



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث 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 والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية  
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

Thème :

---

# Etude *in silico* de l'inhibition de la Butyrylcholinestérase

---

Présenté et soutenu par :

Le : 15/06/2015

BILAMI YACINE

BOUKAHIL MAYA

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHIKHI A. (Pr. Université des Frères Mentouri Constantine).

Rapporteur : BENSEGUENI A. (Pr. Université des Frères Mentouri Constantine).

Examineur : MOKRANI E.H. (M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine).

Année universitaire  
2014 - 2015

# *Remerciements*

Tout d'abord merci beaucoup dieu de nous donner la patience et la force et le courage pour compléter ce travail.

Il nous est agréable *d'exprimer notre plus profonde gratitude et remerciement le plus sincère a notre encadreur Mr. BENSEGUENI A. professeur à Université des Frères Mentouri Constantine pour son aide, ses orientations judicieuses sa disponibilité, patience et sur tout sa confiance. Qu'il trouve ici un hommage vivant à sa haute personnalité.*

*C'est avec un grand plaisir que nous remercions Mr. CHIKHI A. Professeur à Université des Frères Mentouri Constantine pour l'honneur qu'il nous fait en présidant le jury de ce mémoire.*

Et nous tenons à adresser notre profonde *gratitude* et notre grand reconnaissance et remerciement à *Mr MOKRANI EH. Maitre-assistant 'A' à Université des Frères Mentouri Constantine d'avoir accepté de faire partie du jury, ainsi sa contribution à la réalisation de la partie pratique, pour son aide sa patience et ces nombreux conseils tout le long de travail.*

*Enfin, que tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, tout qui étaient à nos côtés au cœur de cette expérience trouvent ici l'expression de nos profonde reconnaissance.*

## *Dédicaces*

*Il y a ceux pour le quels le mot "merci" n'est plus suffisant. Mes parents tout d'abord. Chacun de vos mots, de vos gestes m'ont construite. Je voudrais vous dire aujourd'hui toute la reconnaissance j'ai pour vous. C'est la plus grande des chances de vivre entourée comme je le suis, par des gens qui rendent la vie plus belle, et les pires moments finalement surmontables.*

*A mes très cher frères **Ibrahim, Abd el wahid et Hamdani***

*A toute ma famille. Oncles, tantes, cousins et cousines*

*Pour leurs amours et leurs encouragements.*

*Ce mémoire en particulier, n'existe aujourd'hui que par des années de sacrifices et de soutien permanent de votre part. Vous avez ma gratitude éternelle. Je vous aime tant.*

*A mon binôme **Boukahil Maya** pour son soutien et qui a partager avec moi les moments difficiles.*

*A tous mes enseignants un par un, ainsi que toute la promotion de master2 **BMS 2015** un par un mes amis.*

*Et pour finir je présente d'avance mes excuses à ceux dont j'aurais oublié de citer le nom*

*Je vous dédie ce travail tout en espérant le succès dans votre vie.*



## *Dédicace*

*A la mémoire de mon grand-père.*

*A ma grande mère.*

*A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*A mon frère Raïd.*

*A mes deux meilleures amies Ouïs Imene et Abed Amira.*

*A mon binôme Bilami Yacine qui a partagé ce travail avec moi.*

*A tous mes amis et mes cousines.*

*A tous mes enseignants ainsi que tous mes collègues de promotion 2015 de master 2 BMS.*

*Et enfin, grand remerciement a tata Nadjiba Ben Ahmed.*



Liste des figures et tableaux

Liste des abréviations page

**Introduction.....1**

## **Revue bibliographique**

### **Chapitre1 : La maladie d'Alzheimer**

1. Maladie d'Alzheimer (MA).....	3
2. Fonctionnement du cerveau .....	3
2.1. L'hippocampe et le lobe temporal.....	4
2.2. Le lobe pariétal .....	4
2.3. Le lobe frontal .....	4
2.4. Le lobe occipital.....	4
2.5. Progression de la maladie d'Alzheimer dans le cerveau.....	6
2.6. Les facteurs de risque de la maladie.....	7
2.6.1. L'âge.....	7
2.6.2. Les antécédents familiaux et la génétique.....	7
2.6.3. Les facteurs génétiques (le gène ApoE4).....	7
2.6.4. Les maladies cardiovasculaires.....	8
2.6.5. Le syndrome de Down.....	8
2.6.6. Autres facteurs de risques.....	8

### **Chapitre2 : Labutyrylcholinestérase et les inhibiteurs**

1. La butyrylcholinestérase (BuChE).....	9
1.1. Structure des enzymes.....	9
1.2. Rôle physiologique.....	10
1.3. L'enzyme de la MA.....	10
2. Les inhibiteurs de la butyrylcholinestérase.....	11
2.1. Les Alcaloïdes.....	11
2.2. Les flavonoïdes.....	12
2.3. Inhibiteurs de BChE puissant très sélectif.....	14
3. Les principaux inhibiteurs qu'on va tester.....	15
3.1. Donepezil.....	15
3.2. Anthrylcarbonyl-phenothiazine.....	16
3.3. Galantamine.....	16
3.4. Tacrine.....	16

3.5. Les 25 autres inhibiteurs.....	22
-------------------------------------	----

### **Chapitre3 : Docking moléculaire**

Introduction.....	26
1. Les outils de Docking moléculaire.....	27
1.1. Les récepteurs.....	27
1.2. Le(s) ligand(s).....	28
2. Programme du Docking moléculaire.....	28

### **Chapitre4 : Matériels et méthodes**

1. Matériels.....	30
<b>1.1.</b> Microordinateur.....	30
<b>1.2.</b> Programmes (logiciels).....	30
1.2.1. Titan .....	30
1.2.2. PyRx.....	30
1.2.3. AutoDock Tools.....	30
1.2.4. OpenBabel-2.0.2.....	30
1.2.5. <i>ViewerLite42</i> .....	30
<b>1.3.</b> Ligands.....	30
<b>1.4.</b> Récepteur.....	31
2. Méthodes.....	31

### **Chapitre5 : Résultats et discussion**

1. Fiabilité du programme de Docking.....	32
1.1. Analyse visuelle.....	32
1.2. Le coefficient de corrélation linéaire.....	34
1.3. Conclusion.....	3
2. Etude des interactions entre les inhibiteurs et la BuChE.....	36
2.1. Interactions entre X10 et le site actif.....	36
3. Etude des interactions du composé 1.....	40
4. Application de la règle de LIPINSKI.....	41

<b>Conclusion.....</b>	<b>43</b>
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

## Liste des figures

page

<b>Figure N°01</b> : Représentation schématique des quatre lobes du cerveau.....	4
<b>Figure N°02</b> : Représentation des plaques amyloïdes et les dégénérescences neuro-fibrillaire.....	5
<b>Figure N° 03</b> : formation des dégénérescences neuro-fibrillaire .....	6
<b>Figure N°04</b> : principaux région du cerveau touché par la maladie D'Alzheimer.....	7
<b>FigureN°05</b> : structure tridimensionnelle de la BuChE.....	11
<b>Figure N°06</b> : structure des alcaloïdes qui ont prouvé leur efficacité d'inhiber la BuChE.....	13
<b>FigureN°07</b> : structure des flavonoïdes qui ont prouvé leur efficacité d'inhiber la BuChE.....	14
<b>FigureN°08</b> : structure des inhibiteurs mixtes.....	15
<b>FigureN°09</b> : Les plus puissant des inhibiteurs de la BuChE.....	16
<b>FigureN°10</b> : structures de 18 molécules de tacrine avec des radicaux différents.....	21
<b>Figure N°11</b> : exemple de la position d'un ligand par docking moléculaire.....	31
<b>FigureN°12</b> : positionnement du ligand dans grille tridimensionnelle du site actif.....	34
<b>FigureN°13</b> : superposition de cinq inhibiteurs de la BuChE (colorés en violet) et ceux obtenus par docking moléculaire (colorés en vert).....	37
<b>Figure N°14</b> : Corrélation entre l'activité biologique de 48 inhibiteurs et leur énergie d'interaction avec la BChE.....	40
<b>FigureN°15</b> : analyse visuelle réalisée par ViewerLite42 de la position du composé X10 dans le site actif.....	42
<b>Figure N°16</b> : structure du composé X10 (Anthrylcarbonyl-Phenothiazine) avec les nouvelles substitutions.....	43
<b>FigureN°17</b> : interactions du composé 1 avec le site actif de la BuChE.....	44

## *Liste des tableaux*

### **page**

<b>Tableau N°01</b> :structure de 26 inhibiteurs différents avec différent radicaux.....	22
<b>Tableau N°02</b> : Résultats des énergies d'interactions des 48 inhibiteurs de la BuChE et leur activité biologique (log IC <sub>50</sub> ).....	38
<b>Tableau N°03</b> : Valeurs des énergies d'interaction des 8 nouveaux composés.....	43
<b>Tableau N°04</b> : Résultats de la règle de Lipinski sur le composé1.....	45



## *Liste des abréviations*

**OMS:** Organisation Mondiale de la Santé

**MA :** Maladie d'Alzheimer

**BuChE :** *La Butyrylcholinestérase*

**AChE :** *l'acétylcholinestérase*

**ACH :** *acétylcholine*

**NMDA :** N-méthyl-D-aspartate

**IC50 :** Inhibitory Concentration 50

**Å :** angström.

**ADME :** Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion.

**Ki<sub>50</sub> :** constante d'inhibition 50

**r :** le coefficient de corrélation linéaire.

**PDB :** protéine Data Bank.

**3D :** trois dimensions.

**2D :** deux dimensions.

**ΔG :** énergie d'interaction.

**LogP :** Le coefficient de partition octanol / eau « logP.

**Str :** structure.

**PM:** Un point moléculaire.

**nON :** liaisons accepteur d'Hydrogène.

**nOHNH :** liaisons donneur d'Hydrogène.

**nrotb :** liaisons rotables ou flexibles.

**RMSD:** Root Mean Square Deviation.

**Protéine TAU:** protéine tubule-associated unit.

**APP :** protéine précurseur de l'amyloïde.

## **Introduction :**

Pertes de mémoire, de jugement et de raisonnement, changements d'humeur des troubles dans le comportement, dans le langage et dans l'attention avoir des difficultés légères à s'exprimer, une confusion, une désorientation dans le temps et dans l'espace et un amoindrissement du jugement.....

### **Ces symptômes peuvent traduire une maladie d'Alzheimer débutante**

Découverte en 1907 par Aloïs Alzheimer, la maladie d'Alzheimer est une affection du cerveau dite « neuro-dégénérative », c'est-à-dire qu'elle entraîne une disparition et perte progressive des neurones.

Ces neurones, qui servent à programmer un certain nombre d'actions, en disparaissant entraînent une altération des facultés cognitives : mémoire, langage, raisonnement, etc. L'extension des lésions cérébrales cause d'autres troubles qui réduisent progressivement l'autonomie de la personne.

Malheureusement, petit à petit d'autres zones du cerveau sont touchées et mènent à la disparition progressive des capacités d'orientation dans le temps et dans l'espace, de reconnaissance des objets et des personnes,

Elle apparaît plus souvent chez les personnes âgées, mais elle n'est pas une conséquence normale du vieillissement.

Les causes exactes de la maladie d'Alzheimer restent encore inconnues. Des facteurs génétiques et environnementaux contribueraient à son apparition et à son développement.

Il existe cependant des facteurs de risques connus : certaines anomalies génétiques, des facteurs de risque cardio-vasculaires ou encore l'intoxication à certains métaux lourds.

La vitesse et l'évolution de la maladie sont variables d'un individu à l'autre, ce qui rend difficile tout pronostic précis. L'espérance de vie varie ainsi de 3 à 8 ans selon l'âge du patient au moment du diagnostic.

Retarder l'évolution de la maladie, traiter les symptômes et préserver les capacités du patient sont les objectifs du traitement de cette maladie. Aujourd'hui, il n'existe encore aucun traitement curatif de cette pathologie.

Mais certains traitements médicamenteux peuvent permettre de ralentir l'évolution des troubles, donc ils n'empêchent pas la dégénérescence et la mort neuronale, mais peuvent ralentir la progression symptomatique de la maladie.

Actuellement les médicaments qui sont disponibles agissent en empêchant la destruction des neuro - transmetteurs qui permettent de transporter l'information d'un neurone à l'autre dans certaines régions du cerveau.

Deux traitements médicamenteux peuvent être proposés aux malades :

\*des inhibiteurs de la cholinestérase pour empêcher la destruction du neuromédiateur.

\*et un antiglutamate (antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate)

Les récepteurs NMDA sont appelés ainsi parce qu'ils sont activés par le N-méthyl-D-aspartate, agoniste de synthèse très puissante. Il s'agit d'un récepteur-canal qui s'ouvre lors de la fixation du glutamate et laisse entrer les ions  $\text{Na}^+$  et surtout  $\text{Ca}^{2+}$ . Et qui sont essentiels à la mémoire et à la plasticité synaptique.

Ces traitements permettent :

- Une atténuation des symptômes cognitifs
- Un retard de leur aggravation
- Un retard de la perte d'autonomie
- Une diminution des troubles du comportement

Cette maladie pose un vrai problème de santé publique.

Les personnes âgées de plus de 60 ans représentent 7,9 % de la population algérienne, l'espérance de vie est de 76 ans chez la femme et de 74 ans chez l'homme, la population vieillit et le risque d'une pathologie liée à l'âge est imminent, personne n'est immunisé. Elle concerne plus souvent les femmes que les hommes, On compte dans le monde, selon l'OMS, 25 millions de personnes touchées par la maladie dont environ 100.000 cas en Algérie. [1]

Notre travail a pour but de rechercher *in silico* des inhibiteurs potentiels de la butyrylcholinestérase par la méthode de docking moléculaire avec le programme **PyRx** et d'évaluer leurs caractéristiques physico-chimiques par la règle de 5 de Lipinski.

**\*On retrouvera dans ce travail un 1<sup>er</sup> chapitre qui présente la maladie d'Alzheimer.**

**\*Dans le 2<sup>ème</sup> chapitre seront présentées les structures de l'enzyme et des inhibiteurs**

**\*Le 3<sup>ème</sup> chapitre traitera du docking moléculaire**

**\*Dans le 4<sup>ème</sup> chapitre on retrouvera la partie Matériel et méthodes**

**\*Le 5<sup>ème</sup> chapitre concerne les résultats et la discussion**

**\*Enfin une conclusion clôturera ce travail.**

## Chapitre 01 : la maladie d'Alzheimer

\***Le cerveau** est le quartier général du système nerveux central. Plus de 10 milliards de cellules transmettent et reçoivent des messages des différentes parties de l'organisme. Le cerveau contrôle toutes nos pensées et la plupart de nos mouvements. De ce fait le cerveau peut être atteint de plusieurs et graves maladies dont principalement la **Maladie d'Alzheimer**.

### 1. Maladie d'Alzheimer (MA) :

La maladie d'Alzheimer est une maladie neuro-dégénérative, « Neuro » signifie « cerveau » et « dégénérescence » signifie qu'il y a une dégradation. Ce qui signifie que les cellules du cerveau (les neurones) sont progressivement perdues au fil du temps, D'une certaine manière c'est une panne du cerveau. [2]

La maladie d'Alzheimer a été découverte par le docteur psychiatre 'Alois Alzheimer en 1907'. Après le décès d'une de ses patientes 'Auguste.D', en réalisant une étude histopathologique de son cerveau atteinte de démence.

Il met en évidence deux types de lésions :

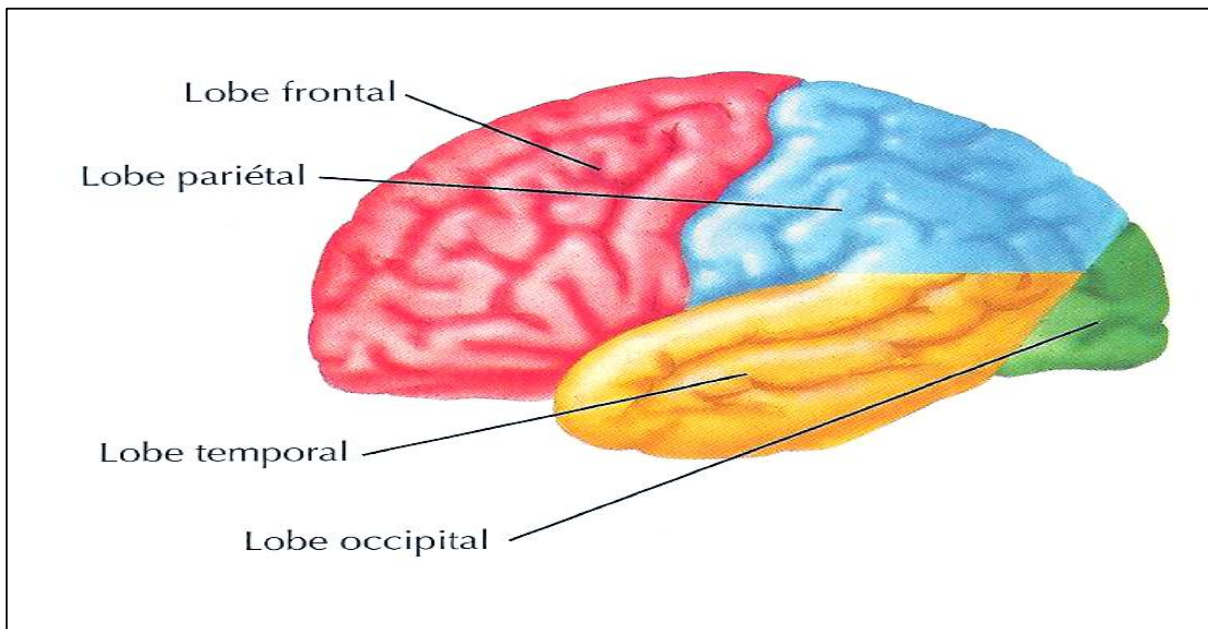
\*Des amas anormaux (qu'on appelle des plaques amyloïdes ou plaques séniles). \*Des faisceaux de fibres enchevêtrées (qu'on appelle dégénérescences neuro-fibrillaires). Il conclut à une maladie singulière du cortex cérébral.[3] La MA et une maladie incurable du tissu cérébral, elle apparait progressivement et inexorablement avec l'Age.

« L'Alzheimer peut être vue comme une forme très accélérée de vieillissement. En théorie, si nous vivions jusqu'à 150 ou 160 ans, il est quasiment certain que nous aurions tous l'Alzheimer, pour que l'Alzheimer survienne dans la soixantaine, il faut être prédisposé à la maladie par l'hérédité, les habitudes de vie. Dans 10 à 15 % des cas cette maladie se transmet génétiquement » [3]

### 2. Fonctionnement du cerveau :

Le cerveau est constitué de neurones qui sont étroitement connectés entre eux pour construire un vaste réseau, ces connections sont appelées synapses ayant pour rôle de faire passer l'information d'un neurone à un autre.

Le cerveau est divisé en quatre lobes :



**Figure N°01** : Représentation schématique des quatre lobes du cerveau

### **2.1. L'hippocampe et le lobe temporal :**

L'hippocampe traite la mémoire verbale (souvenirs associés à ce qu'on a lu, dit ou entendu) et la mémoire visuelle (reconnaissance des objets, des visages, des lieux). Le lobe temporal contrôle les apprentissages récents et la mémoire immédiate. L'hippocampe et le lobe temporal représentent le centre de la mémoire et du langage.

### **2.2. Le lobe pariétal :**

Il nous permet d'effectuer des tâches ou d'utiliser des outils dans un ordre cohérent et logique (comme enfiler ses vêtements dans le bon ordre, démarrer et conduire une voiture, etc.) Il contrôle également notre faculté à comprendre des informations spatiales (par exemple, le lieu précis où nous nous trouvons, l'emplacement des lieux, des objets).

### **2.3. Le lobe frontal :**

Il permet de prendre des initiatives, de planifier d'organiser nos actions. Il contrôle nos valeurs et notre comportement en société.

### **2.4. Le lobe occipital :**

Il contrôle la vision, la faculté de voir et d'associer les couleurs, les formes, les angles et les mouvements de manière intelligente.

Dans La MA avant l'apparition des premiers symptômes deux lésions cérébrales se forment dans le cerveau.

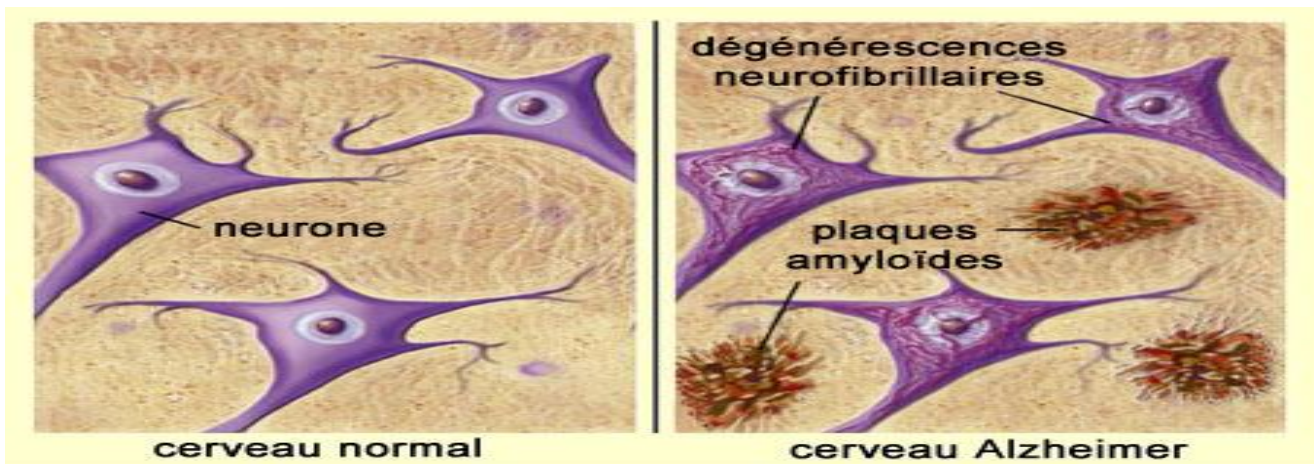
**-Les plaques séniles** : constituées de protéine bêta-amyloïde.

**Comment se forment les plaques séniles ?**

A la surface des neurones il existe une protéine appelée APP (protéine précurseur de l'amyloïde), dans les conditions normales, cette protéine est coupée à la surface des neurones et libère une protéine appelée bêta-amyloïde qui est dégradée dans l'organisme.

Dans le cas de la maladie la protéine n'est plus régulière, elle se trouve en très grande quantité, Elle s'agrège sous forme d'amas insoluble qu'on appelle **les plaques séniles**.

**-La dégénérescence neuro-fibrillaire** : constituée de la protéine TAU (tubule-associated unit. Elle fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules qui et surtout présentes dans les neurones).

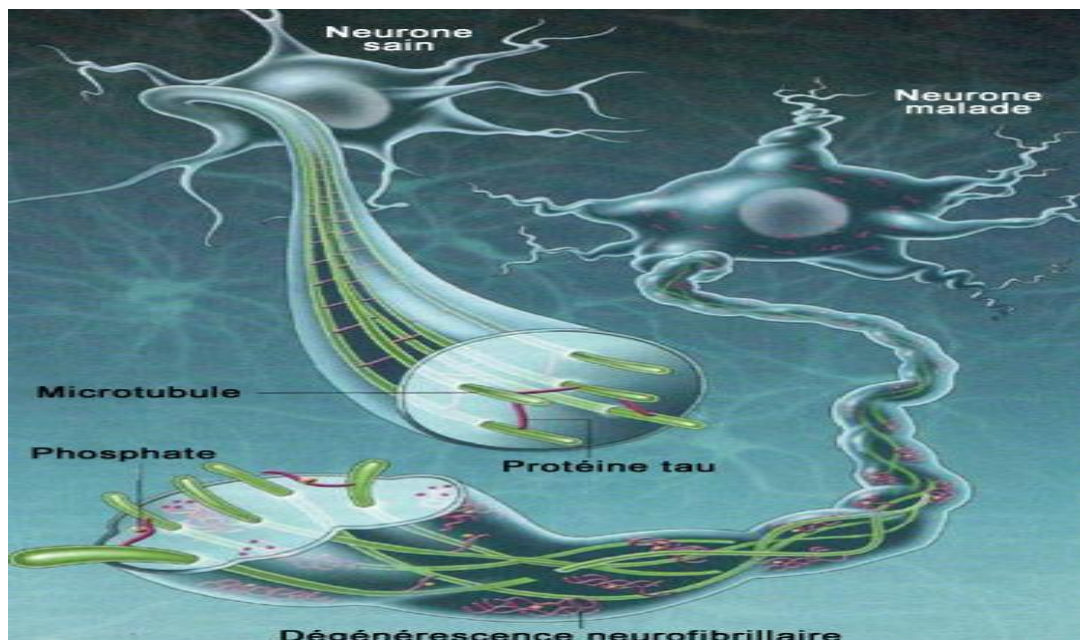


**Figure N°02** : Représentation des plaques amyloïdes et des dégénérescences neuro-fibrillaires

\*associé à ces lésions cérébrales un déficit consécutif du neurotransmetteur **Acetylcholine** (ACH). [4]

**Comment se forme la dégénérescence neuro-fibrillaire ?**





**Figure N° 03** : formation des dégénérescences neuro-fibrillaire

Lorsqu'un neurone communique avec un autre, un signal va du corps (SOMA) à la synapse qui contient l'**acétylcholine**. Pour transmettre l'information ce signal passe à travers le squelette du neurone qui est constitué de microtubules stabilisé par la protéine TAU normale. Dans le cas de la **MA** la protéine TAU devient anormale, elle est défectueuse et se détache du microtubule. De ce fait le squelette du neurone se dissocie car il n'est plus maintenu. De son côté la protéine TAU anormale s'agrège dans le neurone, elle forme des filaments constituant la **dégénérescence neuro-fibrillaire**, sans squelette les neurones dégèrent avec perte de connections. [5]

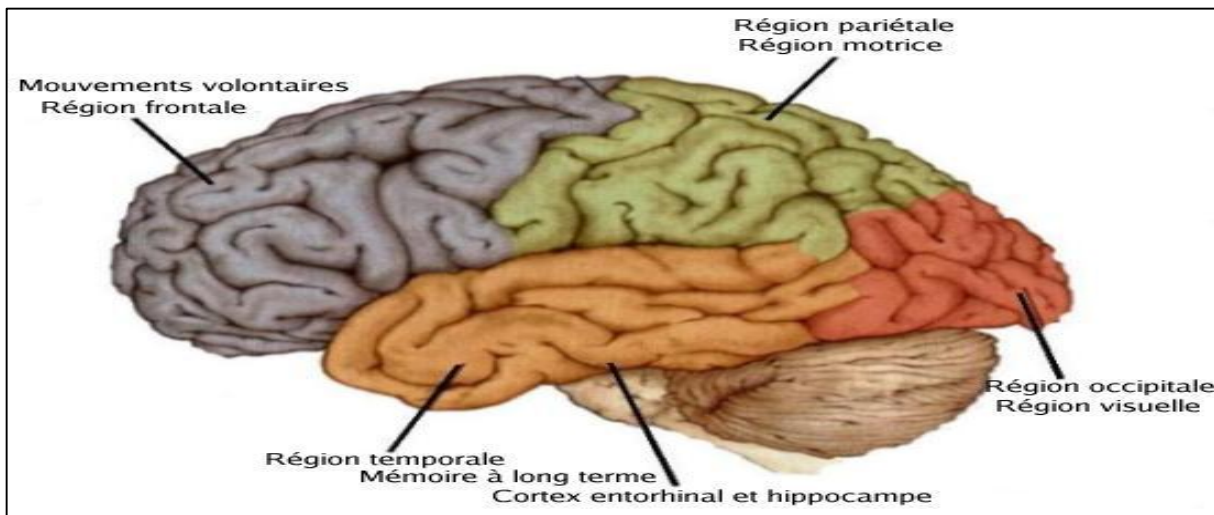
### 2.5. Progression de la maladie d'Alzheimer dans le cerveau :

La maladie commence par une accumulation des éléments anormaux (dégénérescence neuro-fibrillaire et les plaque séniles) dans le cerveau et détruit les cellules cérébrales avec perte des neurones cholinergique, et un déficit conséquent du neurotransmetteur Acetylcholine (ACH).

Tout commence au niveau de l'**hippocampe**. Les plaques et les dégénérescences détruisent l'hippocampe peu à peu et il devient de plus en plus difficile de fabriquer de nouveaux souvenirs

Après l'hippocampe, la maladie s'attaque à la zone cérébrale qui est responsable du langage, trouver le bon mot devient de plus en plus difficile. Ensuite la maladie progresse vers l'avant du cerveau Où se trouve la partie responsable de la logique : **Le lobe frontal** Progressivement le patient perd la faculté de résoudre des problèmes ou de comprendre des concepts. Les plaques et les enchevêtrements s'attaquent à la partie du cerveau qui se charge de la régulation des sentiments ; Lorsque cela arrive, le sujet perd tous ses sentiments, et ses émotions, puis la maladie touche les zones du cerveau responsables des perceptions visuelle, auditive et olfactive. La personne commence à faire des hallucinations.

Finalement les plaques et les enchevêtrements envahissent l'arrière du cerveau et détruisent les souvenirs les plus anciens les plus précieux, la fin devient très proche. L'évolution de la maladie est lente et irréversible. [6]



**Figure N°04** : principales régions du cerveau touchées par la maladie d'Alzheimer.

### 3. Les facteurs de risque de la maladie :

La cause de nombreuses maladies chroniques est souvent inconnue ou incertaine. Pour trouver une réponse, les scientifiques étudient les facteurs qui semblent liés au développement de la maladie. C'est ce qu'on appelle les « facteurs de risque », ce sont des caractéristiques propres à une personne, son mode de vie, son environnement. Leur présence signale un risque plus élevé de développer la maladie, sans toutefois constituer une certitude. [7]

#### 3.1. L'âge :

L'âge est le facteur de risque le plus important. 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. Le cerveau doit atteindre un certain âge critique pour que la maladie survienne. Plus on vieillit, plus le risque est élevé.

#### 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.

#### 3.3. Les facteurs génétiques (Le gène ApoE4) :

Ce gène est le facteur de risque le plus important de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer. Les gènes ApoE régulent la production d'une protéine qui aide au transport du cholestérol et des autres gras dans le sang vers les cellules du corps. Des trois variantes du gène apoE (apoE2, apoE3 et apoE4), la variante apoE4 est associée à un risque accru de maladie d'Alzheimer.

#### 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.

#### 3.5. Le syndrome de Down :

La plupart des adultes âgés de plus de 40 ans atteints du syndrome de Down éprouveront une détérioration des cellules nerveuses, symptômes semblables à ceux de la maladie d'Alzheimer.



### **3.6. Autres facteurs de risque :**

**Les femmes :** 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.

**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.

**Et aussi :** 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 l'intoxication à certains métaux lourds exemple : (L'aluminium). [8]

## Chapitre 02 : La butyrylcholinestérase et les inhibiteurs

Le terme cholinestérase a été proposé en 1932 pour décrire une enzyme capable d'hydrolyser rapidement l'acétylcholine et d'autres esters de la choline, Quelques années plus tard, on découvrit qu'il existait en fait deux enzymes hydrolysant les esters de la choline dans les tissus humains :

\*La première enzyme contenue dans les érythrocytes, les tissus nerveux et la jonction neuromusculaire, a été nommé acétylcholinestérase ou cholinestérase (AChE) vraie car il est intracellulaire identifiée dans le plasma et dans les synapses.

\*La seconde, cholinestérase non spécifique ou butyrylcholinestérase, extracellulaire a été identifiée dans le foie. [9]

### 1. La Butyrylcholinestérase (BuChE) :

La Butyrylcholinestérase également connu sous le nom pseudo- cholinestérase ou plasma cholinestérase est une enzyme cholinestérase non spécifique qui hydrolyse de différents esters de choline.

L'étude de la BuChE n'a réellement débuté que dans les années 1950 lorsque la succinylcholine (suxaméthonium) qui est un dimère de l'acétylcholine a été utilisée pour ses propriétés myorelaxantes. Découverte en 1949, et dès 1957, Kalow et Staron montraient qu'un variant génétique rare expliquait l'apnée prolongée observée chez certains patients après administration d'une dose usuelle de succinylcholine. [10]

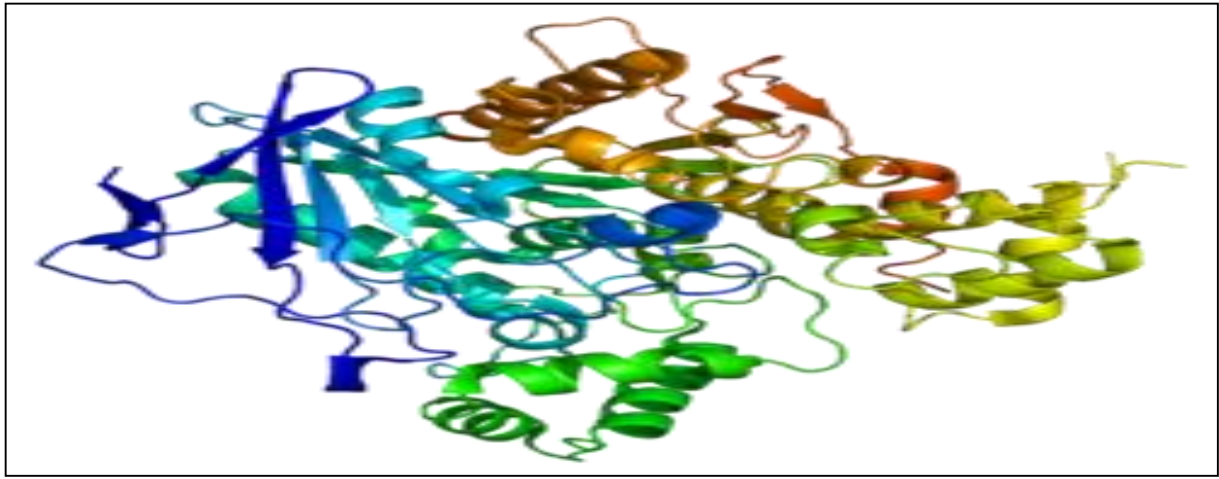
#### **1.1. Structure des enzymes :**

Synthétisée par les hépatocytes, l'enzyme est présente dans la plupart des tissus, à l'exception des érythrocytes. La mesure de son activité a été proposée comme marqueur sensible, mais peu spécifique de l'activité de synthèse hépatique. Sa demi-vie est située entre 8 et 12 jours [11].

Sa forme principale est un tétramère de 574 acides aminés avec neuf chaînes glucidiques liées par des asparagines. Chaque sous-unité contient trois ponts disulfures intra-caténaires, Les quatre sous-unités sont liées entre elles par des liaisons fortes non covalentes et par deux ponts disulfures entre les cystéines en position 571 près de l'extrémité carboxy terminale, Une forme C5 de migration électrophorétique plus lente, présente chez 10 % des caucasiens, possède une activité supérieure de 30 % à la forme normale. [12]

La compréhension de l'activité cholinestérasique était fondée initialement sur la notion de deux sites actifs, l'un anionique responsable de la fixation de groupement ammonium quaternaire et l'autre estérasique responsable de l'hydrolyse elle-même. . [13\_14]

Cette notion a été progressivement abandonnée au profit d'une organisation tridimensionnelle, faisant appel à un site estérasique et à une structure hydrophobe. Cette dernière facilite la pénétration des substrats au fond d'une gorge étroite où est situé le site estérasique. [15\_16]



**FigureN°05 :** structure tridimensionnelle de la BuChE

### 1.2. Rôle physiologique :

Le rôle physiologique de la BuChE demeure hypothétique, Capable d'hydrolyser l'acétylcholine, elle pourrait participer à l'hydrolyse du neurotransmetteur pendant la différenciation cellulaire au tours du développement embryonnaire, a la transmission nerveuse lente ou encore à la régulation de la concentration plasmatique de la choline, l'enzyme BuChE est important dans la régulation du système cholinergique. [17]

Le sujet déficitaire en BuChE ne présente pas d'anomalie métabolique ou d'effet adverse, tant qu'il ne reçoit ni mivacurium ni succinylcholine. [18]

### 1.3. L'enzyme et la MA :

De nombreuses circonstances pathologiques peuvent modifier l'activité de la BuChE. Cette activité est diminuée dans les pathologies neuro-dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, et elle peut être augmentée dans certaines pathologies neuropsychiatriques telles que la dépression, l'autisme et la schizophrénie. [19]

L'apparition des troubles associés à cette maladie est liée à la baisse des taux d'acétylcholine (un neurotransmetteur, c'est-à-dire une substance chimique libérée par les cellules nerveuses et permettant la transmission du message nerveux entre deux neurones ou entre un nerf et un muscle ou un organe) dans le cerveau, c'est l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine qui est la butyrylcholinestérase, présente à des concentrations anormalement élevées (jusqu'à 90 %), et un niveaux d'acétylcholinestérase en baisse dans le cerveau des personnes souffrant de la maladie d'Alzheimer. [20]

Bien que la fonction physiologique de l'enzyme reste incertaine, son rôle est de Co-régulé neurotransmission cholinergique car il peut efficacement hydrolyser le neurotransmetteur acétylcholine et provoque la production de la protéine  $\beta$ -amyloïde et aider à sa diffusion dans le cerveau.

## 2. Les inhibiteurs de la butyrylcholinestérase :

Les inhibiteurs de la butyrylcholinestérase sont largement utilisés dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer. [21] Ils sont prometteurs comme nouvelle stratégie ou dans le cerveau la butyrylcholinestérase est élevée et l'inhibent fortement.

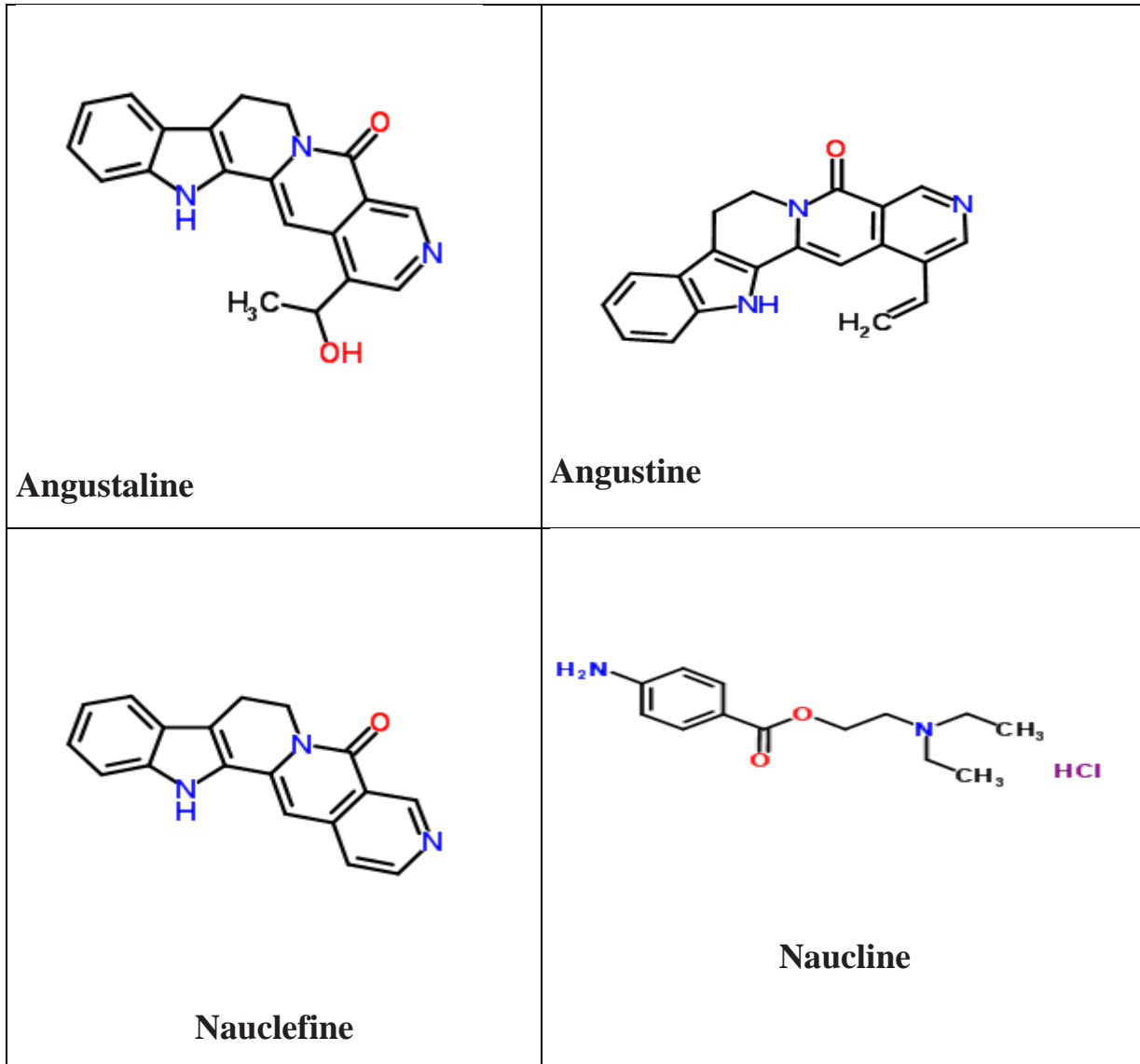
De nombreuses molécules sont susceptibles d'inhiber l'activité BuChE. Les organophosphorés (pesticides, insecticides, collyre myotique à base d'écothiopate) sont de puissants inhibiteur ainsi que les anticholinésterasiques (néostigmine, pyridostigmine) qui vont inhiber l'enzyme.

## 2.1. Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes naturels, extraits des solanacées (en particulier de la pomme de terre) sont des bon inhibiteurs de la BuChE. [22]

Neuf alcaloïdes ont prouvé leur efficacité d'inhiber la BuChE :

Nauclefine, Angustidine, Nauclefine, Angustine, Naucline, Angustaline, Harmane, 3,14-Dihydroangustoline, Strictosamide.

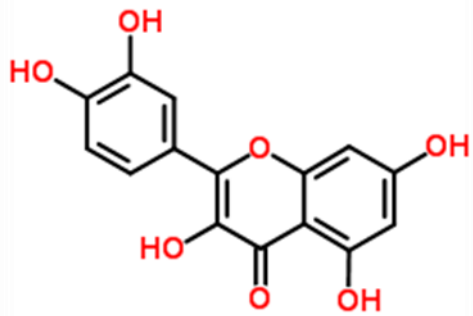


**Figure N°06** : structure des alcaloïdes qui ont prouvé leur efficacité d'inhiber la BuChE

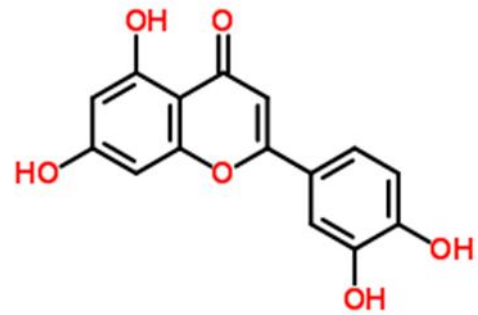
## 2.2. Les flavonoïdes :

De nombreuses recherches ont été basées sur les flavonoïdes qui sont des composés polyphénoliques biologiquement actifs qu'on retrouve dans de nombreuses plantes. Tous les flavonoïdes testés: galangine, la quercétine, la lutéoline sont des inhibiteurs réversibles très puissants de la BuChE et L'inhibiteur le plus puissant de tous les trois et la galangine [23]

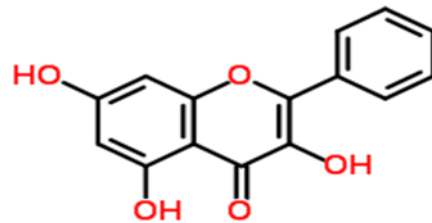
**FigureN°07** : structure des flavonoïdes qui ont prouvé leur efficacité d'inhiber la BuChE



quercétine

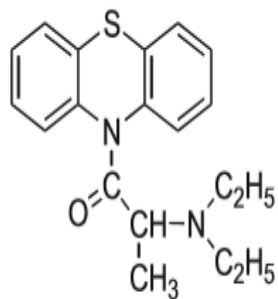


lutéoline

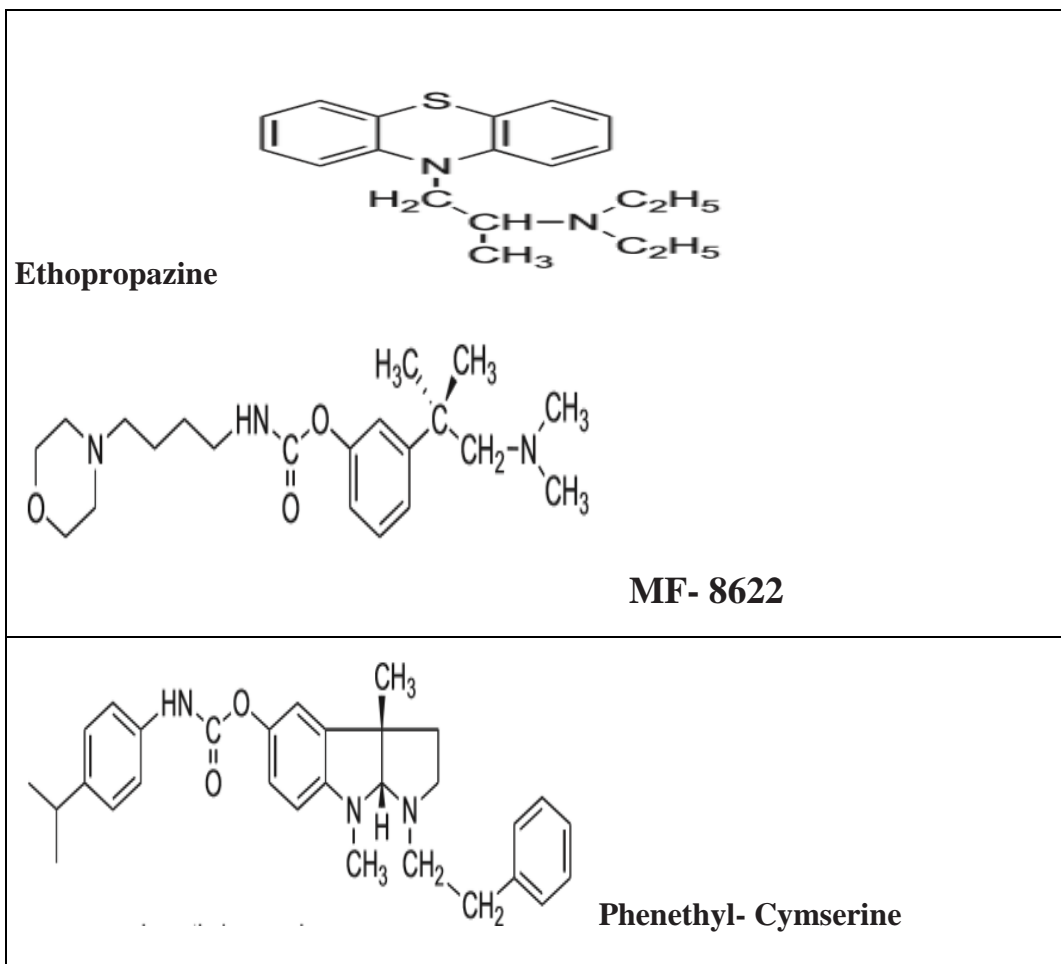


galangine,

De nombreuses molécules sont susceptibles d'inhiber l'activité de la BuChE et la AChE et ont prouvé leur efficacité ce sont des inhibiteurs mixte.



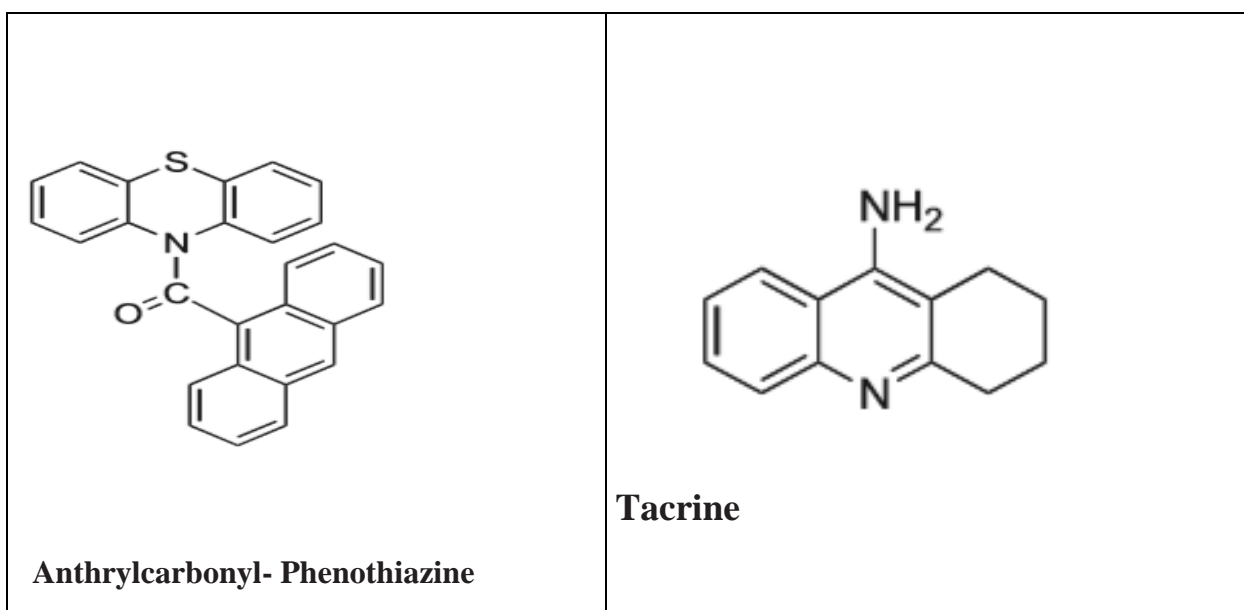
Astra 1397

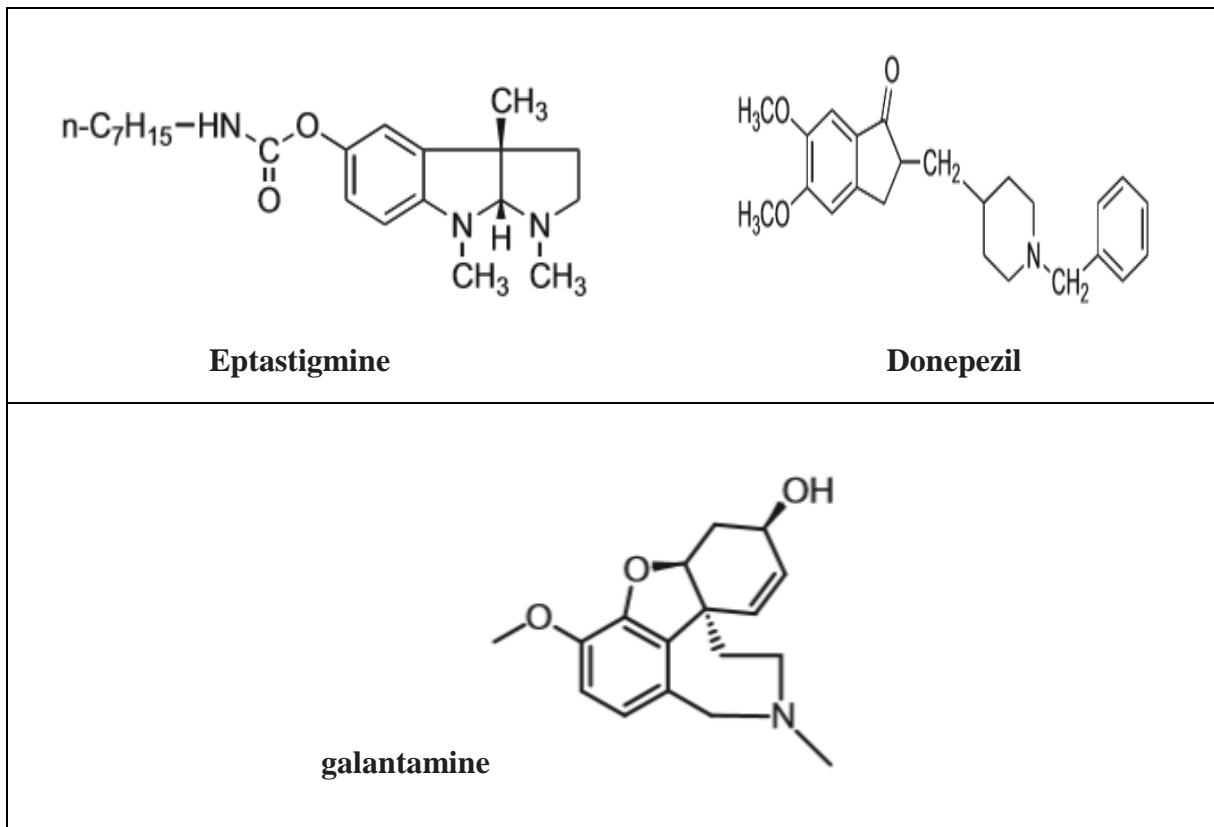


**FigureN°08** : structure des inhibiteurs mixte

### 2.3. Inhibiteurs de BuChE puissant et très sélectif :

La tacrine est la première approuvée est comme inhibiteur efficace à récemment été retirée en raison de l'incidence élevée d'hépatotoxicité, alors que les essais cliniques avec eptastigmine ont été suspendus en raison d'effets indésirables hématologiques. [24]



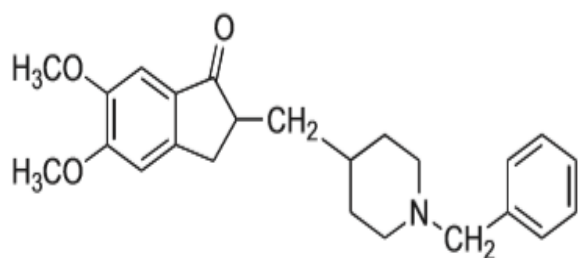


**FigureN°09:** Les plus puissant des inhibiteurs de la BuChE

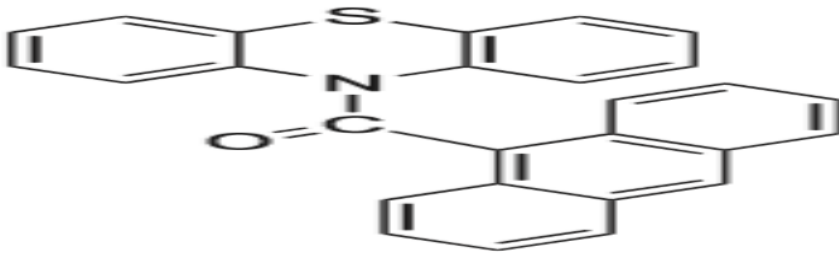
### 3. Les principaux inhibiteurs qu'on va tester :

En prenant compte de leur forte puissance inhibitrice envers l'enzyme et la disponibilité des valeurs de leur IC<sub>50</sub> on va tester 48 inhibiteurs de la BuChE.

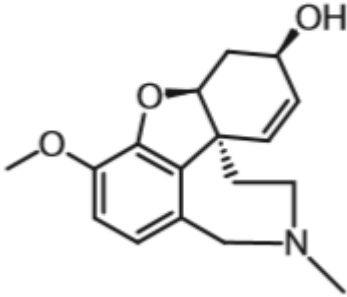
#### 3.1. donepezil :



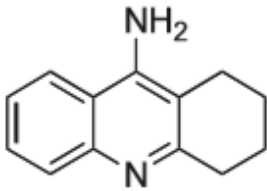
#### 3.2. Anthrylcarbonyl-Phenothiazine



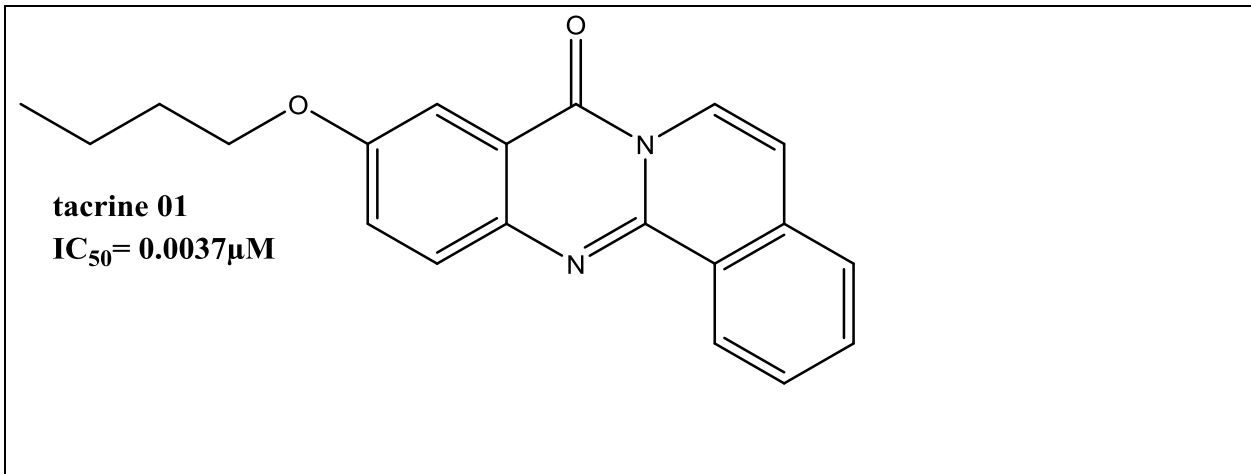
**3.3. Galantamine :**



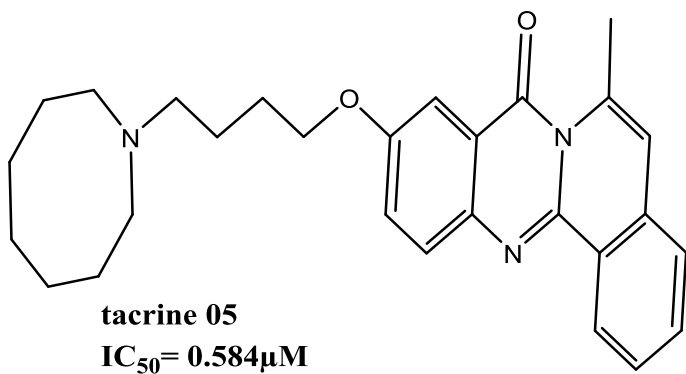
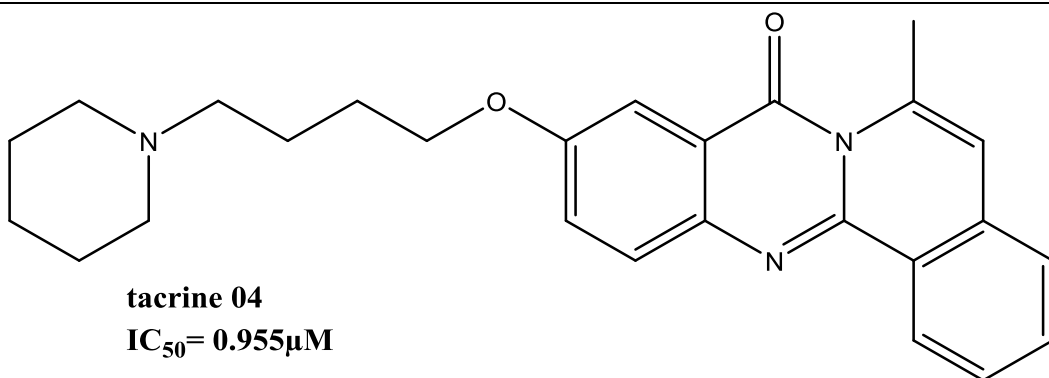
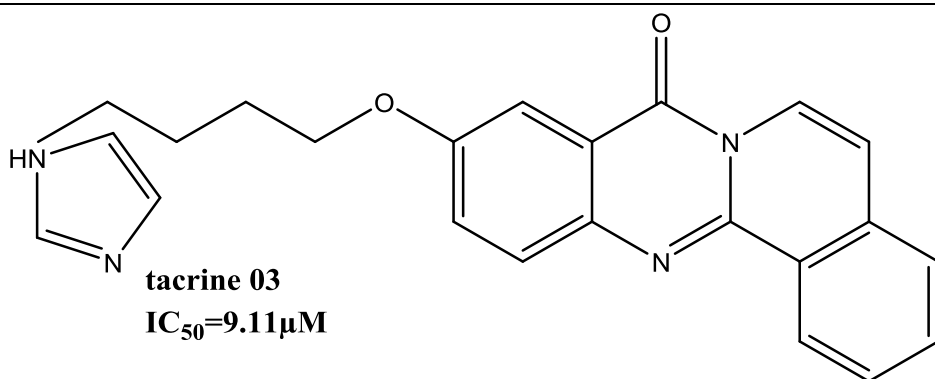
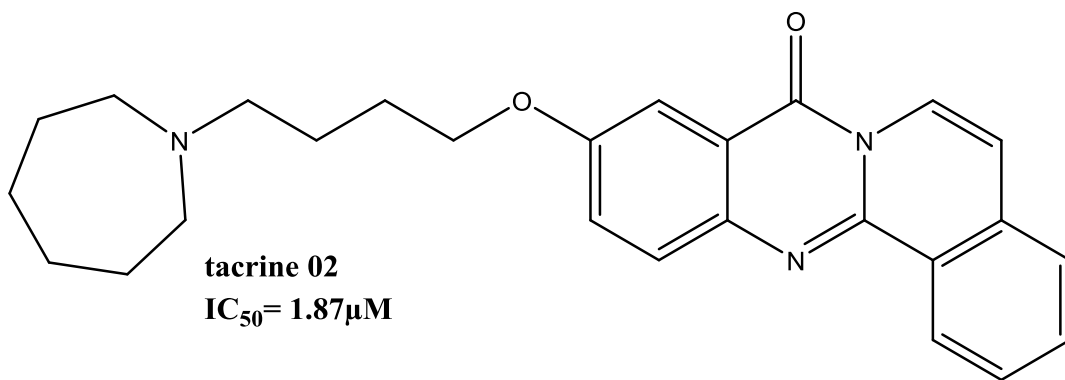
**3.4. Tacrine :**

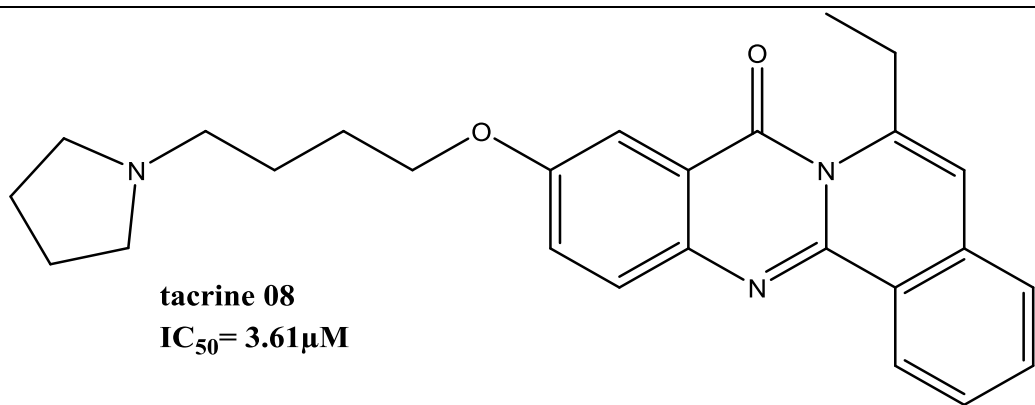
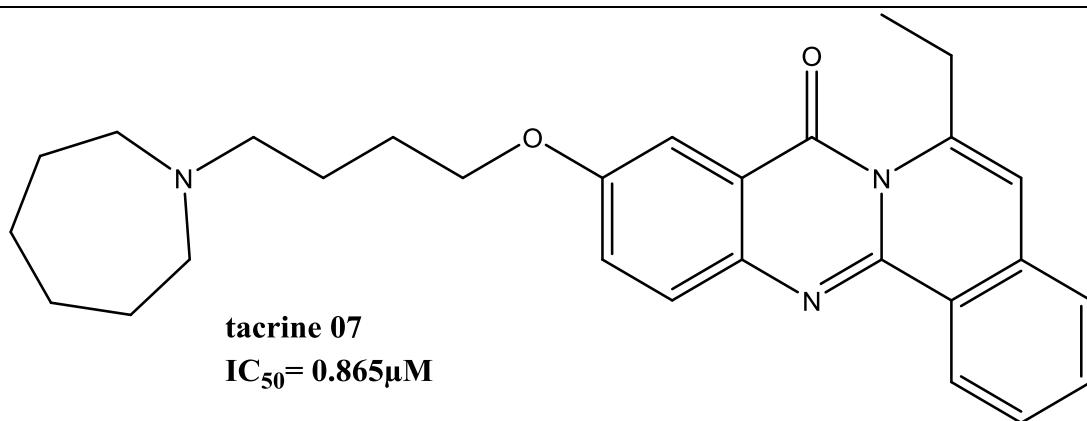
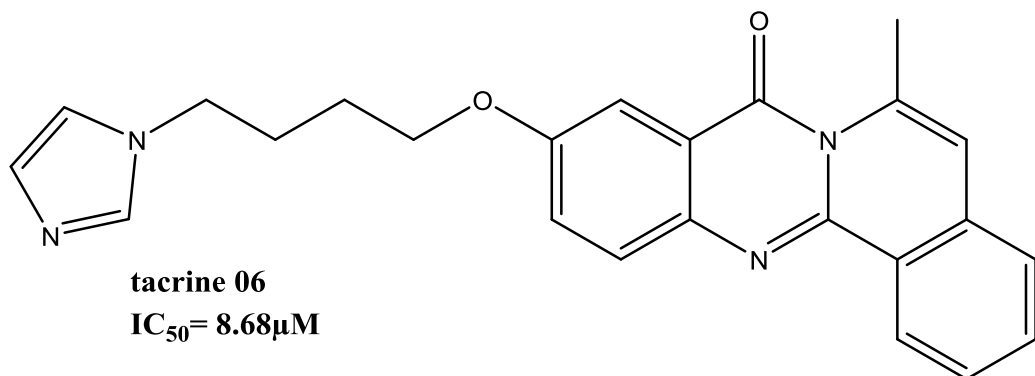


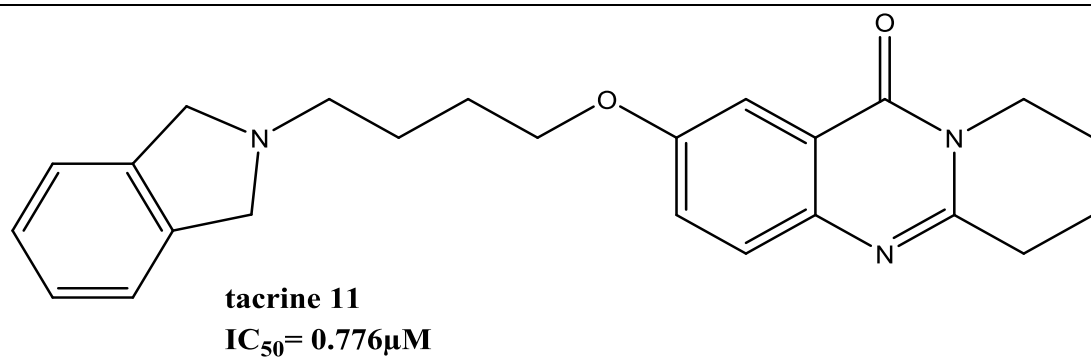
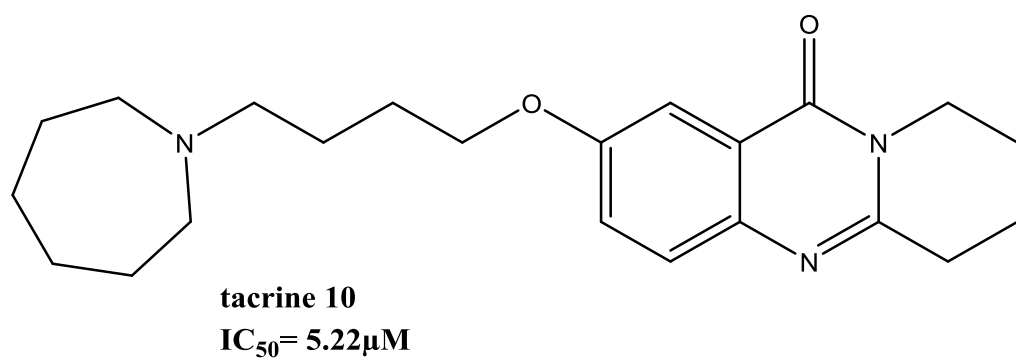
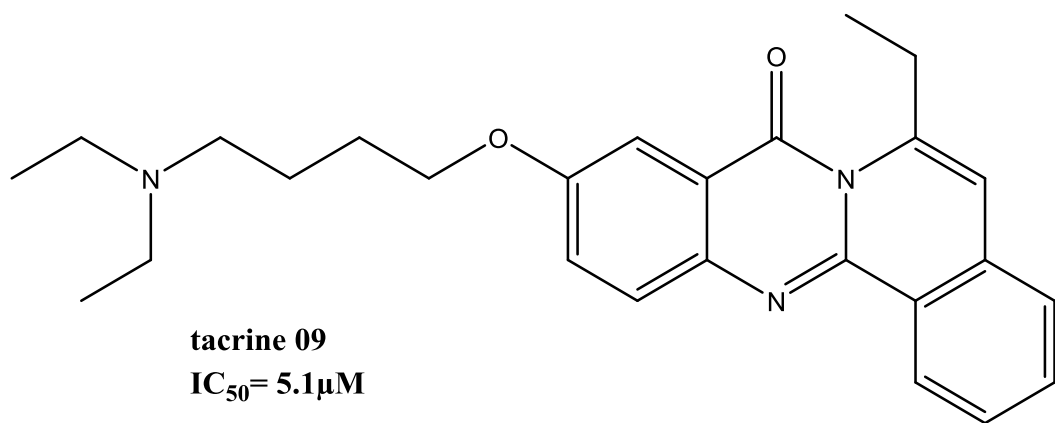
Avec 18 autres structures de tacrine avec des radicaux différents :

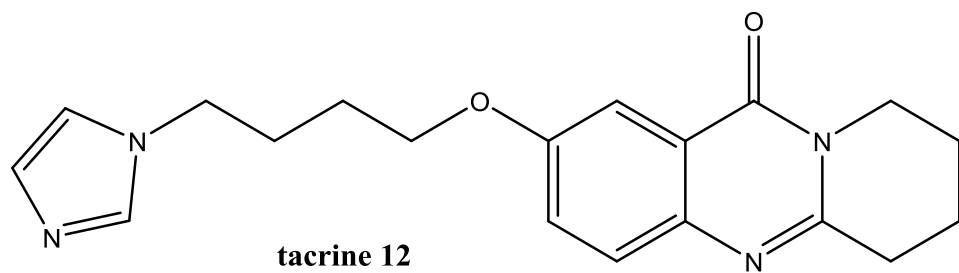




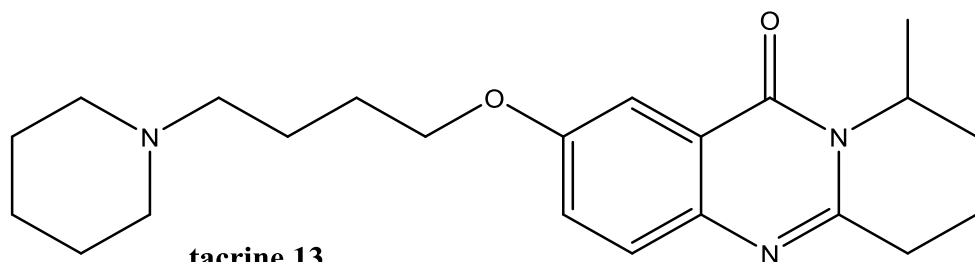




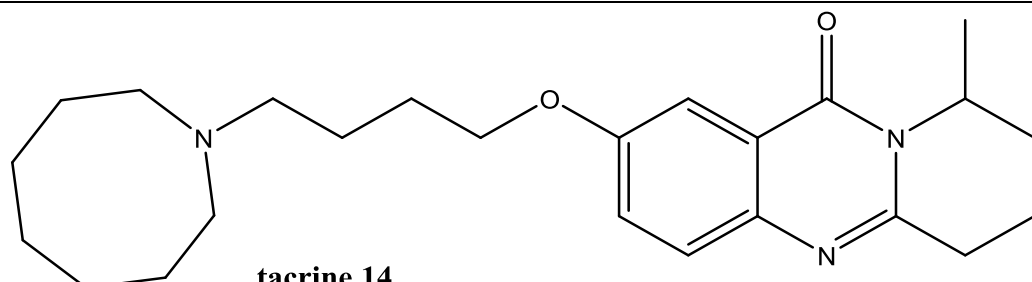




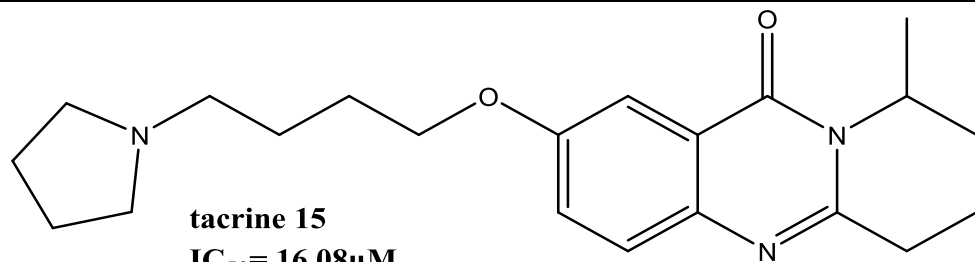
**tacrine 12**  
**IC<sub>50</sub> = 14.65 μM**



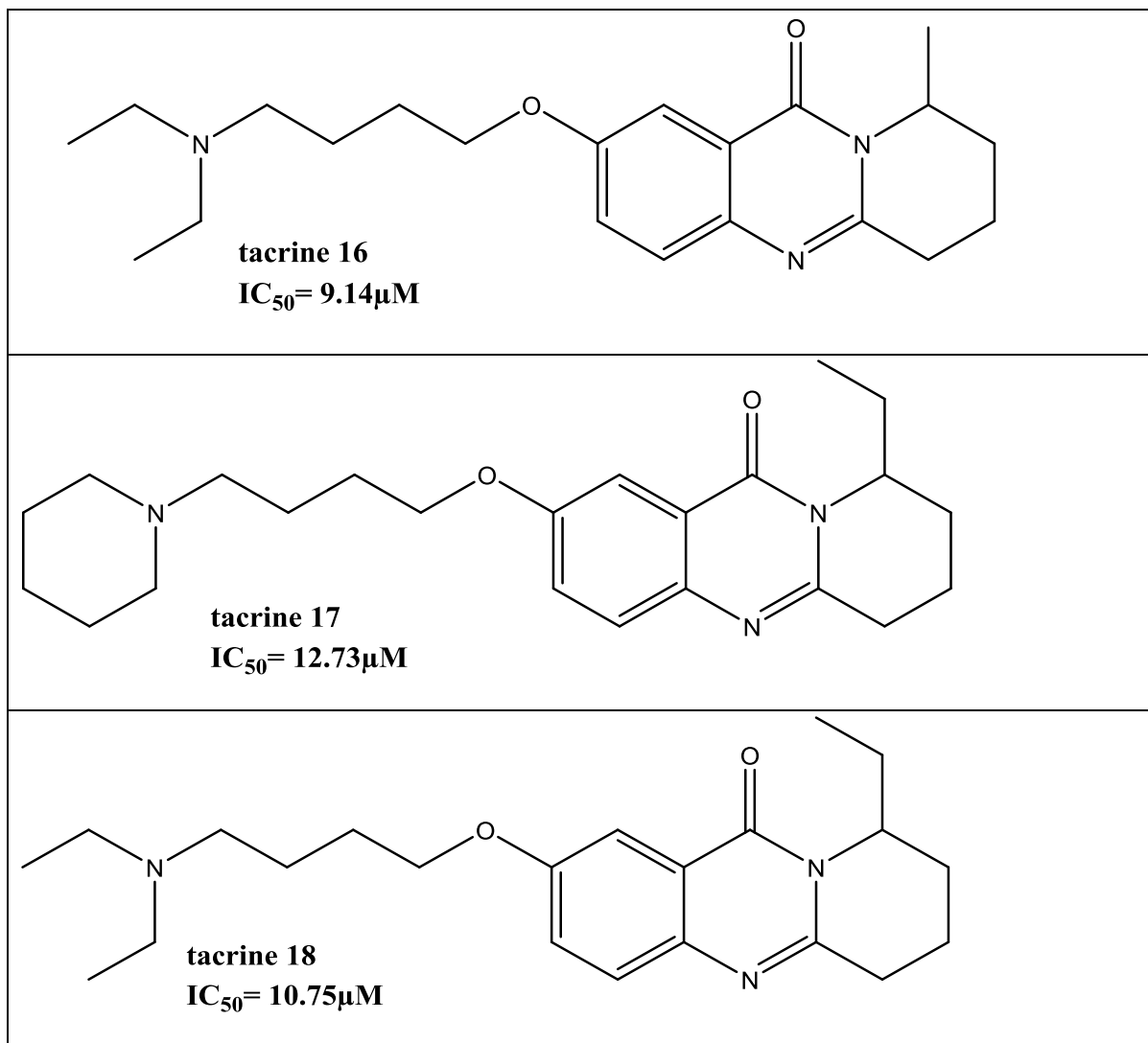
**tacrine 13**  
**IC<sub>50</sub> = 6.55 μM**



**tacrine 14**  
**IC<sub>50</sub> = 1.77 μM**



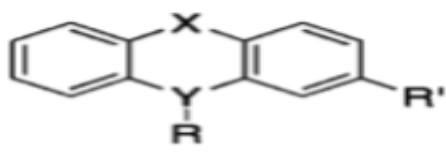
**tacrine 15**  
**IC<sub>50</sub> = 16.08 μM**



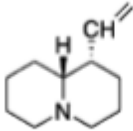
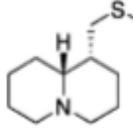
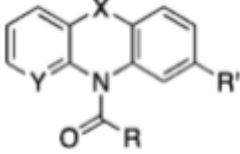
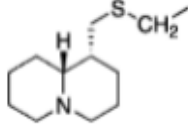
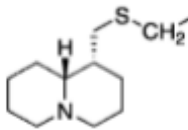
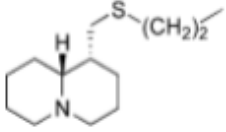
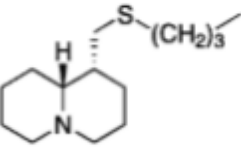
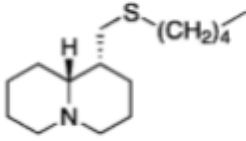
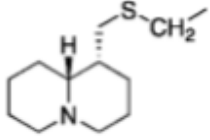
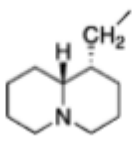
**FigureN°10 :** structures de 18 molécules de tacrine avec des radicaux différents

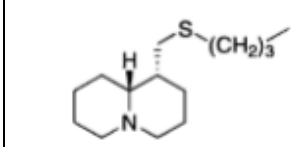
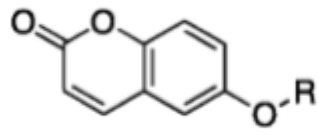
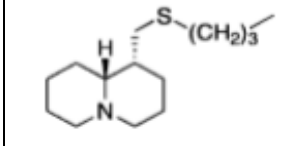
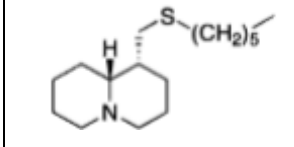
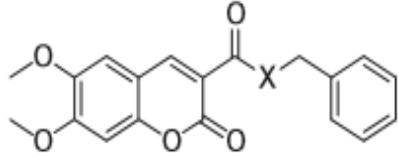
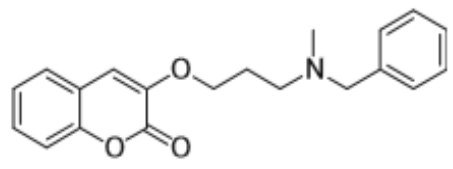
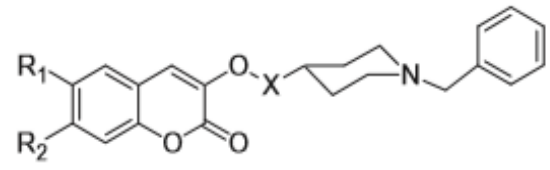
### 3.5. Les 25 autres inhibiteurs :

**TableauN°01 :** structure de 26 inhibiteurs différents avec différent radicaux

				
X	Y	R	R'	$IC_{50}$
01		$-(CH_2)_3-N(Et)_2$	$CF_3$	7.4
S	N			

02	S	N		H	<b>0.51</b>
03	Se	N		H	<b>1.1</b>
04	Se	N		H	<b>0.87</b>
05	S	CH		H	<b>0.41</b>
06	S	C-OH		H	<b>0.95</b>
07	S	C		H	<b>0.93</b>
08		CH			<b>0.63</b>
09		CH			<b>1.1</b>
10		N			<b>8.1</b>

11	C			3.8	
12	CH			3.3	
					
13	S	CH		H	0.43
14	S	CH		OCH <sub>3</sub>	1.2
15	S	CH		H	0.75
16	S	CH		H	0.74
17	S	CH		H	0.89
18	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH		H	0.86
19	NH				0.87

20	NH			<b>0.69</b>
				
21				<b>5.4</b>
22				<b>5.8</b>
				
23	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )			<b>15±1</b>
24	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(CH <sub>3</sub> )			<b>24±2</b>
24				
				<b>4.0±0.5</b>
25				
<b>Donepezil</b>				



26		OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	<b>3.9±0.8</b>
CH <sub>2</sub>				

C'est inhibiteurs ont prouvé un grand effet d'inhiber l'enzyme de la BuChE.

Notre travail est basé sur l'étude *in silico* par Docking moléculaire sur l'inhibiteur Anthrylcarbonyl-phenothiazine.

## Chapitre 03 : Le Docking moléculaire

### Introduction :

La biologie computationnelle ou bio-informatique concerne les travaux à l'interface entre l'informatique et les sciences de la vie et s'intéresse particulièrement au rapport entre la structure, la dynamique des macromolécules et leur fonction biologique. Ce domaine recouvre des questions relevant d'une part de la biologie et de la clinique

- étude de fonctionnement
- dysfonctionnement d'une protéine et d'autre part de la pharmacologie (conception de médicaments).

Dans ces deux cas, on s'intéresse à l'interaction entre des macromolécules ou entre une macromolécule et un ligand (petite molécule chimique). [25]

Le docking moléculaire consiste à déterminer la position relative de deux molécules (un ligand et un récepteur). La structure obtenue confère les propriétés à l'ensemble (le complexe) ainsi formé. Par exemple, la recherche de bonne structure est cruciale dans la conception de nouveau médicament.

D'un point de vue informatique, la prédiction de structure se traduit par un problème d'optimisation. A chaque position relative possible est associé une énergie (également appelé score, fitness, etc...). La structure la plus probable est alors celle qui minimise cette énergie. [26]

Dans la mise au point de nouveaux médicaments, l'amarrage (Docking) sert souvent à déterminer l'orientation de petites molécules liées à leurs protéines ciblées afin de calculer leurs affinité et niveau d'activité. Ainsi, l'amarrage joue un rôle important dans la conception pensée de nouveaux médicaments. En raison de sa valeur biologique et pharmaceutique, on s'est efforcé d'améliorer les méthodes qui calculent l'amarrage moléculaire.<sup>1</sup>

Donc le Docking est une méthode qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable [27]. Savoir l'orientation préférée sert à prévoir la solidité de l'union entre deux molécules. Les associations entre des molécules d'importance biologique, telles que les protéines, les acides nucléiques, les glucides et matières grasses jouent un rôle essentiel dans la transduction de signal. D'ailleurs, l'orientation relative des deux molécules associées peuvent avoir un effet sur le genre du signal produit (ex. antagoniste contre l'agoniste). Par conséquent, des études d'amarrage sont utiles à calculer la force et le genre du signal produit.

Le docking moléculaire a été appliqué avec succès sur un certain nombre de cibles thérapeutiques (protéine) dont la structure 3D en complexe avec le ligand a été parallèlement déterminée. Actuellement, cette démarche a fait la preuve d'une grande réussite en mettant sur le marché un très bon nombre de médicaments, citons à titre d'exemple :

- Des inhibiteurs de l'aldose réductase : par recherche dans des bases de données de composés.
- Un inhibiteur d'un élément de réponse de la trans-activation de la HIV-1 RNA : par docking rigide et recherche dans des bases de données de composés.
- Un inhibiteur de la thrombine et celui de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase : par docking sur des chimio thèques combinatoires [27].

- Cette approche a permis d'identifier des substances inhibitrices micro-molaires de la butyrylcholinestérase, une cible thérapeutique intéressante dans la maladie d'Alzheimer.
- L'identification d'inhibiteurs de la DNA gyrase. Le meilleur d'entre eux est dix fois plus puissant que l'inhibiteur de référence, la novobiocine [28].

Durant notre recherche on a appliqué le docking dans les interactions et la reliure de site actif de BuChE et la relation d'activité de l'inhibiteur pour exécuter avec les meilleurs composés utilisant l'AutoDock Tools, le pyrex et MSViewer.

## **1. Les outils du Docking moléculaire :**

### **1.1. Les Récepteurs :**

On utilise les structures 3D des protéines qui sont accessibles gratuitement dans la banque de donnée PDB (Protéine Data Bank) qui s'agit d'une grande archive de donnée structurale de macromolécules biologiques : protéines et acides nucléiques (ADN, ARN). Elle contient plus de 72300 structures 3D, dont 67000 ont été résolues pour la grande majorité par cristallographie aux rayons X [29 et 30].

Les différentes conformations tridimensionnelles sont téléchargeables sous extension *pdb*. Il s'agit de fichiers lisibles par les logiciels de docking, contenant diverses informations sur la protéine en question. Par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolue la structure, la méthode expérimentale, ...etc. On y retrouve aussi des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée.

Dans certains cas, il se peut que la structure 3D de la cible souhaitée ne soit pas encore disponible dans la PDB. On doit faire appel dans ce cas à la modélisation par homologie pour construire cette structure à partir d'une protéine avec des séquences similaires [31].

### **1.2. Le(s) ligand(s) :**

Le choix du ligand est une étape très importante dans le Docking moléculaire, il doit être sous forme 3D. Pour y obtenir, il existe deux moyens : la première souvent d'aspect commercial ; est constituée de bases de données de structures chimiques appelés : chimiothèques

Le second moyen consiste à utiliser ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (*pdb*, *mol*, *mol2*....etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que ChemDraw, Arguslab, Titan ou Sybyl... [32]. Un ligand peut être :

- ↻ Un substrat
- ↻ Coenzyme
- ↻ Activateur
- ↻ Inhibiteur

## **2. Le programme de Docking moléculaire :**

Le Docking moléculaire est l'ensemble de méthodes algorithmiques et géométriques permettant la prédiction *in silico* de la conformation (position et orientation relative) la plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur. A présent, un bon nombre de programmes du docking moléculaire (commerciaux ou non) est disponible. Les plus fréquemment cités sont respectivement AutoDock (27%), Gold (15%), FlexX (11%), Dock (6%) ou encore IcmDocking (6%) [33]

Bien que ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques, leur protocole est composé de deux étapes essentielles :

**La 1<sup>ère</sup> étape :** dite de docking proprement dit est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représente les modes d'interactions les plus favorables [34].

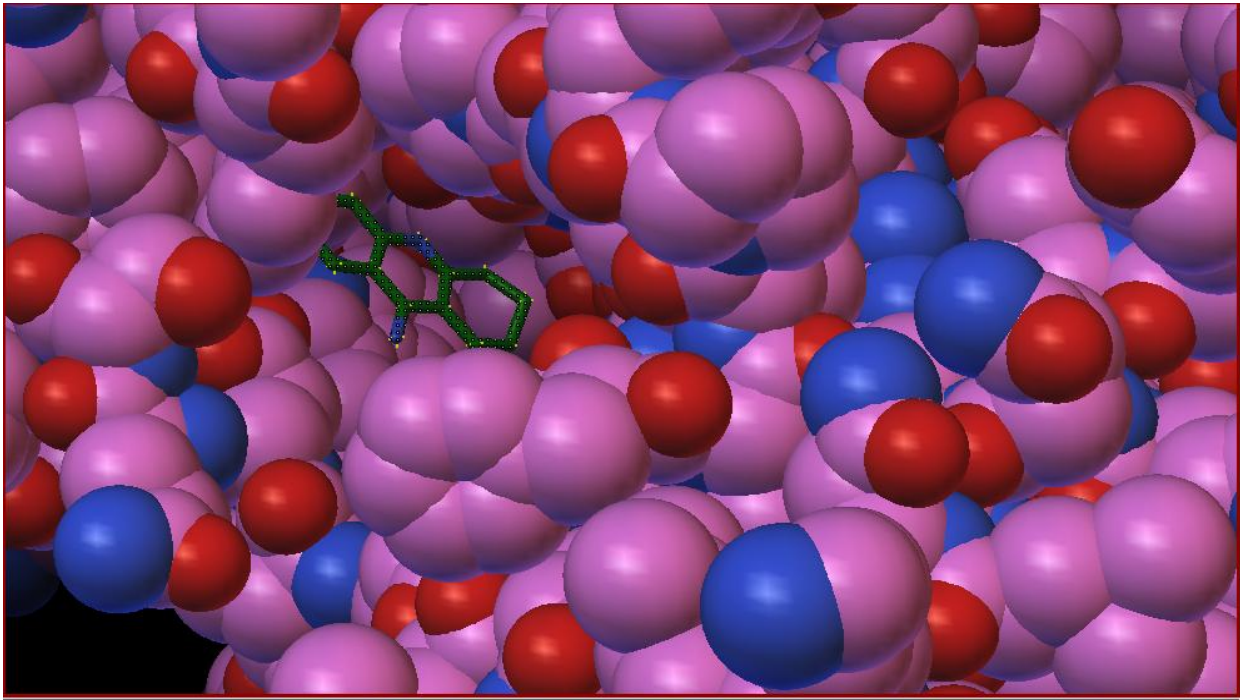
**La 2<sup>ème</sup> étape :** le scoring est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées [35].

L'utilisation des programmes de docking a conduit à de nombreux succès dans le domaine de la découverte de nouvelles molécules bioactives; néanmoins, leurs algorithmes sont toujours en maturation. Actuellement, il existe une panoplie d'algorithmes de docking qu'on peut répartir en deux grandes catégories selon la méthode utilisée :

- ✓ **Simulation par fragmentation incrémentale (*matching*)**
- ✓ **Simulation par trajectoire (Algorithme génétique)**

Depuis ces premiers pas, une idée s'est peu à peu imposée: les molécules ne sont pas figées, mais peuvent subir des modifications conformationnelles lors d'une interaction. Les procédures ont donc évolué vers une introduction de la flexibilité. Tout d'abord la flexibilité a été introduite en autorisant quelques degrés de liberté au ligand par le docking semi-flexible (docking pseudo-flexible). L'utilisation de cette approche pour concevoir un nouveau médicament a permis d'obtenir des résultats plus précis : le récepteur est considéré comme corps rigide en tenant compte de la flexibilité du ligand. Ce type de docking reste plus employé aujourd'hui. Actuellement, la puissance de calcul des ordinateurs permet, pour certains logiciels de docking, de traiter la flexibilité du ligand et de façon partielle le récepteur, c'est le docking flexible.

Les différentes approches du docking se distinguent au niveau de leurs conditions d'application et de la nature des informations qu'elles peuvent fournir. La pertinence du choix d'un programme de docking donne réponse en premier lieu sur l'adéquation entre ces caractéristiques et celles du système étudié. L'efficacité de l'algorithme choisi sera par ailleurs un compromis entre rapidité d'exécution et précision des résultats [36].



**Figure N°11** : exemple de la position d'un ligand par docking moléculaire.

## Chapitre 04 : matériels et méthodes

### 3. Matériels :

#### 1.1. Microordinateur :

Dans notre étude, nous avons utilisé deux micro-ordinateurs ayant une mémoire de 4.00 Go et un processeur i3\_4030 u CPU 1.90 GHZ, Sous le système d'exploitation Windows 8.1 bits version 2010.

#### 1.2. Programmes (logiciels) :

##### 1.2.1. Titan :

Permet de construire la structure tridimensionnelle 3D des ligands et de minimiser leurs énergies.

##### 1.2.2. PyRx0.8 :

PyRx est un ensemble de sous-programme dont AutoDock Vina qui sert au docking moléculaire et Open Babel pour la conversion des formats des fichiers. Il est utilisé pour cribler des bibliothèques de composés contre des cibles potentielles de médicaments en calculant leur énergie d'interaction grâce au sous-programme Vina. Il n'accepte que les molécules sous format pdbqt dont les résultats soient enregistrées sous le format *Sdf*.

##### 1.2.3. AutoDock Tools :

Le récepteur et les ligands utilisés dans ce travail étant en général sous le format PDB sont convertis au format pdbqt par le programme AutoDock Tools.

##### 1.2.4. OpenBabel-2.0.2 :

OpenBabel est un système expert principalement utilisé dans des applications de chimio-informatique pour la conversion de fichiers de structures chimiques (mol2, pdb, SMILES format 'SMI' etc...)

##### 1.2.5. ViewerLite4.2 :

C'est un logiciel qui permet de visualiser les interactions ligand-enzyme de type hydrophobe ainsi que les liaisons hydrogènes entre le ligand et les acides aminés du site actif de l'enzyme. Il calcule aussi la distance de ces liaisons en angström et donne le nom de chaque acide aminé.

#### 1.3. Ligands :

Nos ligands obtenus de la PDB ou de la littérature sont dessinés par le logiciel de construction moléculaire <Titan> en tenant compte de l'état d'hybridation de chaque atome. Après minimisation de leur énergie, ils sont enregistrés sous le format PDB.

#### 1.4. récepteur :

Il est possible de télécharger des fichiers sous format *PDB* contenant la conformation tridimensionnelle de l'enzyme via la banque de donnée *Protein Data Bank*. Dans notre cas, cette banque nous propose 41 conformations 3D de la BuChE parmi lesquelles nous avons choisi le code 4BDS, car il s'agit d'une structure correctement définie avec une résolution égale à 2.10 Å et d'un  $K_{i50}$  égale à 25nM.

le complexe 4BDS a été séparé de son ligand afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre. Le récepteur est ensuite préparé par Auto Dock Tools qui permet d'attribuer des charges de type « KOLLMAN »

et ajout des Hydrogènes dits polaires. Enfin, On intègre dans ce fichier les paramètres de solvation des atomes avant de l'enregistrer dans le format *pdbqt* requis par le programme Auto Dock Vina.

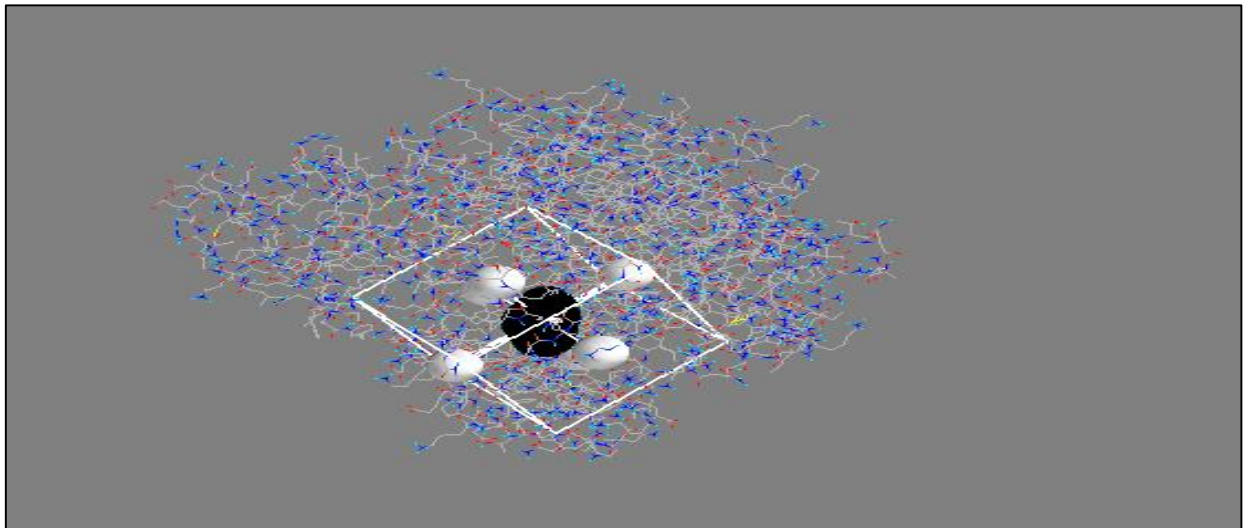
## 2. Méthodes :

Nous avons utilisé **PyRx** pour calculer l'énergie d'interaction ( $\Delta G$ ) de chaque ligand dont le résultat sera converti au format *SDF*.

Ensuite nous avons choisi les meilleurs inhibiteurs de l'enzyme BuChE sur lesquels nous avons réalisé plusieurs substitutions par ajout des différents radicaux (OH, NH, COOH et CHO...) en utilisant le programme Titan. Leurs énergies d'interaction ont été calculées par **PyRx**.

Pour calculer l'énergie d'interaction de chaque molécule nous avons pris le récepteur du complexe 4BDS qui a été placé dans une grille tridimensionnelle englobant le site actif de la protéine étudiée et permettant la rotation libre du ligand dans ce site. Cette boîte à un centre déterminé par les coordonnées suivantes :

X=133.2743 , Y= 115.9958 et Z= 40.8637 avec les dimensions X= 18.52, Y=16.90 et Z=18.46 Å (Angstrom). La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés.



**FigureN°12** : positionnement du ligand dans grille tridimensionnelle du site actif

## Chapitre 05 : résultats et discussions

Dans cette étude, nous avons exploré plusieurs outils de docking moléculaire pour leur application *in silico* dans le cadre de la découverte de nouveaux inhibiteurs de la butyrylcholinestérase (BuChE).

Nous avons testé d'abord la performance du programme du docking moléculaire PyRx puis dans un deuxième temps nous avons étudié les modes d'interactions des inhibiteurs de la BuChE et dernier lieu nous avons proposé de nouveaux inhibiteurs obtenus par différents substitutions.

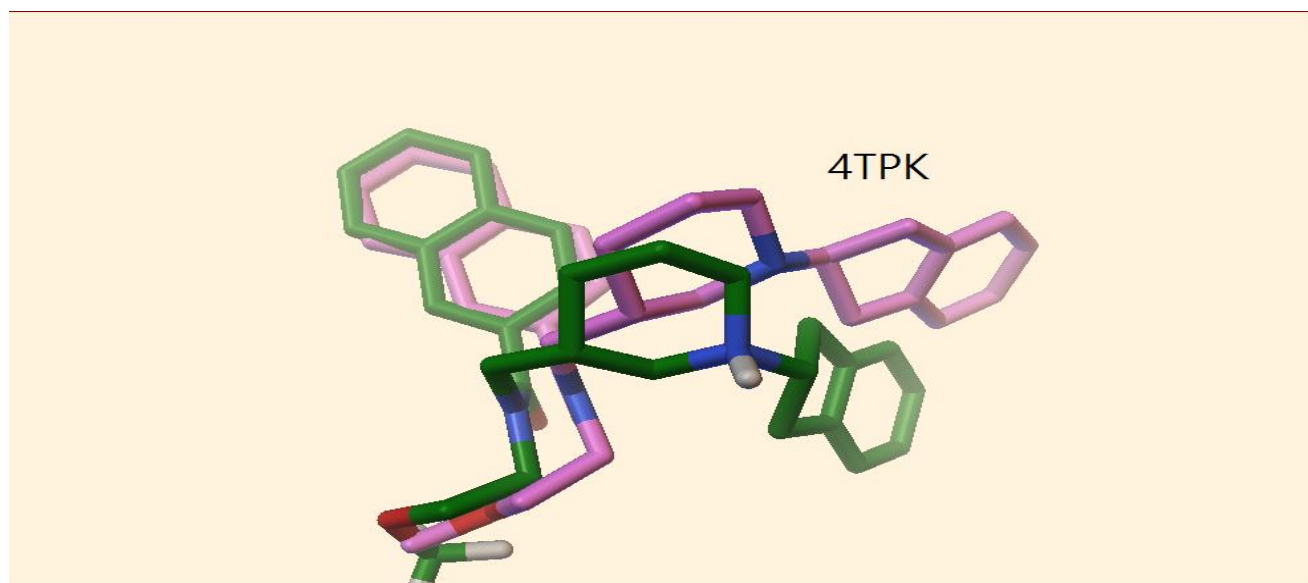
### 1. Fiabilité du programme de Docking :

La fiabilité du programme « PyRx » a été testé grâce à l'analyse visuelle et au coefficient de corrélation linéaire.

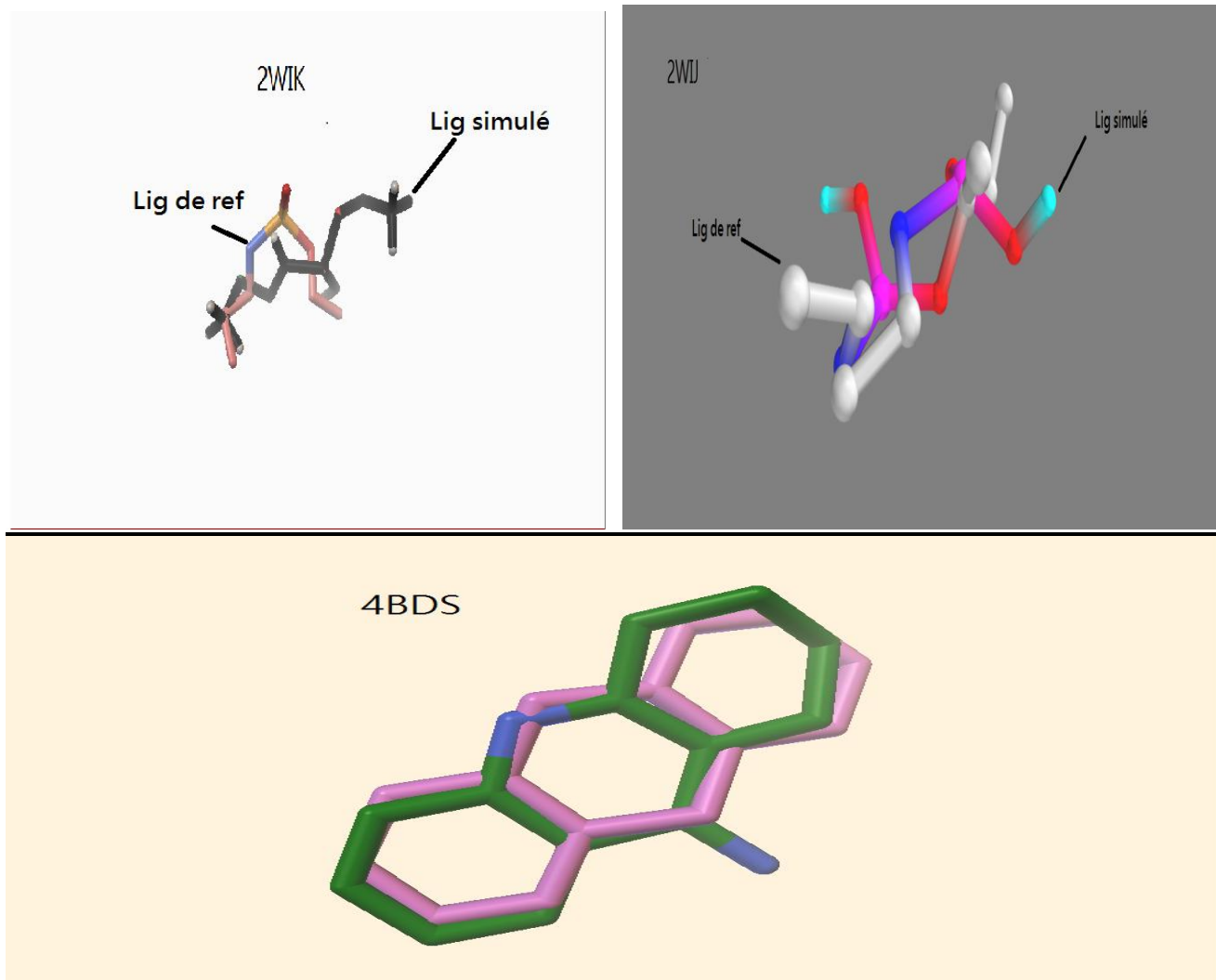
En général, la fiabilité d'un programme de docking moléculaire est analysée par le paramètre RMSD dont la valeur doit être égale ou inférieure à 2 Å et que le programme PyRx ne peut pas la calculer.

#### 1.1. Analyse visuelle :

Nous avons eu recours à l'analyse visuelle permettant d'apprécier la fiabilité du programme utilisé, qui consiste à analyser visuellement la superposition du ligand simulé par rapport au même ligand de référence tiré de la PDB. A ce titre, cinq complexes de la BChE ont été analysés (**Figure 13**).







**Figure N°13:** superposition de cinq inhibiteurs de la BuChE (colorés en violet) et ceux obtenus par docking moléculaire (colorés en vert).

## 1.2. Le coefficient de corrélation linéaire (r):

Le coefficient de corrélation consiste à évaluer le degré de relation linéaire qui existe entre les énergies d'interaction de 47 inhibiteurs simulées par docking moléculaires et leurs  $IC_{50}$  déterminés expérimentalement dans la littérature par des essais *in vitro*.

Les résultats des énergies d'interaction des inhibiteurs étudiés ainsi que leur  $IC_{50}$  sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau N°02: Résultats des énergies d'interactions des 47 inhibiteurs de la BuChE et leur activité biologique (log  $IC_{50}$ )**

Inhibiteur	$\Delta G$ Kcal/Mole	$IC_{50}$ $\mu M$	Log $IC_{50}$
str 01	-8,8	7,4	0,86923172
str 02	-10,4	0,51	-0,292429824
str 03	-10,4	1,1	0,041392685

<b>str 04</b>	-10,4	0,87	-0,060480747
<b>str 05</b>	-10,7	0,41	-0,387216143
<b>str 06</b>	-10,7	0,95	-0,022276395
<b>str 07</b>	-11	0,93	-0,031517051
<b>str 08</b>	-10,5	0,63	-0,200659451
<b>str 09</b>	-10,5	1,1	0,041392685
<b>str 10</b>	-9,7	8,1	0,908485019
<b>str 11</b>	-10,5	3,8	0,579783597
<b>str 12</b>	-9,5	3,3	0,51851394
<b>str 13</b>	-10,8	0,43	-0,366531544
<b>str 14</b>	-10,5	1,2	0,079181246
<b>str 15</b>	-10,5	0,75	-0,124938737
<b>str 16</b>	-10,4	0,74	-0,13076828
<b>str 17</b>	-10,3	0,89	-0,050609993
<b>str 18</b>	-10,8	0,86	-0,065501549
<b>str 19</b>	-10,7	0,87	-0,060480747
<b>str 20</b>	-10,4	0,69	-0,161150909
<b>str 21</b>	-9,7	5,4	0,73239376
<b>str 22</b>	-9,8	5,8	0,763427994
<b>str 23</b>	-9,3	15	1,176091259
<b>str 24</b>	-9,7	24	1,380211242
<b>str 25</b>	-8,7	11	1,041392685
<b>str 26</b>	-9,7	4	0,602059991
<b>str 27</b>	-9,9	3,9	0,591064607
<b>Tacrine 01</b>	-10,3	1,87	0,271841607
<b>Tacrine 02</b>	-9,1	9,11	0,959518377
<b>Tacrine 03</b>	-10,5	0,955	-0,019996628
<b>Tacrine 04</b>	-10,7	0,584	-0,233587153
<b>Tacrine 05</b>	-9,5	8,68	0,938519725
<b>Tacrine 06</b>	-10,3	0,865	-0,062983893
<b>Tacrine 07</b>	-9,5	3,61	0,557507202
<b>Tacrine 08</b>	-9,4	5,1	0,707570176
<b>Tacrine 09</b>	-9	5,22	0,717670503
<b>Tacrine 10</b>	-11,3	0,776	-0,110138279
<b>Tacrine 11</b>	-9	14,65	1,165837625
<b>Tacrine 12</b>	-9,7	6,55	0,8162413

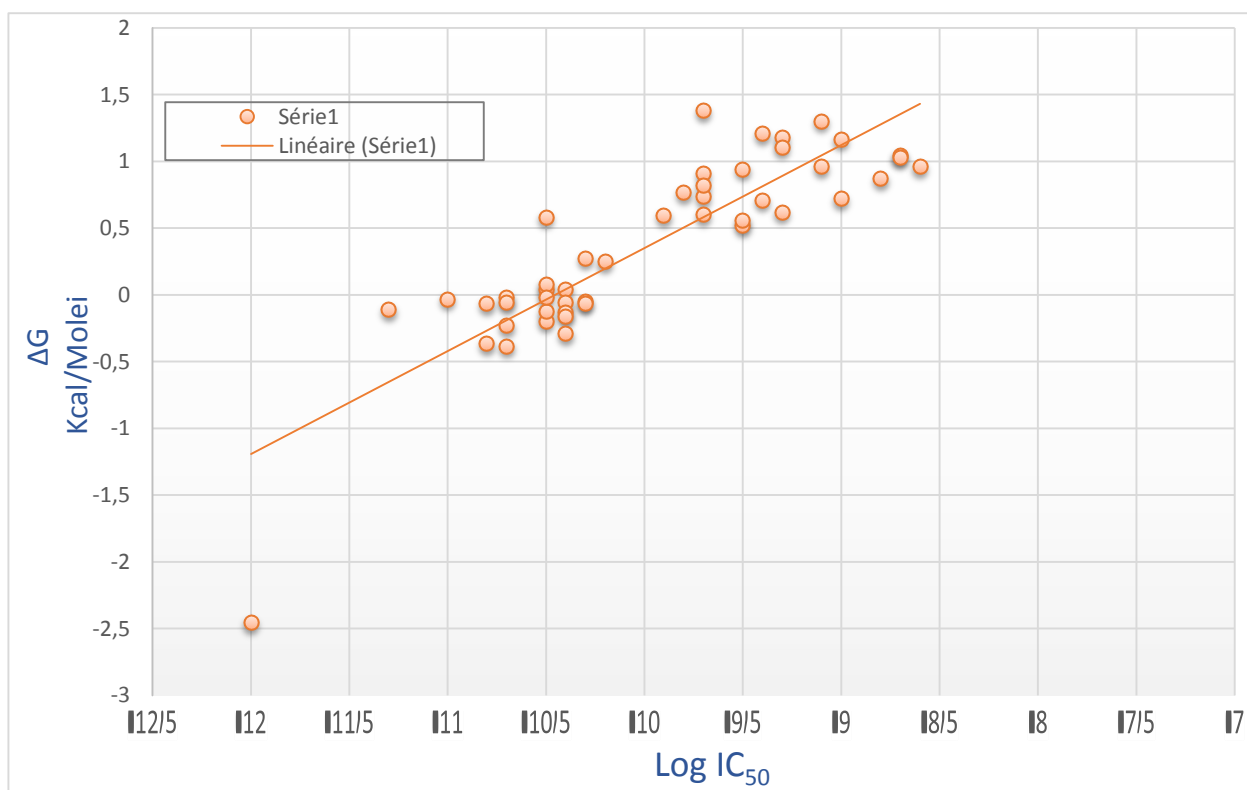
<b>Tacrine 13</b>	-10,2	1,77	0,247973266
<b>Tacrine 14</b>	-9,4	16,08	1,206286044
<b>Tacrine 15</b>	-8,6	9,14	0,960946196
<b>Tacrine 16</b>	-9,3	12,73	1,104828404
<b>Tacrine 17</b>	-8,7	10,75	1,031408464
<b>X 05</b>	-9,3	4,15	0,618048097
<b>X 10</b>	-12	0,0035	-2,455931956
<b>X 11</b>	-9,1	20	1,301029996

Str = structure.

X05= Donepezil

X10= Anthrylcarbonyl- Phenothiazine

X11= Galantamine



**Figure N°14 :**

### **Corrélation entre l'activité biologique de 48 inhibiteurs et leur énergie d'interaction avec la BuChE**

D'après l'analyse par régression linéaire, le coefficient de corrélation linéaire obtenu est égal à **0.86** montrant qu'il existe une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales des inhibiteurs ( $IC_{50}$ ) et leur énergie d'interaction.

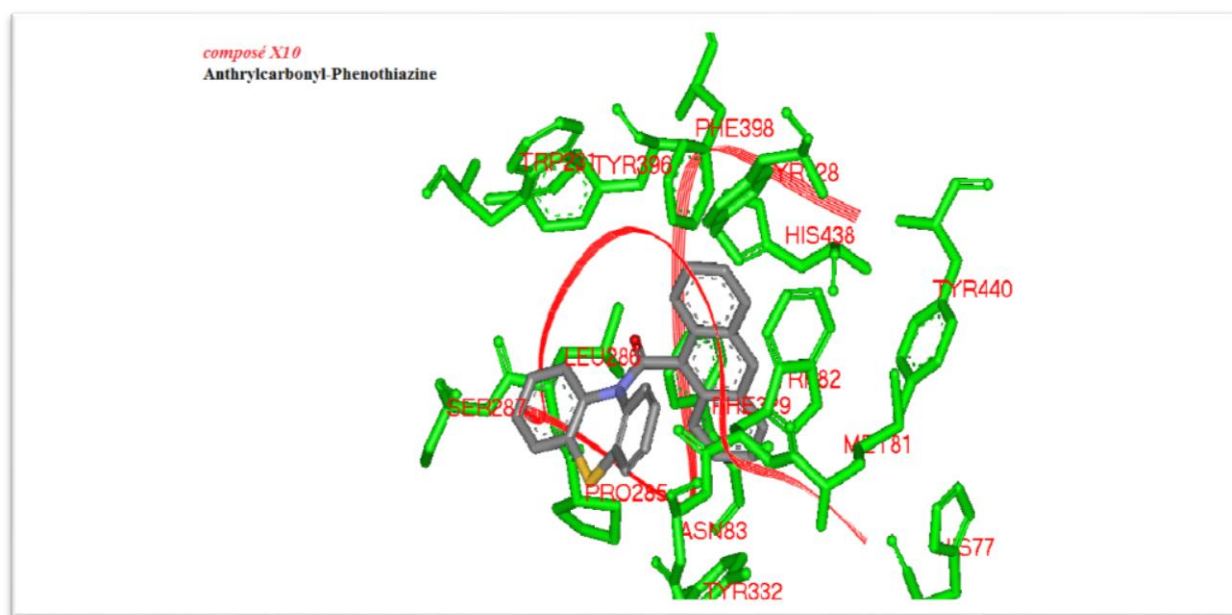
### **1.3. Conclusion :**

L'analyse visuelle associée au coefficient de corrélation linéaire apporte la preuve que le programme **PyRx** est performant et peut être utilisé pour l'étude théorique des inhibiteurs de la BuChE sans trop de risque d'erreurs.

## 2. Etude des interactions entre les inhibiteurs et la BuChE :

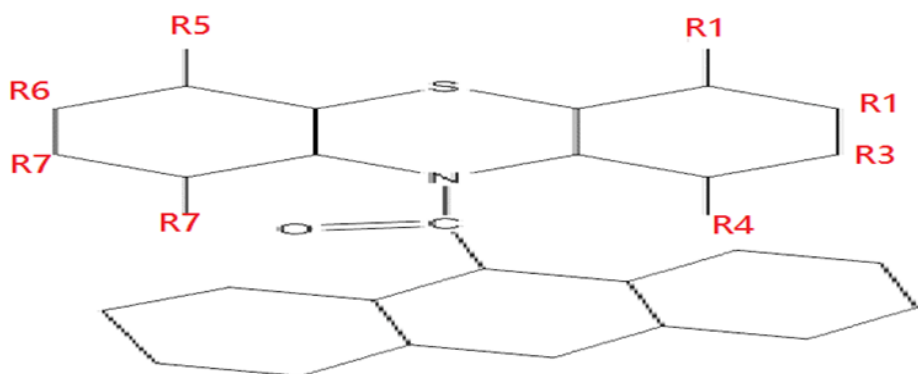
### 2.1. Interactions entre X10 et le site actif :

Dans le but d'étudier le mode de liaison des ligands dans le site actif de la BChE, nous avons choisi le meilleur inhibiteur portant le code X10 dont l'IC<sub>50</sub> expérimental est évalué à 0.0035 μM et l'énergie d'interaction calculée par *PyRx* est égale à -12kcal/mole. L'analyse visuelle réalisée par *Viewer Lite* montre que X10 est bien placée dans le site actif de la BChE où il est stabilisé par de nombreuses interactions hydrophobiques grâce aux acides aminés suivant : LEU286, TYR332, PHE329, HIS438, TRP82, MET81, HIS77, ASN83, TYR440, TYR128, TRP2.

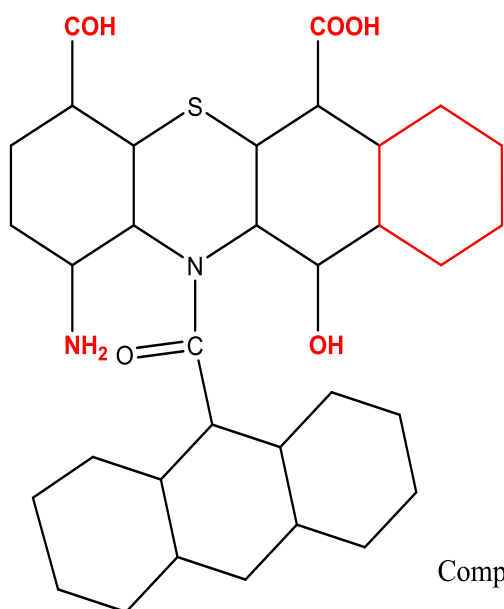


**FigureN°15 : analyse visuelle réalisée par ViewerLite4.2 de la position du composé X10 dans le site actif**

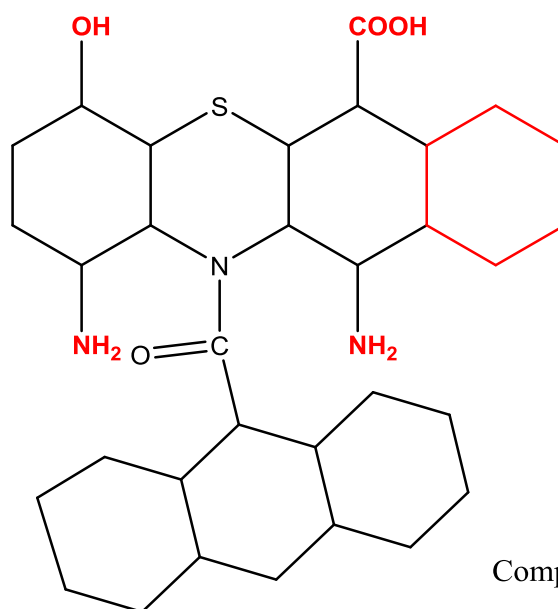
Afin d'améliorer l'affinité de cet inhibiteur, plusieurs groupements fonctionnels présentant la capacité d'engager des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme ont été introduits sur différentes positions de la molécule. Il s'agit des fonctions alcool (-OH), acide (-COOH), carboxyle (COH) et amine (-NH<sub>2</sub>) et le groupement phenyl. Au total, huit composés ont été obtenus dont les structures sont représentés ci-dessous (Figure16)



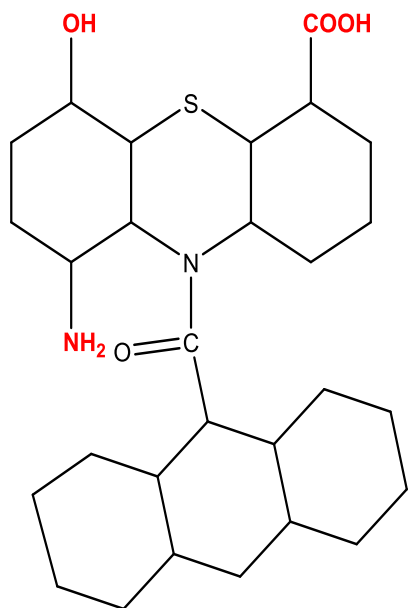
**X10**  
**Anthrylcarbonyl-Phenothiazine**



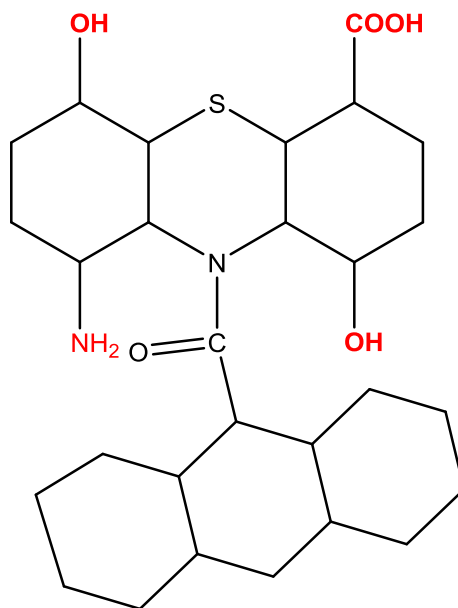
Composé 1



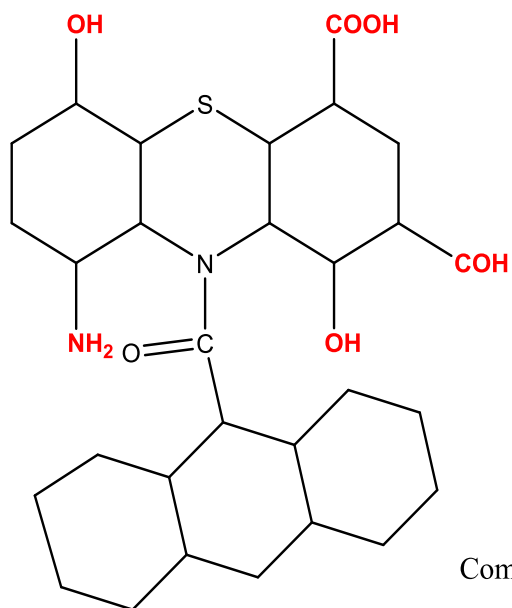
Composé 2



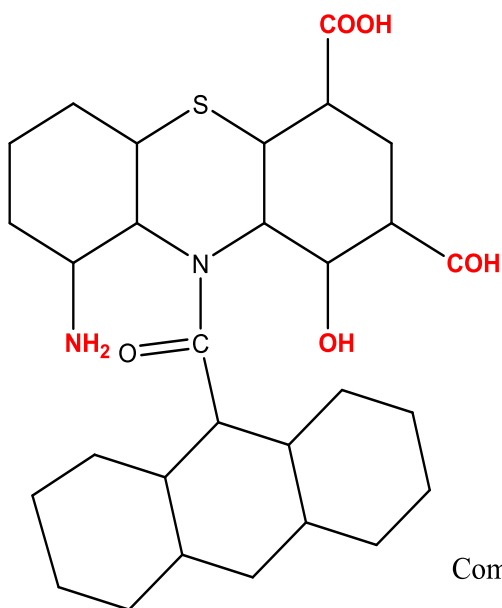
Composé 3



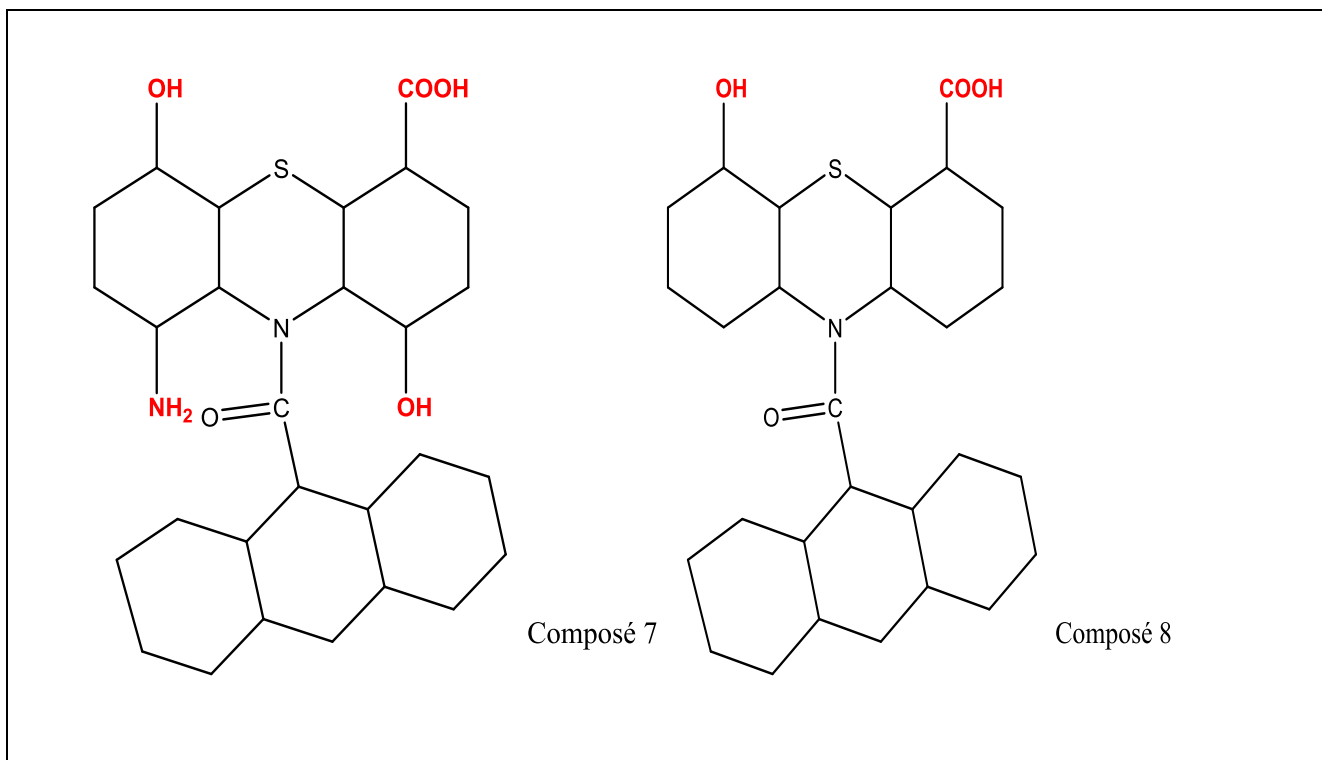
Composé 4



Composé 5



Composé 6



**Figure N°16 : structure du composé X10 (Anthrylcarbonyl-Phenothiazine) avec les nouvelles substitutions.**

La simulation par docking moléculaire avec *PyRx* de ces nouveaux composés avec la BuChE nous a permis d'obtenir les énergies d'interaction suivante (**tableau03**)

**Tableau N°03: Valeurs des énergies d'interaction des 8 nouveaux composés.**

Numéro de composé	Energie d'interaction Kcal/mole
X10	<b>-12</b>
Composé 1	<b>-14.5</b>
Composé 2	<b>-13.5</b>
Composé 3	<b>-13.5</b>
Composé 4	<b>-13.3</b>
Composé 5	<b>-13.3</b>

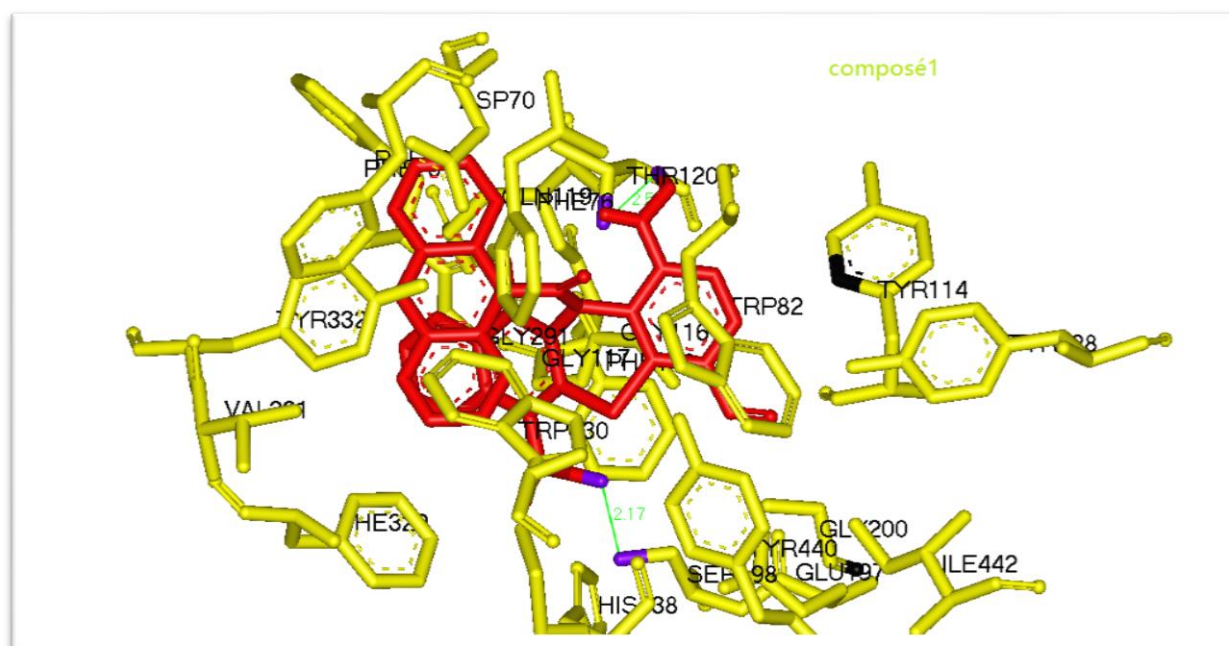
Composé 6	-13.2
Composé 7	-13.2
Composé 8	-12.6

Les résultats du tableau montrent que les différentes substitutions réalisées sur l'*Anthrylcarbonyl-Phenothiazine* ont donné des composés des énergies d'interaction nettement inférieures à celles du composé du départ qui est de -12kcal/mole.

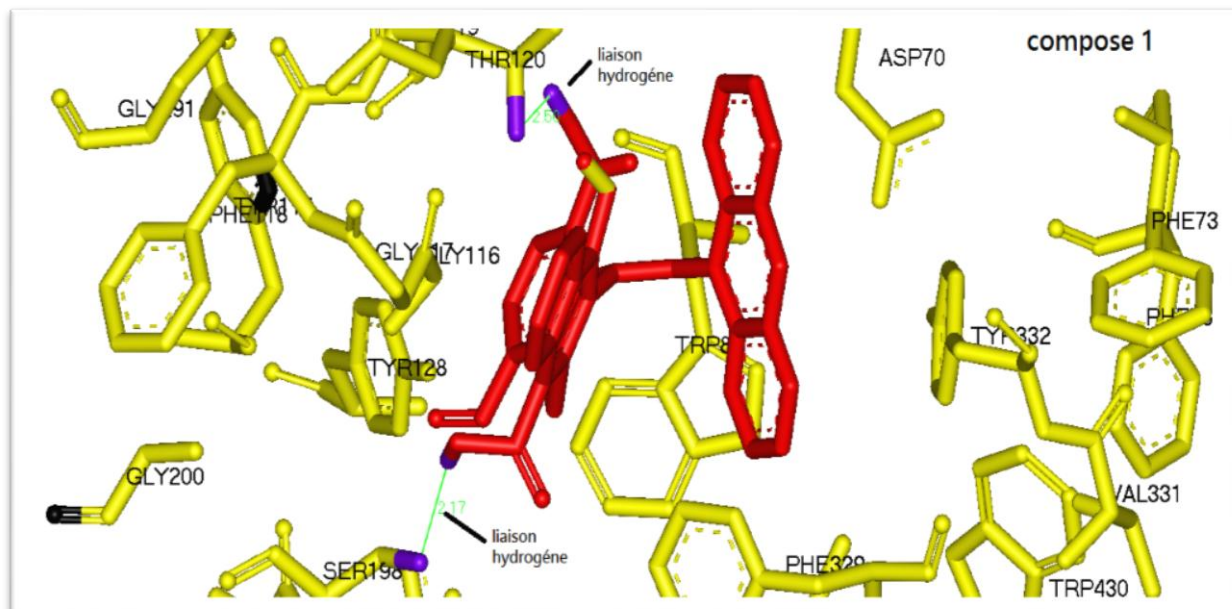
La meilleure énergie d'interaction (-14.5kcal/mole) a été obtenue par le composé sur lequel nous avons introduit 4 substitution différentes : OH, COOH, NH<sub>2</sub> et un groupement phényle.

### **3. Etude des interactions du composé 1 :**

Le composé 1 est stabilisé dans le site actif de la BuChE par deux liaisons Hydrogène dont l'une entre la fonction Oxygène du radical 1 et le résidu SER198 avec une distance de 2.17Å. Et la deuxième liaison entre l'Oxygène du radical 7 et le résidu THR120 avec une distance de 2.50Å. Le composé 1 forme avec les autres acides aminés du site actif des interactions hydrophobes.







**FigureN°17** : interactions du composé 1 avec le site actif de la BuChE.

#### **4. Application de la règle de LIPINSKI :**

La méthode de « filtre ADME/tox » qui est basée sur la règle de 5 de Lipinski [37]. Décrit un ensemble de 5 critères, multiple de 5, permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé

## Conclusion

Notre travail avait pour but de nous initier aux outils de la simulation informatique est de développer nos compétences en particulier pour le docking moléculaire par **pyrx** afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la butyrylcholinestérase pour arriver à des médicaments plus efficaces contre la maladie d'Alzheimer. Pour atteindre notre objectif nous avons réalisé plusieurs étapes :

A/ première étape : le constituant testé est vérifier la fiabilité du programme **pyrx** par l'application de deux tests :

Le premier test : l'analyse visuelle de 5 inhibiteurs disponibles dans la PDB montre une bonne superposition (presque parfaite) entre la structure simulée par **pyrx** et celle obtenue par cristallographie (ligand expérimentale).

Le deuxième test : l'analyse par régression de 47 inhibiteurs de la BChE avec leur  $IC_{50}$  connus et leur énergie d'interaction simulée par **pyrx** donne un coefficient de corrélation égale à 0.86

Ces différents tests nous apportent la preuve que le programme **pyrex** est hautement performant et de conclure qu'il peut être utilisé en toute fiabilité pour simuler les interactions des inhibiteurs de la BChE.

B/ deuxième étape : Dans la perspective de développer de nouveaux inhibiteurs plus affins et plus sélectifs de la BChE, nous nous sommes servis d'un des meilleurs inhibiteurs parmi les 48 étudiés. Le docking moléculaire avec **pyrx** nous a permis de calculer l'énergie d'interaction qui révèle que parmi les 48 inhibiteurs le composé X10 (**Anthrylcarbonyl-Phenothiazine**) est le meilleur inhibiteur de la BChE avec un  $IC_{50}$  égale à 0.0035  $\mu$ M une énergie d'interaction égale à -12 Kcal/mole par rapport aux autres inhibiteurs.

C/ troisième étape : nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la BChE en prenant comme structure de départ l'inhibiteur **Anthrylcarbonyl-Phenothiazine (X10)** afin de l'améliorer par modification structurale de sa structure de base.

Plusieurs groupements fonctionnels présentant la capacité de faire des liaisons hydrogène avec le site actif ont été introduits (cycle de benzène et des fonctions alcool (-OH), acide (-COOH), hydroxyle (COH) et amine (-NH<sub>2</sub>) sur différentes positions.

Les résultats des différentes substitutions montrent que le composé 1 présente une nette amélioration par rapport à la structure de base en ajoutant un cycle benzène, une fonction acide dans R1, fonction alcool dans R1, fonction hydroxy dans R5 et une fonction amine dans R8 ou son énergie d'interaction passe de -12 kcal/mole à -14.5 kcal/mole.

Enfin, l'application de la règle de 5 Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME du composé 1 qui se présente comme un nouvel inhibiteur théoriquement plus affiné et plus sélectif vis-à-vis de la BChE.

Pour l'avenir et comme perspectives, il conviendrait dans le prolongement de cette étude, de tester l'activité biologique du (composé 1) inhibiteur nouvellement proposé par une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* pour confirmer les résultats théoriques réalisés *in silico*.

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion.

## Résumé :

Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur l'inhibition de la butyrylcholinestérase en tant qu'enzyme impliquée dans la *maladie d'Alzheimer*.

Le docking moléculaire « *in silico* » est une nouvelle approche théorique qui permet d'étudier les interactions d'un ligand avec la protéine au niveau moléculaire.

Dans ce travail, avec le programme **PyRx** qui est un ensemble de sous-programme que nous avons utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de l'Enzyme butyrylcholinestérase.

Avec un fort coefficient de corrélation (0.86) et une bonne analyse visuelle des ligands nous avons pu tester les performances du programme et dire qu'il est fiable.

Par poly-substitution d'un inhibiteur appelé (X10) qui a un bon  $IC_{50} = 0.0035 \mu M$ , nous avons pu améliorer son énergie d'interaction de -12kcal/mole jusqu'à -14.5kcal/mole, puis nous avons fait une analyse visuelle sur ces interaction avec le site actif de l'enzyme grâce au programme *Viewer*. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous a permis de nous renseigner de manière positive sur les propriétés ADME de ce composé issu de la poly substitution qui se présente comme un nouveau inhibiteur théoriquement plus affiné et plus sélectif de la BChE.

L'approche *in silico* par **PyRx** et donc une méthode fiable pouvant contribuer de manière efficace au développement de nouveaux inhibiteurs d'une enzyme donnée.

**Mots clés :** PyRX, BChE, X10, Docking moléculaire, Energie d'interaction, inhibiteur,  $IC_{50}$ , Viwer, Lipinski.

## Abstract:

In our research, we have focused on the inhibition of butyrylcholinestérase, which is considered as an enzyme that involved in Alzheimer maladies.

The molecular docking, a new alternative approach allows to model the interactions between ligand and protein

This research with PyRx program. It has been used to study a new inhibitor for an enzyme butyrylcholinestérase.

With a strong coefficient of correlation (0.86) and a nice visually analyse of ligand. We can testing the friability of program, and said that is reliable.

The inhibitor said X10, who have an  $IC_{50}=0.0035\mu M$ , we could improve the interaction energy from -12Kcal/mole to -14.5Kcal/mole. After we analyse it visually by viewer program. Finally, the application of the rule of Lipinski tells us positively on the physic-chemical properties ADME of these new molecules BuChE.

**Keywords:** PyRx, BuChE, X10, molecular docking, interaction energy, inhibitor,  $IC_{50}$ , Viewer, Lipinski.

**Annexe01** : 4BDS

HEADER HYDROLASE 06-OCT-12 4BDS  
TITLE HUMAN BUTYRYLCHOLINESTERASE IN COMPLEX WITH TACRINE  
COMPND MOL\_ID: 1;  
COMPND 2 MOLECULE: CHOLINESTERASE;  
COMPND 3 CHAIN: A;  
COMPND 4 FRAGMENT: CATALYTIC DOMAIN, RESIDUES 29-557;  
COMPND 5 SYNONYM: BUTYRYLCHOLINESTERASE, ACYLCHOLINE ACYLHYDROLASE,  
COMPND 6 BUTYRYLCHOLINE ESTERASE, CHOLINE ESTERASE II,  
COMPND 7 PSEUDOCHOLINESTERASE;  
COMPND 8 EC: 3.1.1.8;  
COMPND 9 ENGINEERED: YES;  
COMPND 10 MUTATION: YES  
SOURCE MOL\_ID: 1;  
SOURCE 2 ORGANISM\_SCIENTIFIC: HOMO SAPIENS;  
SOURCE 3 ORGANISM\_COMMON: HUMAN;  
SOURCE 4 ORGANISM\_TAXID: 9606;  
SOURCE 5 EXPRESSION\_SYSTEM: CRICETULUS GRISEUS;  
SOURCE 6 EXPRESSION\_SYSTEM\_COMMON: CHINESE HAMSTER;  
SOURCE 7 EXPRESSION\_SYSTEM\_TAXID: 10029;  
SOURCE 8 EXPRESSION\_SYSTEM\_CELL\_LINE: CHO-K1;  
SOURCE 9 EXPRESSION\_SYSTEM\_VECTOR\_TYPE: PLASMID;  
SOURCE 10 EXPRESSION\_SYSTEM\_PLASMID: PGS  
KEYWDS HYDROLASE, NERVE TRANSMISSION, INHIBITOR, ALPHA-BETA HYDROLASE  
EXPDTA X-RAY DIFFRACTION  
AUTHOR F.NACHON,E.CARLETTI,C.RONCO,M.TROVASLET,Y.NICOLET,L.JEAN,P.-Y.RENARD  
REVDAT 3 09-APR-14 4BDS 1 REMARK HET HETNAM FORMUL  
REVDAT 3 2 SITE HETATM  
REVDAT 2 31-JUL-13 4BDS 1 JRNL  
REVDAT 1 29-MAY-13 4BDS 0  
JRNL AUTH F.NACHON,E.CARLETTI,C.RONCO,M.TROVASLET,Y.NICOLET,L.JEAN,  
JRNL AUTH 2 P.RENARD  
JRNL TITL CRYSTAL STRUCTURES OF HUMAN CHOLINESTERASES IN COMPLEX WITH  
JRNL TITL 2 HUPRINE W AND TACRINE: ELEMENTS OF SPECIFICITY FOR ANTI-  
JRNL TITL 3 ALZHEIMER'S DRUGS TARGETING ACETYL- AND  
JRNL TITL 4 BUTYRYLCHOLINESTERASE.  
JRNL REF BIOCHEM.J. V. 453 393 2013  
JRNL REFN ISSN 0264-6021  
JRNL PMID 23679855  
JRNL DOI 10.1042/BJ20130013

**Annexe 02** : forma *PDB* du ligand du complexe 4BDS

HETATM	4371	C1	THA	A	701	131.196	114.029	43.859	1.00	29.85	C
HETATM	4372	C2	THA	A	701	131.668	115.318	43.693	1.00	33.29	C
HETATM	4373	C3	THA	A	701	132.327	115.694	42.470	1.00	32.69	C
HETATM	4374	C4	THA	A	701	132.482	114.734	41.448	1.00	33.99	C
HETATM	4375	C5	THA	A	701	131.983	113.393	41.663	1.00	31.96	C
HETATM	4376	C6	THA	A	701	131.364	113.073	42.839	1.00	30.08	C
HETATM	4377	N7	THA	A	701	132.768	117.012	42.362	1.00	31.25	N
HETATM	4378	C8	THA	A	701	133.388	117.387	41.226	1.00	26.30	C
HETATM	4379	C9	THA	A	701	133.610	116.528	40.127	1.00	32.91	C
HETATM	4380	C10	THA	A	701	133.144	115.175	40.243	1.00	36.33	C
HETATM	4381	C11	THA	A	701	133.855	118.839	41.176	1.00	29.92	C

HETATM 4382	C12	THA	A	701	134.956	119.153	40.164	1.00	33.78	C
HETATM 4383	C13	THA	A	701	134.556	118.575	38.811	1.00	35.00	C
HETATM 4384	C14	THA	A	701	134.299	117.033	38.902	1.00	30.32	C
HETATM 4385	N15	THA	A	701	133.321	114.260	39.233	1.00	31.47	N

## ملخص

فيعملنا هذا ركزنا على تثبيط انزيمButyrylcholinesteraseالذي يدخل في مرض الزهايمر وذلك بواسطة Docking الذي يعتبر نهج جديد نظري يسمح بدراسة تفاعل المثبط و موقع التفاعل باستعمال PyRx الذي هو مجموعة برامج ثانوية يستعمل لتطوير مثبطات جديدة أكثر فعالية نظريا نابر نامجوودر اسة نظرية للمثبطات تمكنا منا اختبار فعالية البرنامجو استنتاجا انه يمكن اعتماد عليه 0.86 مع معاملات ارتباط قوي تمكن تحسين طاقة ارتباط من -12 الى -14 Kcal/mole ثم قمنا  $IC_{50}=0.0035\mu M$  بواسطة إضافة جذور للمركب الذي لديه بدراسة نظرية لتفاعلات المثبط و موقع التفاعل بواسطة برنامج viewer Lite اخيرا و بتطبيق قاعدة lipinski و تحقق من ايجابية خصائص ADME تؤكدنا من فعالية النشاط البيولوجي بصفة عادية ومنه استنتاج ان Docking هو طريقه فعاله يمكن استعمالها لتطوير مثبطات جديدة لإنزيم معين.

الكلمات المفتاحية :

PyRx , BChE , Docking moleculaire, Energie d'interaction, inhibiteurs,  $IC_{50}$ , VieWer, Lipinski

Nom et Prenom:

Boukahil maya  
Bilami yacine

## Etude *in silico* de l'inhibition de la Butyrylcholinestérase

### Résumé :

Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur l'inhibition de la butyrylcholinestérase en tant qu'enzyme impliquée dans la *maladie d'Alzheimer*.

Le docking moléculaire « *in silico* » est une nouvelle approche théorique qui permet d'étudier les interactions d'un ligand avec la protéine au niveau moléculaire.

Dans ce travail, avec le programme *PyRx* qui est un ensemble de sous-programme que nous avons utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de l'Enzyme butyrylcholinestérase.

Avec un fort coefficient de corrélation (0.86) et une bonne analyse visuelle des ligands nous avons pu tester les performances du programme et dire qu'il est fiable.

Par poly-substitution d'un inhibiteur appelé (X10) qui a un bon  $IC_{50} = 0.0035 \mu M$ , nous avons pu améliorer son énergie d'interaction de -12kcal/mole jusqu'à -14.5kcal/mole, puis nous avons fait une analyse visuelle sur ces interaction avec le site actif de l'enzyme grâce au programme *Viewer*. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous a permis de nous renseigner de manière positive sur les propriétés ADME de ce composé issu de la poly substitution qui se présente comme un nouveau inhibiteur théoriquement plus affiné et plus sélectif de la BuChE.

L'approche *in silico* par *PyRx* et donc une méthode fiable pouvant contribuer de manière efficace au développement de nouveaux inhibiteurs d'un enzyme donnée.

**Mots clés :** PyRX, BChE, X10, Docking moléculaire, Energie d'interaction, inhibiteur,  $IC_{50}$ , Viewer, Lipinski.

Devant le jury :

**Président du jury :** Mr. CHIKHI A. (Pr. Université des Frères Mentouri Constantine).

**Rapporteur :** Mr. BENSEGUENI A. (Pr. Université des Frères Mentouri Constantine).

**Examineur :** Mr. MOKRANI E.H. (M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine).

*Année universitaire*  
*2014 - 2015*



