	[45]
35	4,02	100 000	-9,3	[47]
36	3,59	3950	-9	[45]
37	3,86	7310	-9	[47]
38	3,27	1900	-8,8	[45]
39	4,03	10840	-8,8	[47]
40	4,58	38330	-8,8	[47]
41	3,73	5400	-8,7	[46]
42	4,83	68060	-8,7	[47]
43	3,62	4240	-8,6	[45]

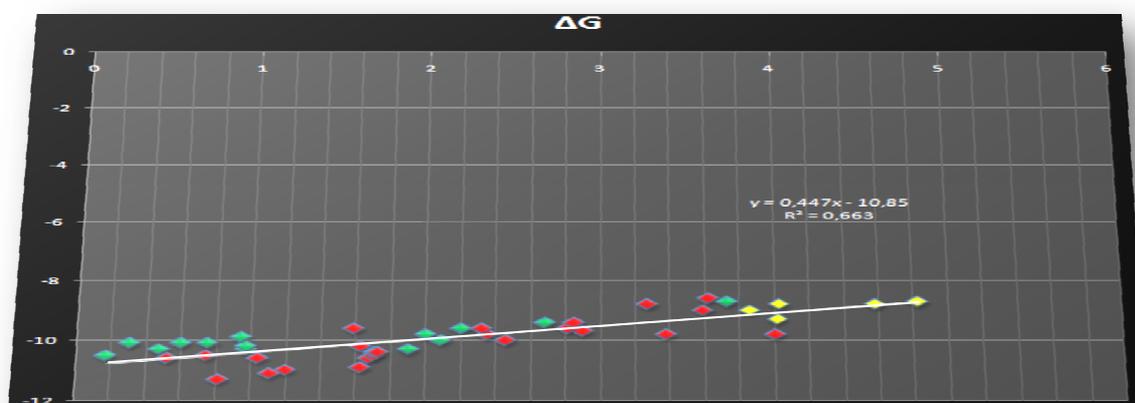


Figure N°11: Corrélation entre l'activité biologique (IC50) de 43 ligands et leurs énergies d'interaction vis-à-vis de l'ACHe.



Selon les travaux de BENSEGUENI A (2007) [48], un programme de docking moléculaire est si performant quand la valeur absolue du coefficient de corrélation linéaire dépasse 0.5, ce qui est en parfait accord avec les résultats trouvés. Comme montre la figure N°11, il existe une forte corrélation entre les énergies d'interaction et les IC₅₀ des inhibiteurs étudiés, avec un coefficient de corrélation égal à 0,81.

1.3. Conclusion :

À la lumière des résultats obtenus avec le coefficient de corrélation linéaire et l'analyse visuelle, le programme Vina est bien adapté aux calculs des interactions AChE-inhibiteurs. Nous pouvons alors l'utiliser sans trop risque d'erreurs pour la suite de notre travail.

2. Etude des interactions AChE-anti cholinestérase par PyRx :

Dans la perspective de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de l'AChE, il est primordial d'étudier, en premier lieu, les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de cette éventuelle enzyme. Dans cette optique, la littérature révèle 4 composés synthétiques possédant un pouvoir inhibiteur élevé envers l'AChE avec de très faibles valeurs de leur IC₅₀. Rappelons que ces inhibiteurs portent les noms suivants :

- Tricyclicquinazolinone amine acetonitrile,1,2,3,4 tetrahydroisoquinoline (**composé 1**).
- tetracyclic quinazolinones ,amine, acetonitrile,piperidine (**composé 2**),
- tetracyclic quinazolinones amine acetonitrile piperidine (**composé 3**),
- tricyclicquinazolinone amine acetonitrile 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**composé 4**).

(Voir les figures N° 12, 13,14, 15). Néanmoins, le mode d'interaction de ces composés vis-à-vis le site actif de l'AChE reste encore mal élucidé. A l'aide du programme AutoDock Vina, nous avons pu simuler la formation de ces complexes et évaluer leurs énergies d'interaction. L'interface graphique ViewerLite nous a aidés à visualiser le nombre et le type de liaisons mises en jeu lors de ces interactions.

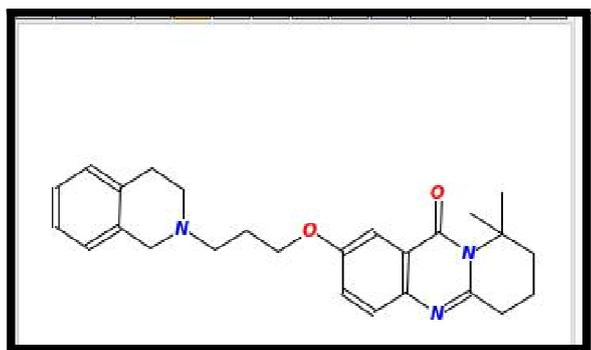


Figure N° 12: Structure du composé 1.

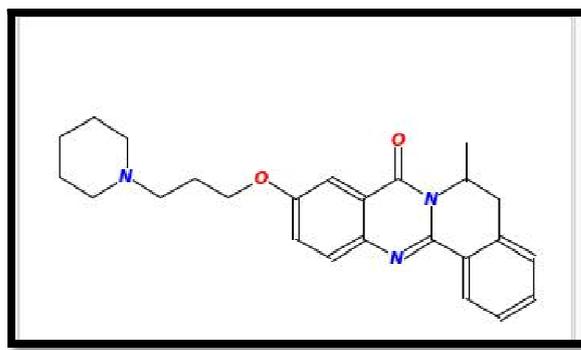


Figure N°13: Structure du composé 2.

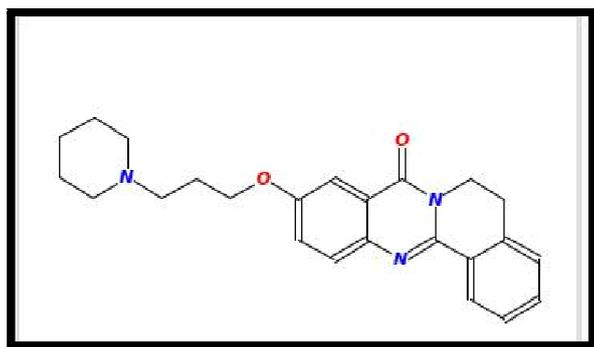


Figure N° 14 : Structure du composé 3.

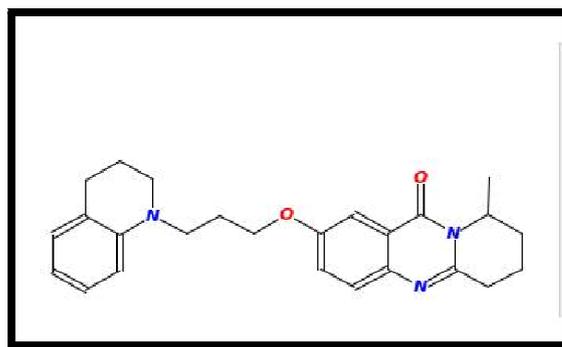


Figure N°15: Structure du composé 4.

2.1. Composé 1:

La modélisation de l'énergie d'interaction entre le composé 1 et le site actif de l'AChE donne lieu à un score de l'ordre de -11.3 Kcal/mol. Cette énergie d'interaction est parfaitement corrélée à l'activité inhibitrice de ce composé avec un IC_{50} égale à 6.9 nM. Comme le montre la figure N° 16, ce composé est bien placé dans la cavité hydrophobique où il est entouré par les résidus : PHE299, TRP236, TRP286, PHE297, PHE123, TYR124, TRP341, TYR72, TYR337, HIS447, TYR133. De plus, ce composé forme une liaison hydrogène distante de 2.27 Å entre l'oxygène du cycle B de l'inhibiteur et la fonction hydroxyle de Tyr72.

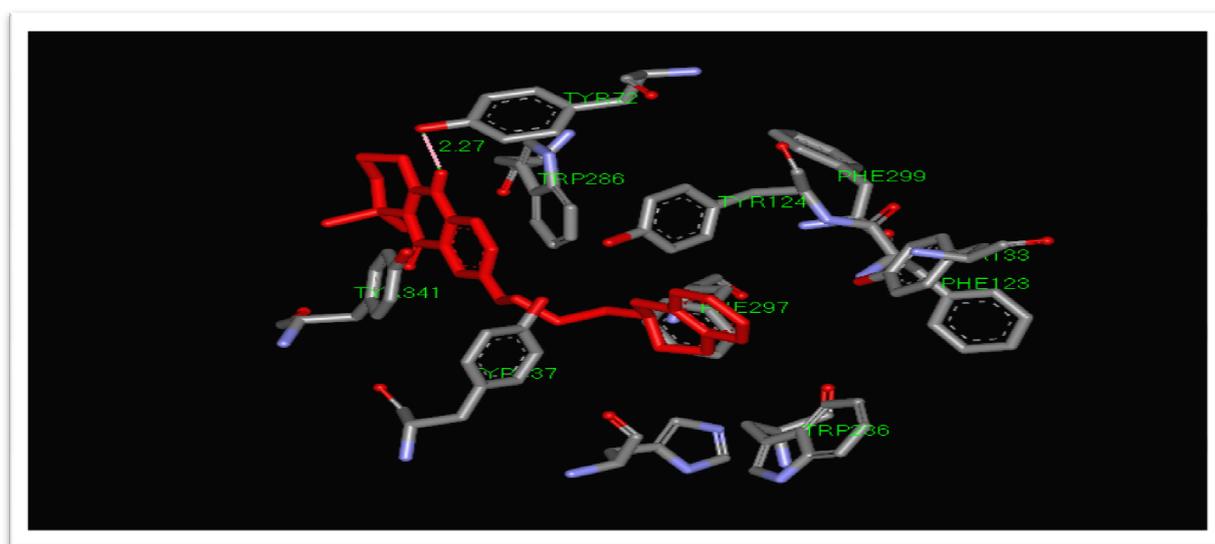


Figure N°16: Mode d'interaction du composé 1 dans le site actif de l'AChE.

2.2. Composé 2:

Le programme Vina nous a permis d'évaluer l'énergie d'interaction entre le composé 2 et l'AChE. Cette énergie s'évaluant à -11.1 Kcal/mol est significativement corrélée à l'activité inhibitrice de ce composé dont l' IC_{50} est égale à 13 nM. L'analyse virtuelle montre que le



complexe AChE composé 2 est stabilisé par de nombreuses interactions hydrophobes avec les résidus : TRP286, HIS447, TYR337, PHE33, VAL294, PHE295, TYR124, TRP236, PHE297, TYR341. Or, aucune liaison hydrogène n'est constatée dans la formation de ce complexe (voir figure N° 17).

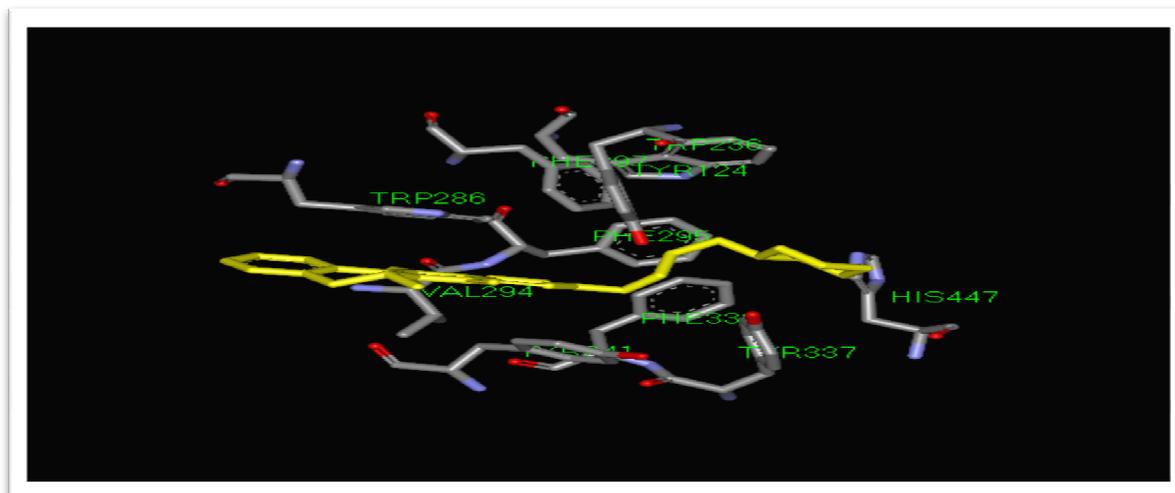


Figure N°17 : Mode d'interaction du composé 2 dans le site actif de l'AChE.

2.3. Composé 3 :

Avec une faible valeur de son IC₅₀ (16.2nM), le composé 3 se présente comme l'un des meilleurs inhibiteurs de l'AChE étudié jusque là. Le docking moléculaire de ce composé dans le site actif de l'AChE donne l'une des meilleures énergies d'interaction obtenue soit -11Kcal/mol. Cette énergie résulte de la mise en place d'une seule liaison hydrogène entre l'oxygène du cycle B de l'inhibiteur et le groupement OH du résidu Tyr72 séparés par une distance de 2.27Å. On constate également de nombreuses interactions entre l'inhibiteur et les résidus GLU351, ASP349, TYR77, PHE346, TRP442, GLY342, TYR341, PHE338 et TYR72 stabilisant le complexe.

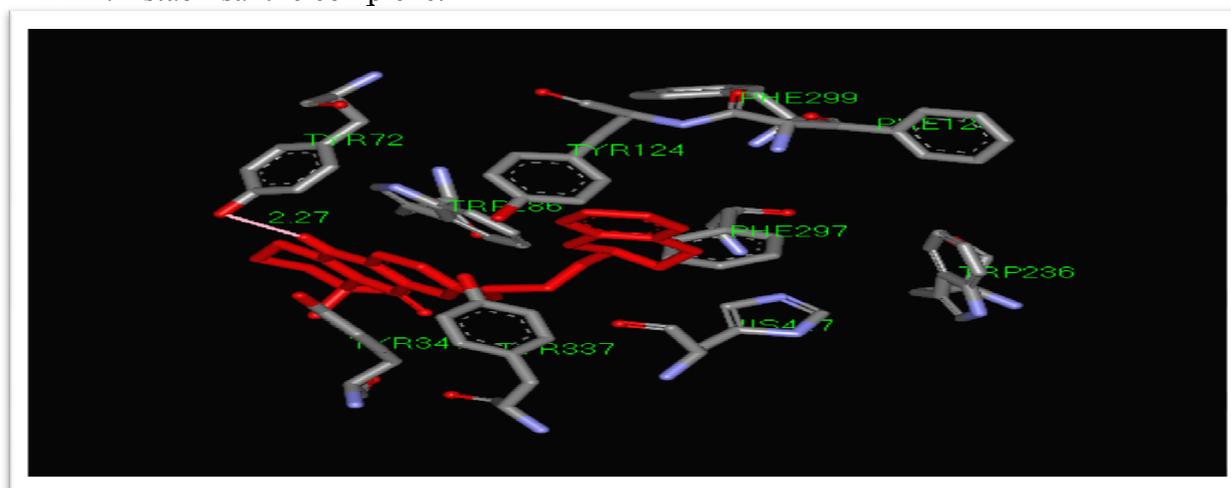


Figure N°18: Mode d'interaction du composé 3 dans le site actif de l'AChE.



2.4. Composé 4:

Comme le montre le tableau 1, le composé 4 se caractérise par une faible activité inhibitrice envers l'AChE par rapport aux 3 inhibiteurs précités, avec une IC_{50} égale à 43 nM. De son côté, le programme AutoDock Vina confirme parfaitement ces données expérimentales en donnant un score d'énergie égal à -10.9 Kcal/mol. L'analyse visuelle révèle une seule liaison hydrogène entre l'oxygène du cycle B de l'inhibiteur et le OH du résidu SER293, séparés par une distance de 2.00 Å. Ce complexe est également stabilisé par des interactions hydrophobiques entre l'inhibiteur et les résidus PRO290, SER293, GLY342, ARG296, HIS287, TRP236, PHE295, PHE338, PHE297, TYR337, TYR124, TYR341, TRP286.

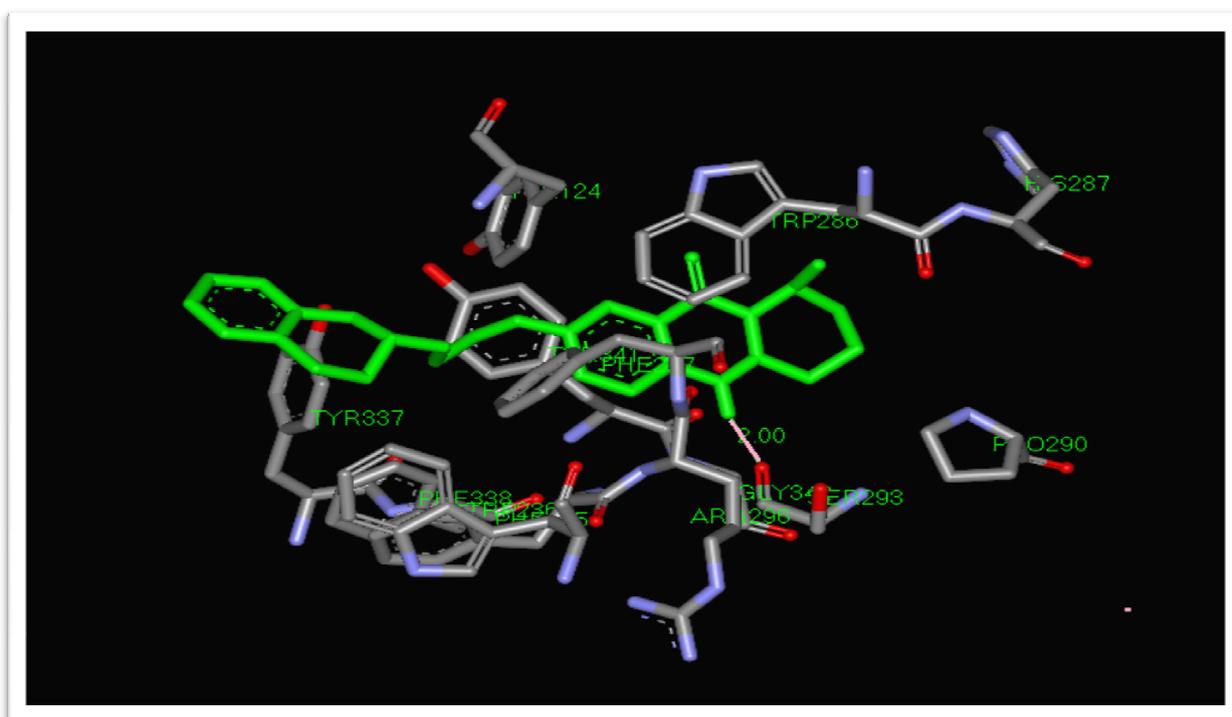
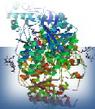


Figure N°19: Mode d'interaction du composé 4 dans le site actif de l'AChE.

2.5. Filtrage ADME/Tox :

Les principales raisons de l'échec des molécules en cours de développement d'un médicament sont le manque d'efficacité chez l'homme et les problèmes de pharmacocinétique. En effet, les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité d'une molécule peuvent être estimées à partir de sa structure chimique, ce qui contribue à réduire les échecs dus à ces mauvaises propriétés d'ADME-T. Dans notre travail, il était très important de compléter cette étude par l'application de la méthode de filtre ADME qui est basée sur la règle de cinq de Lipinski afin de nous renseigner



sur les propriétés pharmacocinétiques (ADME) des trois composé étudiés précédemment. Les résultats sont montrés dans le tableau 2.

Tableau N° 2 : Critères de la règle de Lipinski pour les inhibiteurs étudiés.

	Composé 1	Composé 2	Composé 3	Composé 4
PM	389.50	367.74	403.53	403.53
Donneur d'hydrogène	5	5	5	5
Accepteur d'hydrogène	0	0	0	0
Liaisons rotables	5	5	5	5
Log P	4.27	4.40	4.76	4.64

PM = Poids Moléculaire. Log P = coefficient de partage octanol/eau.

Le tableau 2 montre que les trois molécules étudiées répondent parfaitement à la règle de Lipinski. Conformément aux résultats de Lipinski., et *al* (1997) ces molécules sont capables de présenter une activité biologique sans avoir des problèmes d'absorption par voie oral [39].

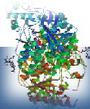
2.6. Conclusion :

L'étude par docking moléculaire nous a permis de compléter les données expérimentales des trois composés reconnus jusque là pour leur activité inhibitrice envers l'ACHé. Les résultats obtenus par Vina montrent clairement que les composants 1, 2,3 et 4 avec des valeurs très faibles de leur énergie d'interaction, se présentent comme des inhibiteurs potentiels de l'ACHé. Une étude *in silico* plus approfondie de ces résultats pourrait conduire à la conception théorique de nouveaux inhibiteurs encore plus affins de l'ACHé.

3. proposition de nouveaux inhibiteurs de l'ACHé :

3.1. Criblage virtuel d'une collection DE molécules:

Dans l'espoir de concevoir un nouveau inhibiteur puissant envers l'ACHé, nous avons réalisé un criblage virtuel d'une collection de molécules chimiques en utilisant le programme Vina. En prenant comme structure de départ le squelette cyclique du composé 1 (étant meilleur inhibiteur de l'ACHé avec $\Delta G = -11.3 \text{Kcal/mol}$), la banque de donnée *PubChem* nous propose 210 structures similaires avec un taux de similarité égal à 95 %. En tenant compte de la marge d'erreurs tolérée par Vina, le criblage virtuel de cette chimiothèque fait ressortir 18 Composés présentant une amélioration significative de leur énergie d'interaction (voire Tableau N° 3 et Annexe 2).

**Tableau N° 3:** Energie d'interaction des meilleurs similaires envers l'ACHé.

Nom	N° Pub Chem	N° ACC	ΔG
ethyl 5-amino-2-methyl-4-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-1,4,6,7,8,9-hexahydrobenzo[b][1,8]naphthyridine-3-carboxylate	201	42618134	-15.7
ethyl 5-amino-2-methyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4,6,7,8,9-hexahydrobenzo[b][1,8]naphthyridine-3-carboxylate	209	16098495	-15.3
9-[7-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylsulfanyl)heptylsulfanyl]-1,2,3,4-tetrahydroacridine	166	23644649	-14.8
N-[9-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylsulfanyl)nonyl]-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine	20	11191908	-14.7
N-[8-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylsulfanyl)octyl]-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine	29	6540271	-14.6
N-[7-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylsulfanyl)heptyl]-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine	23	11113934	-14.4
N, N'-bis (1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)octane-1,8-diamine;dihydrochloride	71	23644827	-14.3
9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine bis 1,7-heptylene dihydrochloride	6	9959612	-14.1
n-(3-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)propyl)-n'-(4-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylsulfanyl)butyl)acetamide; N-[3-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)propyl]-N-[4-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylsulfanyl)butyl]acetamide	15	11489952	-13.9
6-[(8-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]-N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]hexanamide	110	11555826	-13.7
N'-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propanehydrazide	67	16094841	-13.6
N-[2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethyl]-2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)acetamide	82	10075220	-13.6
n-[6-(6-chloro-1,2,3,4-tetrahydro-acridin-9-ylamino)-hexyl]-2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-acetamid; n-[6-(6-chloro-1,2,3,4-tetrahydro-acridin-9-ylamino)-hexyl]-2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-acetamide; N-[6-[(6-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]hexyl]-2-(1,3-dioxoisoindol-2-yl)acetamide	96	23644605	-13.6
N-[3-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)propyl]-N-[3-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylsulfanyl)propyl]acetamide	14	11753218	-13.5
N-[2-oxo-2-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)hydrazinyl]ethyl]-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)propanamide	55	16094875	-13.4
6-[(8-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]-N-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]hexanamide	103	11606144	-13.4
3,4,5-trimethoxy-N-[5-oxo-5-[2-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)hydrazinyl]pentyl]benzamide	58	10496874	-13.3
ethyl 5-amino-2-methyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4,6,7,8,9-hexahydrobenzo[b][1,8]naphthyridine-3-carboxylate	204	16098503	-13.3



Le tableau 3 montre que les composés 201 et 209, avec les énergies d'interactions les plus faibles s'évaluant à $-15,7$ Kca/mol et $-15,3$ Kcal/mol respectivement, se présentent comme nouveaux inhibiteurs théoriquement plus puissants envers l'AChE. Le mode d'interaction de ces composés avec le site actif de l'AChE a été étudié à l'aide du programme ViewerLite. Comme le montre la figure N°20, le composé 201 est stabilisé au sein du site actif par de nombreuses interactions hydrophobiques précisément avec les résidus TYR341 PHE338 PHE295 HIS447 ARG296 TYR72 TRP86 PHE297 TRP236 TYR124 SER203. Néanmoins, aucune liaison hydrogène n'est constatée entre l'inhibiteur et le site actif de l'enzyme.

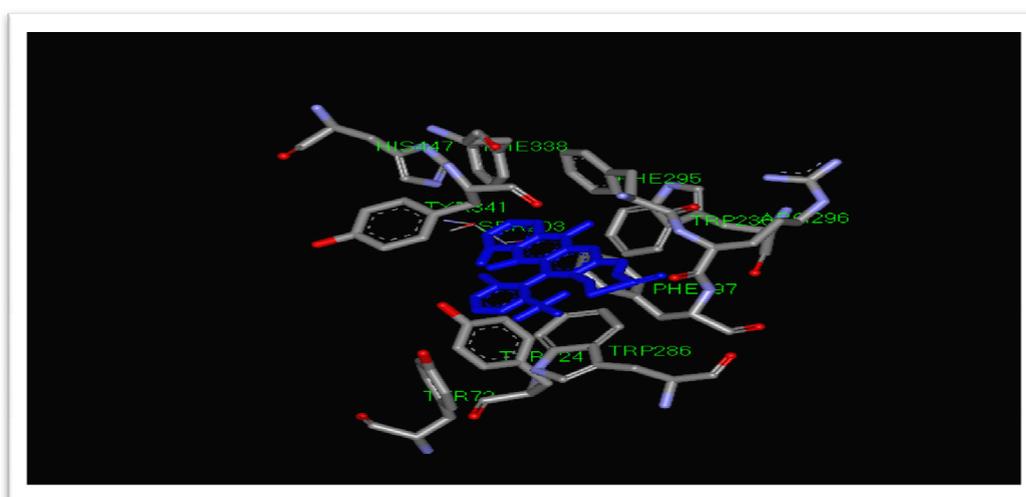


Figure N°20: Mode d'interaction de la molécule 201 dans le site actif de l'AChE.

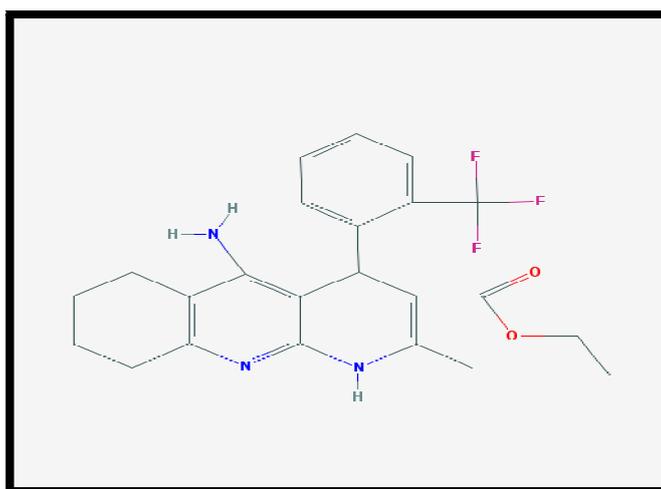


Figure N°21: Structure de composé 201.

De son côté, le composé 209 se présente comme un inhibiteur puissant et sélectif envers la l'AChE, car présentant le deuxième meilleur score d'énergie obtenu dans ce travail soit



-15.3 Kcal/mol. Cette énergie se traduit par la présence d'une seule liaison hydrogène entre le groupement oxygène de l'inhibiteur et le groupement OH du résidu TYR72 séparé par une distance de 2.4 Å de plus, le complexe AChE-composé 209 est stabilisé par de nombreuses interactions hydrophobes avec les résidus TYR133, SER203, TYR124, TYP236, TYR124, TRP86, PHE297, TYR72, PHE295, TRP286, TYR377, PHE338, TYR341, GLU292 du site actif de l'enzyme. (Voir figure N° 22)

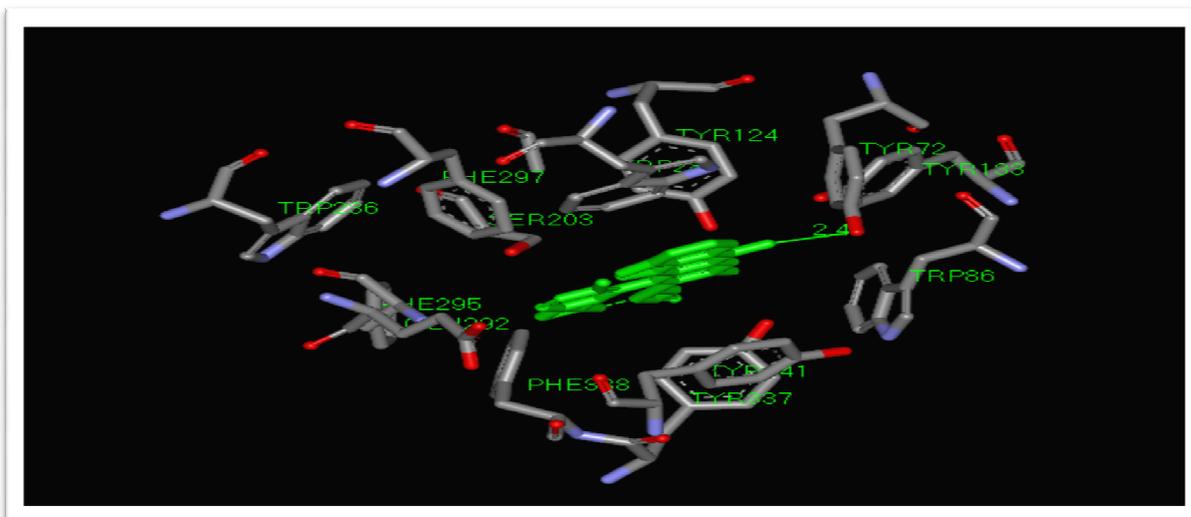


Figure N° 22: Mode d'interaction de la molécule 209 dans le site actif de l'AChE.

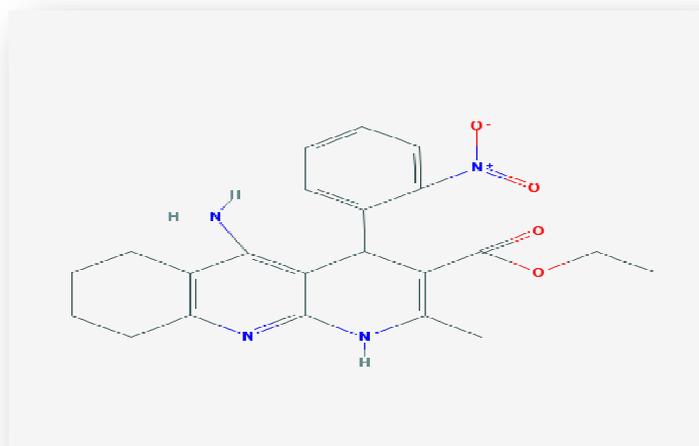


Figure N°23: Structure de composé 209.

Filtrage ADME/Tox :

Afin de vérifier les propriétés pharmacocinétiques (ADME) des composés 201 et 209, nous avons jugé utile d'appliquer la méthode de filtre ADME qui est basée sur la règle de 5 de Lipinski [39]. Les résultats sont montrés dans le tableau.

**Tableau N° 4:** Critères de la règle de Lipinski pour les composés 201 et 209.

	Composé 201	Composé 209
MW	431.450770 g/mol	408.45036 g/mol
LogP	4.8	3.7
Donneur d'hydrogène	2	2
Accepteur d'hydrogène	8	7
Liaisons rotatives:	4	4

Selon Lipinski, tous les composés ne validant pas au moins trois de ces conditions sont susceptibles de poser des problèmes d'absorption par voie orale. Dans notre cas, les composés 201 et 209 répondent parfaitement aux critères de la règle de Lipinski [39]. En se référant particulièrement à leur coefficient de partition eau / octanol, parfaitement dans les normes, il apparaît que ces inhibiteurs peuvent se dissoudre très facilement dans les phases aqueuses de l'organisme et traverser les membranes lipidiques pour parvenir jusqu'à leur lieu d'action.

Conclusion

L'objectif de ce mémoire était de s'initier aux approches par criblage virtuel afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de l'AChE ; cible thérapeutique validée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Avant de se lancer dans le travail de recherche, il était indispensable de tester la fiabilité du programme AutoDock vina utilisé dans ce travail. Pour ce la, nous avons fait recours à deux tests. Le premier test consiste à analyser visuellement les résultats du docking moléculaire réalisés pour les quatre complexes AChE-inhibiteurs disponibles dans la PDB. Le deuxième test consiste à déterminer le coefficient de corrélation linéaire qui existe entre les valeurs expérimentales de l'IC₅₀ de 43 inhibiteurs de l'AChE, et leur énergie d'interaction (ΔG) simulée par vina. En effet, le test par analyse visuelle montre que les modèles des ligands simulés par Vina sont correctement placés dans le site actif de l'AChE. Ils présentent des conformations spatiales parfaitement superposables à celles déterminées par cristallographie (expérimentalement). D'autre part, il existe une forte corrélation entre les énergies d'interaction et les IC₅₀ des inhibiteurs étudiés, avec un coefficient de corrélation égal à 0,81. Ces résultats apportent la preuve de la fiabilité du programme vina qui peut être utilisé sans trop risque d'erreurs pour étudier les mécanismes d'inhibition de l'AChE, objet de notre étude.

Dans l'espoir de développer de nouveaux inhibiteurs plus puissants de l'AChE, nous avons jugé important d'étudier profondément les mécanismes d'inhibition de cette enzyme par quelques inhibiteurs provenant de la littérature tout en évaluant leur énergie d'interaction. À l'issue de cette étude, il ressort que le composé 1 se présente comme meilleur inhibiteur connu jusque là avec une énergie d'interaction s'évaluant à -11.3 Kcal/mol.

En prenant comme structure de départ le squelette de base du composé 1, la banque de donnée *PubChem* nous propose une collection de 210 molécules similaires. Le criblage virtuel de ces composés envers le site actif de l'AChE fait ressortir les composés 201 et 209 comme nouveaux inhibiteurs plus puissants et sélectifs avec des énergies d'interactions égales à -15.7 et -15.3 Kcal/mol respectivement .

Enfin, l'application de la règle de 5 de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME de ces composés, ce qui rend possible leur utilisation par la voie orale.

Conclusion

En termes de perspectives, ce travail pourra être complété et prolongé par une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* afin de valider nos résultats théoriques.

Références bibliographiques

Référence :

- [1] J. LCummings.,G. Cole. Alzheimer disease, *Journal of the American Medical Association*. 2002; **287** : 23.
- [2] JJ Hauw., B. Dubois. M.Verny. CH. Duyckaerts. La maladie d'Alzheimer. *Pathologie. Science*. 199; **162** : 162.
- [3] L Gustafon. Physostigmine ant tetraaminoacridine treatment of Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* .1993 ; **88** :149.
- [4] Arrault A. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat d'université : Modélisation Moléculaire et Chemo-informatique. Orléans : Université d'Orléans. France. 2007. 176.
- [5] Mécanismes moléculaires dans les démences neurodégénératives. la maladie d'Alzheimer : aspects lésionnels et moléculaire diagnostiques et thérapeutique. [en ligne] <http://www.mmdn.univ-montp2.fr/> . Consulte le [08/04/2015].
- [6] Alzheimer's disease international. World Alzheimer Report .[en ligne] . <https://www.alz.co.uk/>. Consulte le [12/05/2015] .
- [7] Djazairess. La maladie d'Alzheimer en débat. [En ligne] <http://www.djazairess.com/fr/lqo/5166761> . Consulte-le : [17/04/2015].
- [8] Couderc.A. la recherche de marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer. *Annales de Biologie Clinique*. 2000; **58** :40.
- [9] F Lebert , F Pasquier. Signes et symptômes comportementaux et psychologiques de la démence. *Encyclopédie médico-chirurgicale*.1999; **35**: 7.
- [10] Société d'Alzheimer Canada. La maladie d'Alzheimer et les facteurs de risque. [En ligne]. <http://www.alzheimer.ca/fr>. Consulte le : [08/04/2015].
- [11] Laurent Letrilliart., Denis Pouchain. La prise en charge thérapeutique de la maladie d'Alzheimer et des démences apparentées. *Exercer- La revue française de médecine générale*.2011 ;**22**: 9.
- [12] Biologie Médicale spécialisée. Cholinestérase.[en ligne] <http://www.biomnis.com>. Consulte le [20/04/2015].

- [13] Mirjana B., Colovi.Z Danijela. Krsti.D Tamara. Lazarevi. M Aleksandra. Vesna M Vasi. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology.*Current Neuropharmacology* .2013;**11**:21.
- [14] Jacques-Philippe Colletier. Etude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acétylcholinestérase. Thèse de doctorat d'université : Biomolécules. Grenoble: Université Joseph-Fourier. France.2006.273.
- [15] Pharmacorama-Connaissance des médicaments. acétylcholine,acétylcholinestérase.[en ligne] <http://www.pharmacorama.com/>. consulte le :[29/04/2015].
- [16] J. L. Sussman, M. Harel, I. Silman. Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *Chemico-Biological Interactions* .1993; **87** :187-197.
- [17] J. Sussman. M. Harel. F. Frolow. C. Oefner. A. Goldman. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*.1991;**253**: 872-879.
- [18] L. S. Schneider., Outcome of Alzheimer's Disease: Potential Impact of Cholinesterase Inhibitors. *Current opinion in investigational drugs*. 2000; **2**:427-437.
- [19] Grutzendler J., Morris JC. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Drugs*.2001. **61**: 41-52.
- [20] Julien Rouleau. Synthèse et relations structure-activité de nouveaux inhibiteurs sélectifs de l'acétylcholinestérase, de type triterpène tétracyclique. thèse de doctorat d'université:biomolécules. paris : Université Paris-Sud (Orsay, Essonne).france.2008.298.
- [21]Yukio Ago., Ken Koda. Kazuhiro Takuma. Toshio Matsuda. Pharmacological Aspects of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galantamine. *Journal of Pharmacological Sciences*.2011; **116**:6-17.
- [22] Emanuele Perolaa., Luciano Cellaia. Dorian Lambaa. Luigi Filocamob. Mario BrufanibLong chain analogs of physostigmine as potential drugs for Alzheimer's disease: new insights into the mechanism of action in the inhibition of acetylcholinesterase.*Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*.1997; **1343**: 41–50.

[23] F. PILOTAZ., P. MASSON. L'huperzine A : un inhibiteur de l'acétylcholinestérase à fort potentiel pharmacologique. *Annales pharmaceutiques françaises*. 1999; **57**: 363-373.

[24] Mankil Jung., Moonso Park. Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 2007;**12**:213.

[25] M. Harry., Greenblatt. Hay Dvir .israel silman. L. Joel . Sussman. acetylcholinesterase. *journal of molecular neuroscience*. 2003;**20**:369-383.

[26] Ronald J. Polinsky., Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clinical Therapeutics*. 1998; **20**:634–647.

[27] Krid Adel .Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant. Mémoire de magister d'université : Chimie théorique. Constantine: Université les frères Mentouri . Algérie. 2008. 79.

[28] A. Martinez ., E. Fernandez. A. Castro. S. Conde. I. Rodriguez-Franco. J. E. Banos. A. Badia. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2000 ; **35** : 913-922.

[29] E. Rose., J. Aleu. J. Marsal. C. Solsona. *European Journal of Pharmacology*. 2000 ; **390** : 7-13.

[30] Criblage virtuel par docking moléculaire [En ligne] bioinfo-pharma.ustrasbg.fr/labwebsite/publications/paper99.pdf. Consulté le [20-05.2015].

[31] Krid yasmine. Conception in silico de nouveaux flavonols inhibant potentiellement l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour le traitement de l'hypertension artérielle. Mémoire de master d'université : Biochimie Moléculaire et Santé. Constantine : Université des frères Mentouri. Algérie. 2013. 90.

[32] Martin L. Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif : une application sur la protéine kinase FAK. Thèse de doctorat d'université : Bioinformatique. Montpellier : Université Montpellier 2. France. 2006. 149 p.

[33] Protein Data Bank. [En ligne] www.rcsb.org/pdb/home/home.do . Consulté le : [04/05/2015].

[34] Mokrani E. H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.

[35] Judith el kaim. drug design in silico criblage virtuel de protéines à visée thérapeutique. Thèse de doctorat d'université : Bioinformatique. Montpellier : Université bordeaux 1. France. 2011. 251 p.

[36] la chimiothèque nationale. [en ligne]. <http://chimiotheque-nationale.cn.cnrs.fr/>. consulte le : [18/05/2015].

[37] PubChem . [en ligne]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consulte le : [18/05/2015].

[38] Zinc. [en ligne]. <http://zinc.docking.org/>. Consulte le : [19/05/2015].

[39] Lipinski C. A., Lombardo F., Domini B. W., Feney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and

[40] Calculation of molecular properties. Molinspiration. [en ligne]. <http://www.molinspiration.com>. Consulte le [15/05/2015].

[41] Rydberg, E.H., Brumshtein, B. al. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of Bis5-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006; **49**: 5491.

[42] Cheung, J., Gary, E.N. Shiomi, K. Rosenberry, T.L. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrem B show peripheral site flexibility. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2013; **4**: 1091-1096.

[43] I Silman., J Sussman. al. Structure of acetylcholinesterase (E.C.3.1.17) complexed with N-9(1', 2',3',4'-tetrahydroacridinyl) -1,8-diaminooctane angstroms resolution. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003; **125**: 363.

[44] E.H Rydberg., Bbrumshtein. H M Greenblatt. al. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of Bis5-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006; **49**: 5491.

[45] H Fouad.,Darras.sarah wehle.Guozheng Huang.A Christoph.Michael Decker.amine substitution of quinazolinones leads to selective nanomolar AchE inhibitors with ‘inverted’ binding mode.*Bioorganic & medicinal chemistry*.2014 ; **22** : 15.

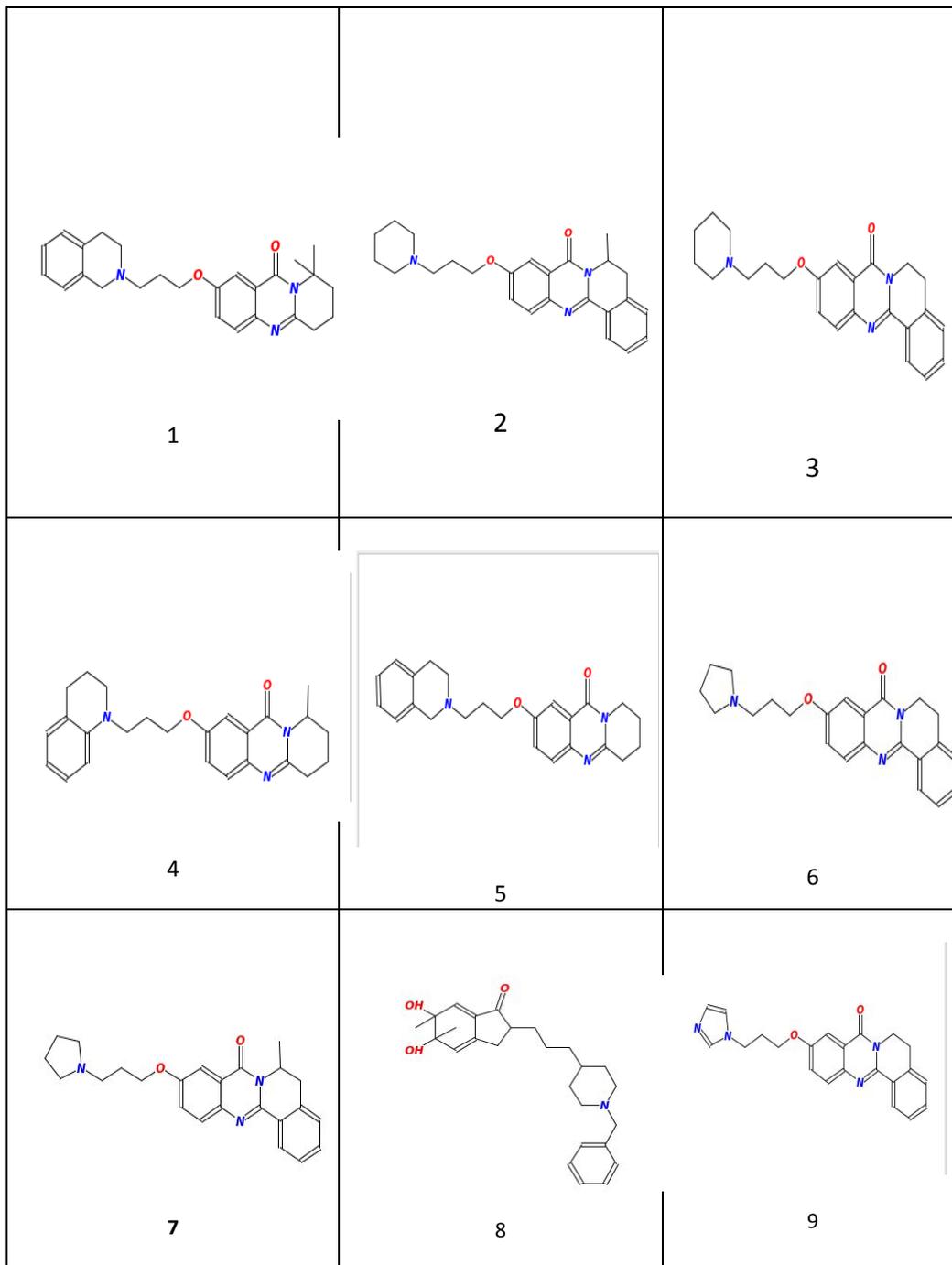
[46] Gitay Kryger., Israel Silman. Joel LSussman.Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept) implications for the design of new anti-Alzheimer drugs .*Structure*.1999 ;**7** :11.

[47] Maryam Mohammadi-Khanaposhtani., al . Potent acetylcholinesterase inhibitors: Design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acridone linked to 1,2,3-triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*.2014; **15**:63.

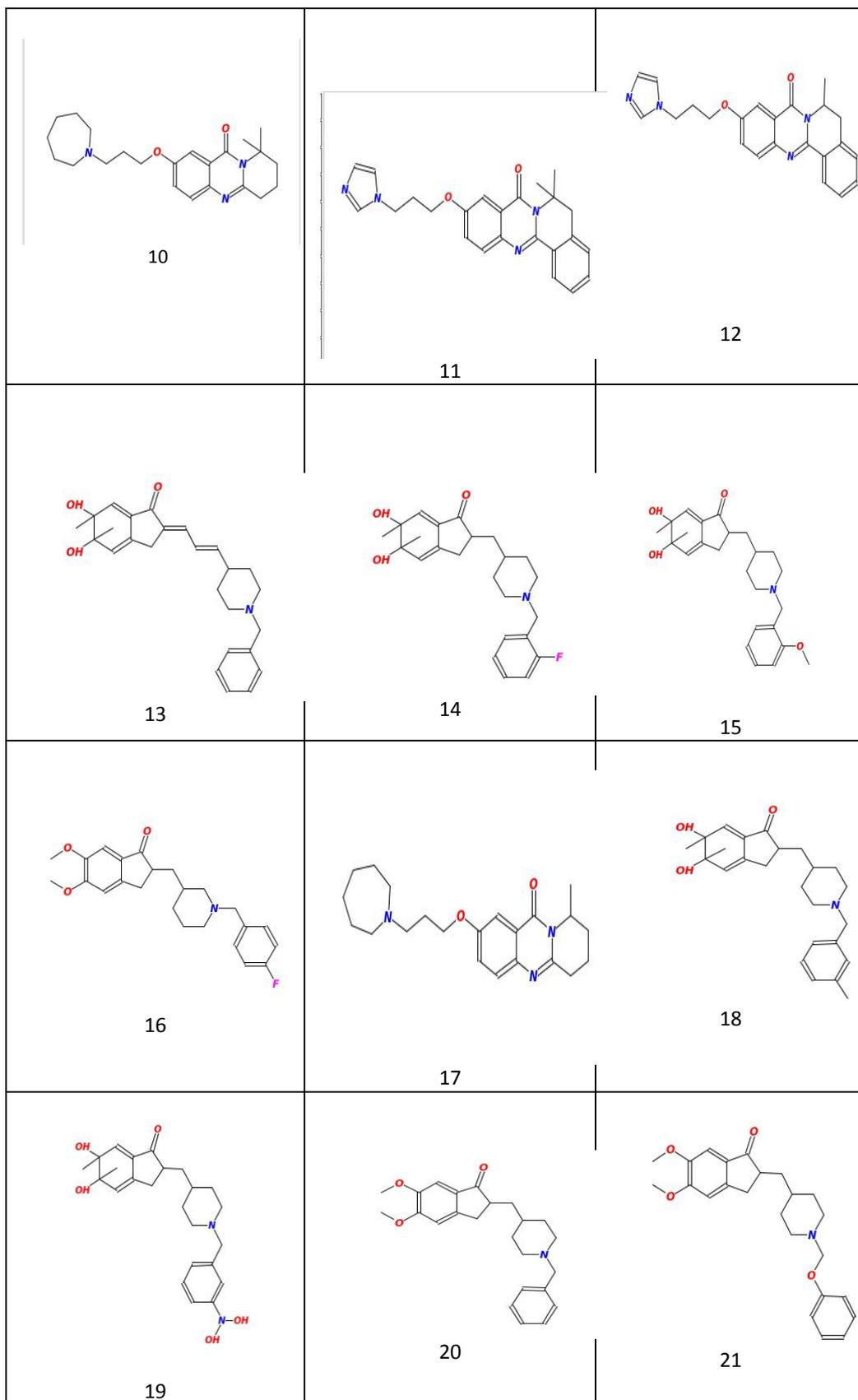
[48] Bensegueni A. Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des Composés de synthèse sur le plan de l’activité biologique: simulation par docking (arrimage) Moléculaire sur la lipoxigénase et la cyclooxygénase. Thèse de doctorat d’université : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri de Constantine. Algérie. 2007. 76p.

Annexes

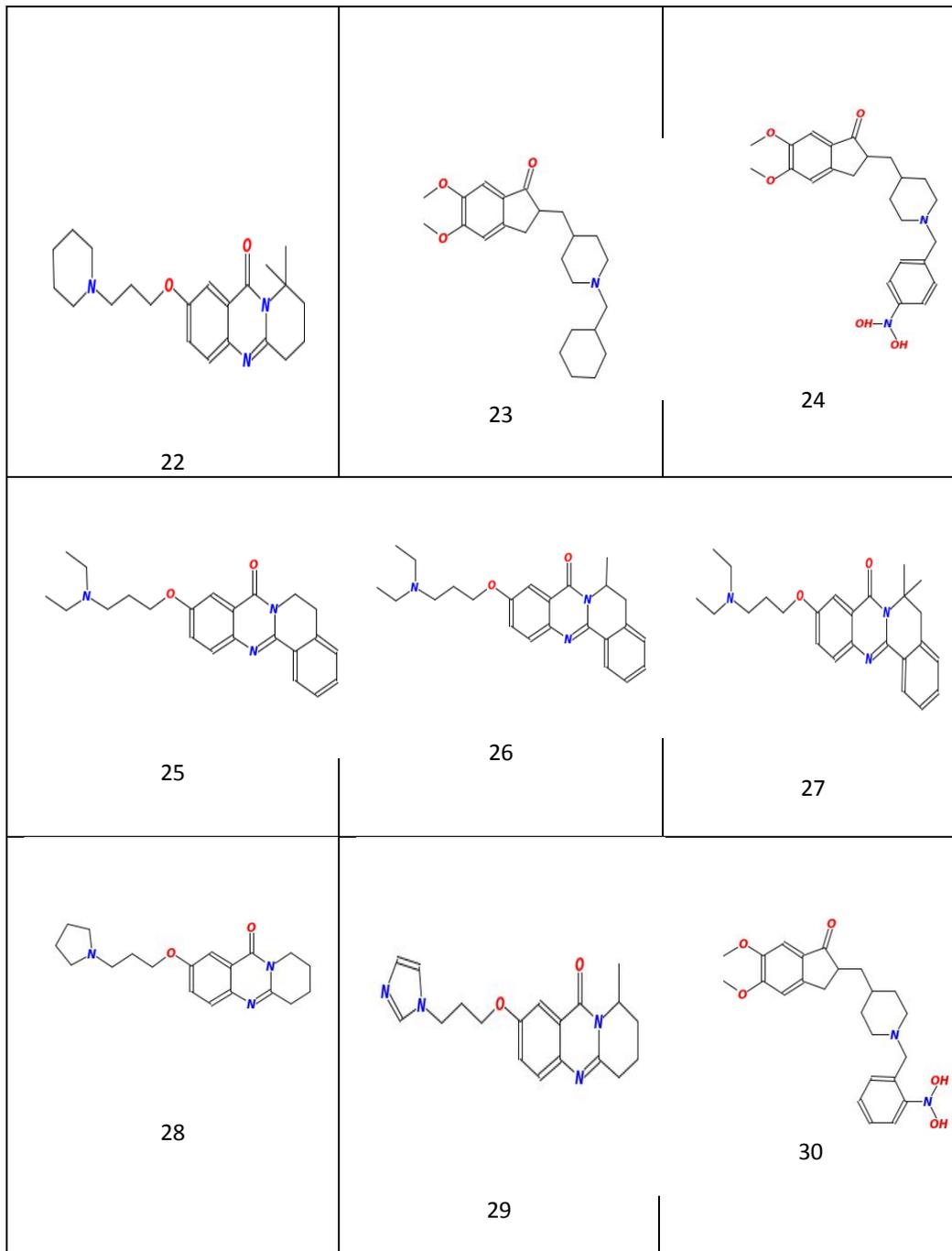
Annexes1 : structure des inhibiteurs de l'Ache utilisés dans l'étude de corrélation.



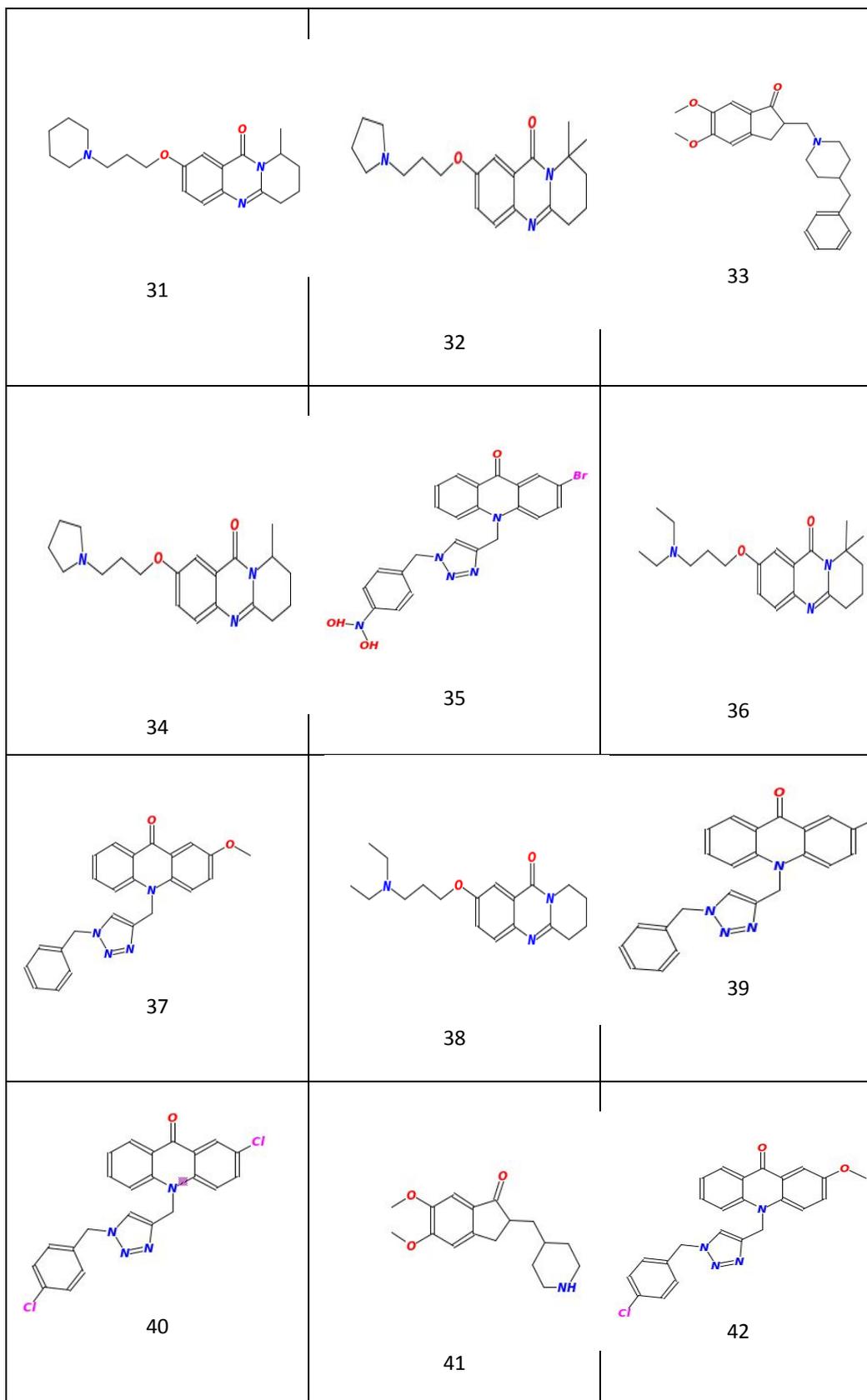
Annexes1 : structure des inhibiteurs de l'Ache utilisés dans l'étude de corrélation.



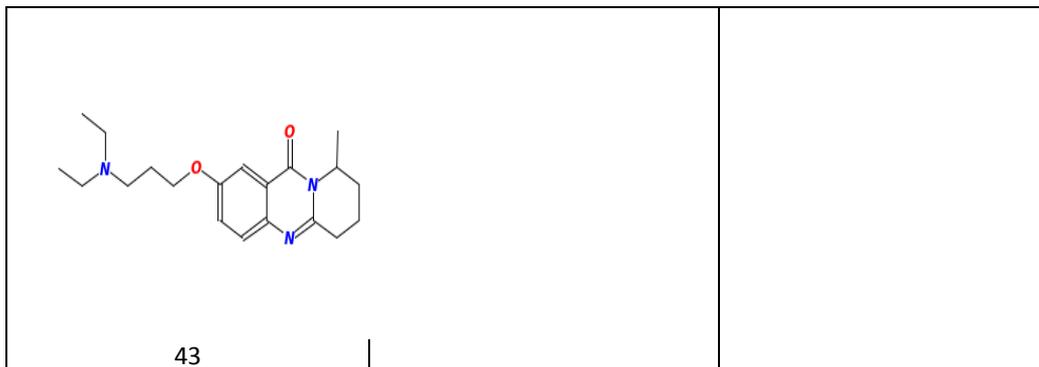
Annexes1 : structure des inhibiteurs de l'Ache utilisés dans l'étude de corrélation.



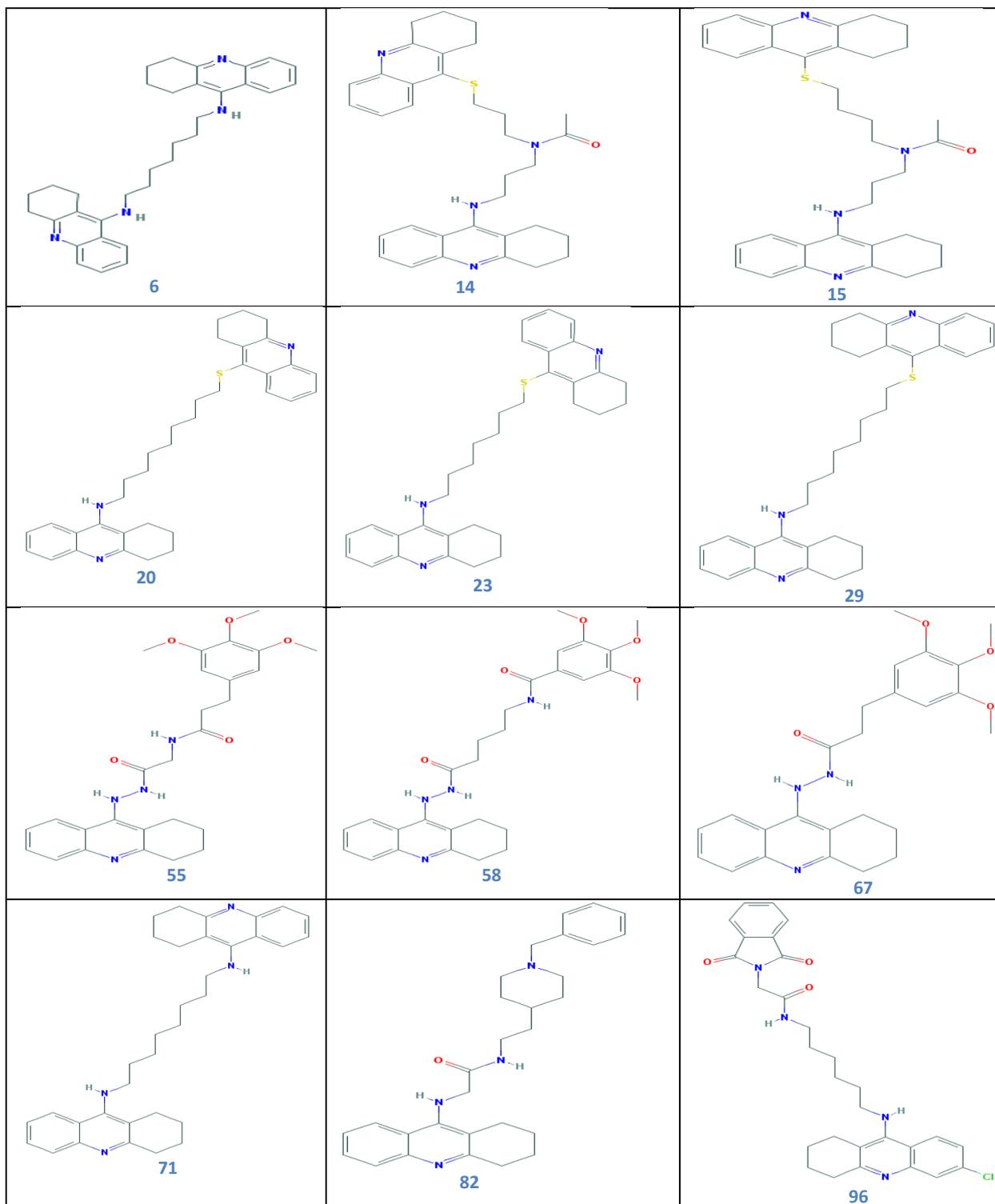
Annexes1 : structure des inhibiteurs de l'Ache utilisés dans l'étude de corrélation.



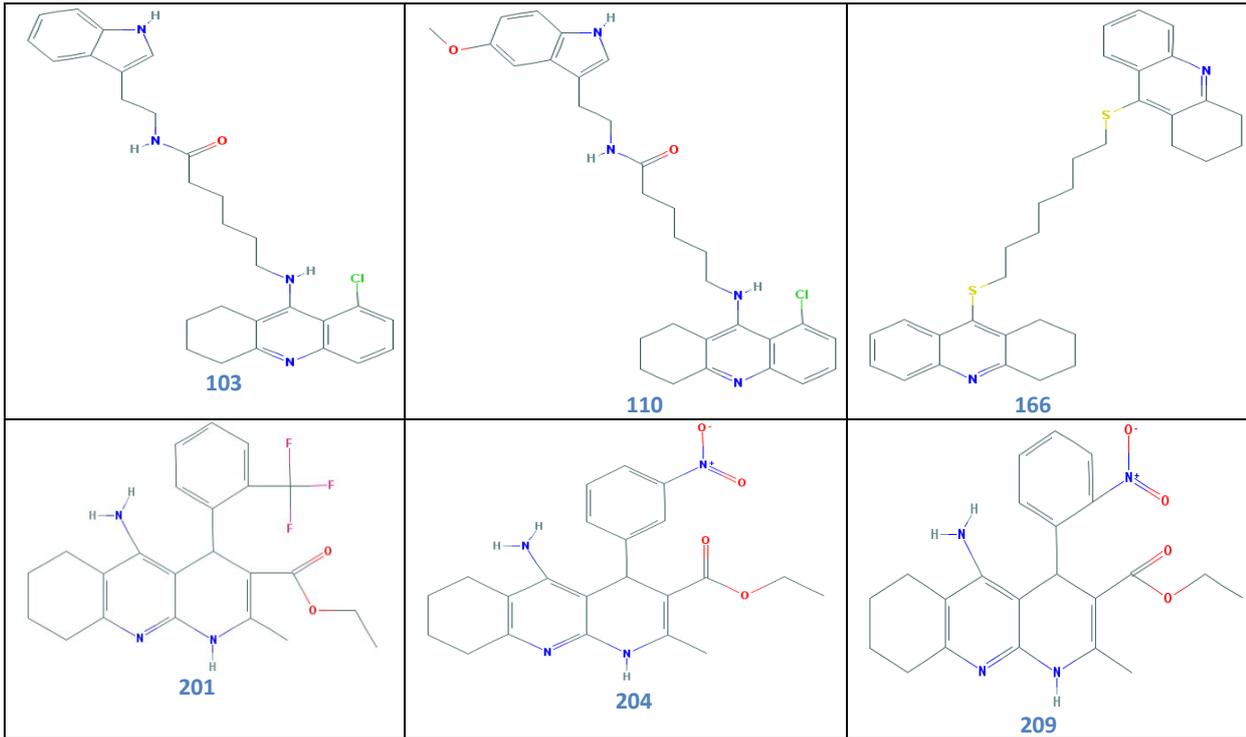
Annexes1 : structure des inhibiteurs de l'Ache utilisés dans l'étude de corrélation.



Annexe 2 : structure des meilleurs similaires envers l'ACHé



Annexe 2 : structure des meilleurs similaires envers l'ACHé



Résumé

Résumé :

Notre travail, qui entre dans le cadre du mémoire de master, s'inscrit dans le courant de la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'AChE ; cible thérapeutique validée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Pour ce faire, nous avons fait appel aux approches par criblage virtuel avec AutoDock vina. En effet, une collection de 210 molécules issues de la PubChem a été testée envers le site actif de l'AChE. A l'issue de ce criblage, les composés 201 (CID-42618134) et 209 (CID-16098495), avec les plus faibles valeurs de leur énergie d'interaction soit -15.7 Kcal/mol et -15.3 Kcal/mol, se présentent comme nouveaux inhibiteurs théoriquement plus sélectifs et affins envers l'AChE. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME de ces composés.

Mots clés : AutoDock Vina, criblage virtuel, AChE, inhibiteur, Energie d'interaction.

Abstract :

Our work, which is part of the master dissertation, falls within the course of seeking new AChE inhibitors; validated therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease. To do this, we used the virtual screening approaches with AutoDock vina. Indeed, a collection of 210 molecules from the PubChem has been tested towards the active site of AChE. At the end of this screening, compounds 201 (CID-42618134) and 209 (CID-16098495), with the lowest values of their interaction energy which is -15.7 kcal / mol and -15.3 kcal / mol, is as new theoretically more selective inhibitors and closest towards the AChE. Finally, the application of the Lipinski rule shows information in a positive way about the ADME properties of these compounds.

الملخص:

عملنا، الذي هو أطروحة الماجستير هدفه إيجاد مثبطات طبيعية جديدة لإنزيم أستيلكولينستراز ؛ وذلك بغية علاج مرض الزهايمر. للقيام بذلك، قمنا باستعمال طريقة غربلة الجزيئات نظريا اتجاه الانزيم المدروس باستعمال AutoDock vina. سمحت لنا غربلة 210 مركب اتجاه هذا الانزيم باقتراح: المركب 201 (CID-42618134) و المركب 209 (CID-16098495) كمثبطين جديدين محتملين لإنزيم أستيلكولينستراز. مع تسجيل طاقتي ارتباط تقدران بـ: ك كال/مول على 15.7 - ك كال/مول و 15.3 - على التوالي. إن تطبيق قاعدة Lipinski على هذين المثبطين يؤكد تميزهما بخصائص فيزيوكيميائية تمكنهما من ممارسة نشاطهما البيولوجي بصفة عادية.

Abdelaziz GUECHCHIRI
Farouk CHIBAT

Date de soutenance : 15/06/2015

Contribution à la mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase par docking moléculaire.

Résumé :

Notre travail, qui entre dans le cadre du mémoire de master, s'inscrit dans le courant de la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'AChE ; cible thérapeutique validée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Pour ce faire, nous avons fait appel aux approches par criblage virtuel avec AutoDock vina. En effet, une collection de 210 molécules issues de la PubChem a été testée envers le site actif de l'AChE. A l'issue de ce criblage, les composés 201 (CID-42618134) et 209 (CID-16098495), avec les plus faibles valeurs de leur énergie d'interaction soit -15.7 Kcal/mol et -15.3 Kcal/mol, se présentent comme nouveaux inhibiteurs théoriquement plus sélectifs et affins envers l'AChE. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME de ces composés.

Mots clés: AutoDock Vina, criblage virtuel, AChE, inhibiteur, Energie d'interaction.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie Appliquée et Santé.

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHIKHI A. (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : MOKRANI E.H. (Maître assistant «A» - UFM Constantine).

Examineurs : BENSEGUENI A. (Professeur - UFM Constantine).

