

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

Université Mouloud MAMMERY

Faculté de médecine

TIZI-OUZOU

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة مولود معمري

كلية الطب

تيزي وزو



ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵉⵎⵎⴰⵔ ⵏ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ

Département de Pharmacie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté et soutenu, le 18 Juillet 2022

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTEUR EN PHARMACIE

Thème :

**Etude par docking moléculaire de l'affinité de nouveaux analogues de
la rivastigmine pour l'acétylcholinestérase**

Réalisé par :

Akli Ahlam

Belakhdar Hafida

Boursila Faroudja

Tali Ikhlal

Composition du jury :

Dr Ababou N.	MAHU	Faculté de médecine	UMMTO	Président du jury
Dr Hadhoum N.	MCB	Faculté de médecine	UMMTO	Rapporteur
Dr Allel L.	MAHU	Faculté de médecine	UMMTO	Membre
Dr Lahmek K.	Assistante	Faculté de médecine	UMMTO	Membre

Dédicace

A Mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, pour toute leur assistance et leur présence dans ma vie.

Merci d'être toujours là pour moi

A mes chers frères, à mes chères sœurs, à tous les membres de la famille AKLI et à ma belle-famille.

A mon mari, je profite de la présente occasion pour vous remercier pour tout le soutien, la sympathie et l'amour que vous m'accordez. Que Dieu le tout puissant vous comble de santé, de bonheur et vous prouve une longue vie pleine de joie. A mon futur bébé, car le fait de savoir qu'il ne reste que très peu de temps pour qu'il soit avec nous dans cette vie me donne plus de courage et de volonté pour faire mon travail.

*À mes chères collègues **Djoumana, Ferroudja et Ikhlas**, on a passé de bons moments ensemble, que dieu garde notre amitié pour toujours.*

*A tous mes amis de la promotion particulièrement **Sonia, Khadidja** avec lesquelles j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.*

A toute personne m'ayant aidé de près ou de loin.

AHLAM

Dédicaces

A mes chers parents : MILOUD et FATNA, que Dieu vous protège.

quoique je dise, je ne saurais ni les remercier pour leur

Sacrifices et soutien ni leur exprimer l'amour et la

reconnaissance que j'ai pour eux.

A mes sources de fierté : mon super frère IBRAHIM et

mes adorables sœurs

ASMAA et ICHRAK ainsi que sa petite famille, son mari ISMAIL

et nos petits étoiles YAZANE et YOUCEF.

A mon amie intime : HAFIDA.

Sans vous je ne pouvais jamais être là où je suis aujourd'hui.

Et à mon trinôme : AHLAM, FAROUDJA et IKHLAS.

HAFIDA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail comme un témoignage d'affection et de respect.

À mes chers parents, pour tout l'amour dont vous m'avez entouré, pour tout ce que vous avez fait pour moi, je ferai de mon mieux pour rester un sujet de fierté à vos yeux avec l'espoir de ne jamais vous décevoir. Que ce modeste travail, soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et de vos prières quotidiennes.

À mes chers frères et chères sœurs qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

À mes nièces et mon cher neveu.

À mon cher trinôme : Ahlam, Hafida et Ikhlas.

À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.

FAROUJJA

Dédicaces

Grâce à Dieu, tout puissant, qui m'a donné le courage, la volonté et la force pour réaliser ce mémoire.

Je dédie ce travail à:

Mes très chers Parents, que Dieu vous donne une longue vie, Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Merci d'être toujours là pour moi.

A mes chères sœurs. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mon neveu adoré et ma chère nièce.

A toute ma famille et tous mes amis.

A mes collègues dans ce travail.

IKHLAS

Remerciements

Nous remercions tout d'abord **Allah** tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail. Car l'homme propose mais Dieu dispose.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice **Dr Hadhoum N** Maître de conférences **B** en chimie thérapeutique, pour sa patience, ses encouragements, son orientation, et ses conseils précieux, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nous tenons également à remercier les membres du jury qui nous honorent avec leur assistance pour l'évaluation de ce modeste travail. Nous remercions vivement **Dr Ababou N**, Maître assistante hospitalo universitaire en neurologie, CHU. Tizi ouzou, d'avoir accepté de présider le jury, ainsi que **Dr Allel L**, Maître assistante en chimie thérapeutique et **Dr Lahmek. K**, Assistante en chimie thérapeutique d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions aussi tous les enseignants qui nous ont transmis notre savoir actuel tout au long de notre cursus.

Nous tenons à remercier vivement nos très chers parents pour leur soutien et encouragement durant tout notre parcours scolaire.

Enfin, nous pourrions pas terminer sans remercier infiniment toute personne qui a participé de près ou de loin à la l'accomplissement de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	xi
Introduction	1
Objectifs	3

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Généralités sur la maladie d'Alzheimer

1	Maladie d'Alzheimer	4
1.1	Historique	4
1.2	Définition.....	5
1.3	Différentes formes de la maladie d'Alzheimer	6
1.3.1	Forme familiale	6
1.3.2	Formes sporadiques.....	7
1.4	Physiopathologie	8
1.4.1	Hypothèse cholinergique.....	8
1.4.2	Hypothèse amyloïde	9
1.4.3	Hypothèse de la protéine tau	13
2	Traitement de la maladie d'Alzheimer.....	15
2.1	Historique	15
2.2	Traitements symptomatiques	15
2.2.1	Neuroleptiques	15
2.2.2	Antiglutamates	16
2.2.3	Vitamine E.....	16
2.2.4	Inhibiteurs des cholinestérases	17
2.3	Traitements préventifs de la maladie d'Alzheimer.....	17
2.3.1	Antihypertenseurs.....	17
2.3.2	Anti inflammatoire non stéroïdiens (AINS).....	17
2.3.3	Acides gras et Oméga3.....	18
2.3.4	Substances antioxydants.....	18
2.4	Perspectives du traitement de la maladie d'Alzheimer	18

CHAPITRE II : Etude des inhibiteurs des cholinestérases

1	Système cholinergique	22
1.1	Acétylcholine	22
1.2	Cholinestérases	24
1.2.1	Butyrylcholinestérase (BuChE).....	25
1.2.2	Acétylcholinestérase.....	25
2	Inhibiteurs de cholinestérases	30
2.1	Inhibiteurs réversibles et irréversibles de l'acétylcholinestérase	31
2.1.1	Inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase	31
2.1.2	Inhibiteurs réversibles de l'acétylcholinestérase	32
2.1.3	Inhibiteurs pseudo-réversibles de l'acétylcholinestérase	35
2.2	Antiacétylcholinestérase dérivé des plantes	38

CHAPITRE III : Docking moléculaire

1	Modélisation moléculaire.....	41
2	Docking moléculaire	41
2.1	Définition.....	41
2.2	Docking rigide	42
2.3	Docking flexible	43
2.4	Docking semi-flexible	43
2.5	Principes du docking moléculaire.....	43
2.5.1	Approche combinatoire	43
2.5.2	Approche stochastique	44
2.5.3	Approche déterministe	44
2.6	Processus de scoring.....	45
2.6.1	Principe.....	45
2.6.2	Familles de fonctions de scoring	46
2.6.3	Description des fonctions de scoring utilisées	48
2.7	Logiciels de docking.....	50
2.8	Applications.....	50
3	Principales interactions moléculaires.....	51

3.1	Liaisons hydrogène.....	51
3.2	Interactions de Van der Waals.....	51
3.3	Interactions pi-cation.....	52
3.4	Interaction hydrophobe.....	52
3.5	Interaction électrostatique.....	53
3.6	Interactions entre système π	53
4	Prédiction ADMET in silico.....	54
4.1	Absorption.....	54
4.2	Distribution.....	55
4.3	Métabolisme.....	56
4.4	Excrétion.....	56
4.5	Toxicité.....	57

PARTIE PRATIQUE

1	Matériel et méthodes.....	60
1.1	Docking moléculaire.....	60
1.1.1	Matériel.....	60
1.1.2	Méthode.....	65
1.2	Etude in silico des propriétés ADMET.....	92
2	Résultats.....	95
2.1	Validation du protocole de docking.....	95
2.2	Résultats du docking moléculaire.....	99
2.2.1	Etude d'interaction de la rivastigmine.....	100
2.2.2	Etude d'interaction des dérivés de la rivastigmine.....	101
2.3	Prédiction des propriétés ADMET et de Druglikeness de la rivastigmine et ses dérivés.....	107
2.3.1	Propriétés physicochimiques.....	107
2.3.2	Chimie médicale.....	108
2.3.3	Propriétés pharmacocinétiques.....	111
2.3.4	Profil de toxicité.....	113
3	Discussion.....	114
3.1	Validation du protocole de docking.....	114
3.2	Discussion des résultats du docking moléculaire.....	114

3.3	Etude in silico ADMET des molécules	116
3.3.1	Propriétés physico-chimiques	117
3.3.2	Propriétés pharmacocinétiques (ADME)	117
3.3.3	Chimie médicale.....	120
3.3.4	Profil toxicologique.....	120
	Conclusion.....	123
	Références bibliographiques	
	Résumé	
	Abstract	

Liste des abréviations

2D: Structure bidimensionnelle.

3D : Tridimensionnelle.

Å : Angström.

A β : Amyloïde β .

ACh : Acétylcholine.

AChE : Acétylcholinestérase.

AChEI : Inhibiteur de l'acétylcholinestérase.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADMETox : Absorption, distribution, métabolisme, excrétion, toxicité.

ADV: Autodock Vina.

AH : Accepteur d'hydrogène.

AINS : Anti inflammatoire non stéroïdiens.

AICD : Domaine intracellulaire de la protéine précurseur amyloïde.

ALA : Acide α -linoléique.

ALAT : Alanine aminotransférase.

AMM : Autorisation de mise sur le marché.

APP : Protéine Précurseur de l'Amyloïde.

Apo E : Apolipoprotéine E.

ARN : Adénosine ribonucléique.

AS: Site anionique.

ASAT :Aspartate aminotransférase.

Ala: Alanine.

Arg : Arginine.

Asp : Acide Aspartique.

ATP: Adénosine triphosphate.

AVC : Accident vasculaire cérébrale.

BACE: β -site APP-cleaving enzyme.

BBB: Blood- Brain Barrier.

BDS: BIOVIA Discovery Studio.

BHE : Barrière hémato-encéphalique.

BuCh : Butyrylcholine.

BuChE : Butyrylcholinestérases.

CAS : Site catalytique anionique.

CDK5: cyclin-Dependant Kinase 5.

ChAT : Choline acétyltransférase.

CYP : Cytochrome.

D : distance.

DH : Donneur d'hydrogène.

DM : Dynamique moléculaire.

DNF : Dégénérescences neurofibrillaires.

E : Energie.

ES : Site estérasique.

F : Biodisponibilité.

FDA: Food and Drug Administration.

Fu : Fraction libre dans le plasma.

GABA : Glutamate et l'acide γ -aminobutyrique.

GDP: Guanosine diphosphate.

Glu: Acide glutamique.

Gly: Glycine.

GSK-3 β : Glycogen synthase Kinase-3 β .

GTP: Guanosine triphosphate.

H: Hydrogène.

HERG gène: Human Ether-à-go-go-Related Gene.

His: Histidine.

IBAC: Interactions-based accuracy classification.

IDE : Enzyme de dégradation de l'insuline.

LogP : Le logarithme du coefficient de partition entre les phases H₂O/Octanol.

LogS : Le logarithme de la solubilité aqueuse.

MA : Maladie d'Alzheimer.

MAP : Protéine associée au microtubule.

MM : Mécanique moléculaire.

MGL: Molecular Graphics Laboratory.

NEP : Néprilysine.

NCT: Nicastrine.

n Rot: Nombre de liaisons de rotation.

NMDA : N-méthyl-D-aspartate.

OP: Organophosphate.

PA : Plaque amyloïde.

PAS : Site périphérique anionique.

Phe: Phénylalanine.

PDB: Protéine Data Bank.

PDBQT: Protein Data Bank, Partial Charge (Q), Atom Type (T) format.

P-gp : Glycoprotéine P.

PM : Poids moléculaire.

PMF: Potential Mean Force.

PPB : Fraction liée aux protéines plasmatiques. **PS :** Plaques séniles.

PS1 : Gène préséniline 1.

PS2 : Gène préséniline 2.

QM : Mécanique quantique.

QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship.

R&D : Recherche et développement.

RMN: Résonance magnétique nucléaire.

RMSD: Root-mean-square deviation.

RNS : Espèces réactives de l'oxyde d'azote.

ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

RTK : Récepteur à tyrosine kinase.

Ser : Serine.

SMILES: Simplified Molecular-Input Line-Entry System.

SNC: Système nerveux central.

Tau : Tubule-Associated Unit.

TcAChE : Acétylcholinestérase de *Torpedo californica*.

TMA : Tétraméthylammonium.

TNF- α : Facteur tumoral de nécrose α .

TPSA : La surface polaire de la molécule.

Trp: Tryptophane.

VD : Volume de distribution.

VAchT : Transporteur vésiculaire de l'acétylcholinestérase.

Liste des tableaux

Tableau I: Exemples de logiciels de docking	50
Tableau II: Scores du docking	79
Tableau III: Résultats du redocking (méthode 1).	89
Tableau IV: Résultats du redocking (méthode 2).	90
Tableau V: Valeur RMSD obtenue par ADV	95
Tableau VI: Triade catalytique de différents types de l'acétylcholinestérase	97
Tableau VII: Caractéristiques des liaisons formées entre le site d'interaction de la cible et les ligands (galantamine co-cristallisée et la meilleure pose générée).	98
Tableau VIII: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose de la rivastigmine avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.	100
Tableau IX: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M1 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.	101
Tableau X: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M2 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.	102
Tableau XI: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M3 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.	103
Tableau XII: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M4 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.	104
Tableau XIII : Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose de M5 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.	105
Tableau XIV: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M6 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.	106
Tableau XV: Propriétés physico-chimiques prédites de la rivastigmine et ses dérivés.	107
Tableau XVI: Chimie médicale prédite de la rivastigmine et ses dérivés.	108

Tableau XVII: Paramètres de la règle de Lipinski	109
Tableau XVIII: Paramètres de la règle de Veber	109
Tableau XIX: Paramètres de la règle de GSK	110
Tableau XX: Paramètres de la règle de triangle d'or	110
Tableau XXI: Profil d'absorption prédit de la rivastigmine et ses dérivés.	111
Tableau XXII: Profil de distribution prédit de la rivastigmine et ses dérivés.	111
Tableau XXIII: Profil du métabolisme prédit de la rivastigmine et ses dérivés.....	112
Tableau XXIV: Profil d'élimination prédit de la rivastigmine et ses dérivés.	112
Tableau XXV: Profile de toxicité prédit de la rivastigmine et ses dérivés.	113

Liste des figures

Figure 1: Voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique.	11
Figure 2: Formes 3R (à gauche) et 4R (à droite) de la protéine tau.	14
Figure 3: Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine	22
Figure 4: Synthèse et dégradation de l'acétylcholine.....	23
Figure 5: Récepteurs cholinergiques.	23
Figure 6: Structure 3D de Tc AChE affichée sous forme de diagramme en ruban.....	26
Figure 7: Site actif de la TcAChE.....	27
Figure 8: Schéma représentatif du site actif d'AChE.....	28
Figure 9: Mécanisme général d'hydrolyse par une sérine hydrolase.	30
Figure 10: Structure chimique générale des organophosphates.	31
Figure 11: Structure chimique de métrifonate.....	32
Figure 12: Structure chimique de tacrine.	33
Figure 13: Structure chimique de donépézil.	34
Figure 14: Structure chimique de galantamine.	34
Figure 15: Structure chimique de l'huperzine A.....	35
Figure 16: Structure chimique de physostigmine.....	36
Figure 17: Structure chimique d'epastigmine.	36
Figure 18: Structure chimique de phenserine.....	37
Figure 19: Structure chimique de rivastigmine.	38
Figure 20: Structure chimique de certains monoterpénoïdes.....	39
Figure 21: Schématisation de l'amarrage moléculaire.....	42

Figure 22: Liaison hydrogène.	51
Figure 23: Interactions de Van der Waals.	52
Figure 24: Interactions cation- pi	52
Figure 25: Liaison hydrophobe	52
Figure 26: Interactions électrostatiques.	53
Figure 27: Interactions non liées π - π	53
Figure 28: Informations relatives à 4EY6.	60
Figure 29: Structure chimique générale de nouveaux dérivés de la rivastigmine.	62
Figure 30: Interface du logiciel ChemDraw.	62
Figure 31: Interface du logiciel AutoDock Tools.	63
Figure 32: Précision de prédiction du mode de liaison sur l'ensemble de test pour AutoDock et AutoDock Vina.	64
Figure 33: Interface du logiciel Biovia Discovery Studio	64
Figure 34: Interface du logiciel Pymol.	65
Figure 35: Importation de la protéine 4ey6 sous forme pdb sur AutoDock Tools.	66
Figure 36: Sélection des ligands co-cristallisés (1/2).	67
Figure 37: Sélection des ligands co-cristallisés (2/2).	67
Figure 38: Elimination des ligands co-cristallisés.	68
Figure 39: Addition des hydrogènes polaires nécessaires aux différentes interactions a la structure (1/2).	68
Figure 40: Addition des hydrogènes polaires nécessaires aux différentes interactions a la structure (2/2).	69
Figure 41: Addition des charges partielles (charge de kollman).	69
Figure 42: Enregistrement de la protéine sous forme pdbqt (1/2).	70

Figure 43: Enregistrement de la protéine sous forme pdbqt (2/2).....	70
Figure 44: Format pdbqt de la protéine (4ey6).	71
Figure 45: Importation du ligand sur AutoDock Tools.....	72
Figure 46: Définition de la molécule comme ligand (1/2).....	72
Figure 47: Définition de la molécule comme ligand (2/2).....	73
Figure 48: Enregistrement du ligand sous forme pdbqt.	73
Figure 49: Ouverture des deux fichiers pdbqt du récepteur et du ligand	75
Figure 50: Choix l'enzyme 4ey6 comme macromolécule.	75
Figure 51: Grid Box et définition des différents paramètres.....	76
Figure 52: Création d'un fichier texte nommé « config.txt », qui contient toutes les informations nécessaires pour le docking.	76
Figure 53: ouverture de la commande d'introduction des liens des dossiers nécessaires au docking.....	77
Figure 54: Spécification des fichiers nécessaires au docking des fichiers.....	77
Figure 55: Exécution des calculs du docking moléculaire.....	78
Figure 56: Résultats du docking moléculaire.....	78
Figure 57 : Macromolécule (4EY6) et le fichier output du ligand sur le programme.....	80
Figure 58: Définition de la macromolécule comme récepteur	80
Figure 59: Définition du modèle 0 (meilleure pose) comme ligand.	81
Figure 60: Visualisation de l'interaction du ligand avec le récepteur	81
Figure 61: Visualisation des distances et les acides aminés en interaction en 3D.....	82
Figure 62: Visualisation du diagramme en 2D des acides aminés en interaction.	82
Figure 63: Structure cristalline de l'acétylcholinestérase sur pymol.....	84
Figure 64: Elimination de tous les ligands co-cristallisés à l'exception de la galantamine... ..	84

Figure 65: Ouverture du complexe sur AutoDock Tools.....	85
Figure 66: Identification du site de liaison par AutoDock Tools (méthode 1).	85
Figure 67: Ouverture du complexe sur BIOVIA Discovery Studio.....	86
Figure 68: Identification des coordonnées X, Y et Z du centre de grid box par l'utilisation de BIOVIA Discovery Studio.	86
Figure 69: Identification du site d'interaction par AutoDock Tools (méthode 2).	87
Figure 70: Format pdb de la galantamine optimisée par ChamDraw.	87
Figure 71: Position de la boîte de docking (Grid box) dans le site actif de l'AChE (méthode 1)	88
Figure 72: Lancement du redocking (méthode 1).	88
Figure 73: Position de la boîte de docking (Grid box) dans le site actif de l'ACh (méthode 2).	89
Figure 74: Lancement du redocking(méthode 2).	90
Figure 75: Résultats d'analyse visuelle par Pymol (Méthode 1).....	91
Figure 76: Résultats d'analyse visuelle par BIOVIA Discovery Studio (Méthode 1).....	91
Figure 77: Résultats d'analyse visuelle par Pymol (Méthode 2).....	91
Figure 78: Résultats d'analyse visuelle Par BIOVIA Discovery Studio (Méthode 2).....	91
Figure 79: Ouverture de la fenêtre ADMET du serveur ADMETlab2.0.....	93
Figure 80: Importation du format smile de la molécule à partir de serveur SwissADME.....	93
Figure 81: Soumission de la molécule pour la prédiction ADMET.....	94
Figure 82: Superposition de galantamine co-cristallisée (coloré en rouge) et la 1 ^{ère} pose générée (coloré en vert) obtenue par pymol.....	96
Figure 83: Superposition de galantamine co-cristallisée (coloré en jaune) et la 1 ^{ère} pose générée (coloré par type d'atomes) obtenue par BDS.....	96
Figure 84: Superposition de galantamine co-cristallisée (coloré en magenta) et la 7 ^{ème} pose générée (coloré en orange) obtenue par pymol.....	96

Figure 85: Superposition de galantamine co-cristallisée (coloré en jaune) et la 7 ^{ème} pose générée (coloré par type d'atomes) obtenue par BDS.....	96
Figure 86: Visualisations des interactions de galantamine co-cristallisée (a) et celles de la meilleure pose (b) dans le site actif par BDS.	97
Figure 87: Interactions établies en 3D (rivastigmine).....	101
Figure 88: Interactions établies en 2D (rivastigmine).....	100
Figure 89: Interactions établies en 3D(M1)	102
Figure 90: Interactions établies en 2D (M1)	101
Figure 91: Interactions établies en 3D (M2).....	103
Figure 92: Interactions établies en 2D(M2)	102
Figure 93: Interactions établies en 3D (M3)	103
Figure 94: Interactions établies en 2D (M3)	103
Figure 95: Interactions établies en 3D (M4)	104
Figure 96: Interactions établies en 2D (M4)	104
Figure 97: Interactions établies en 3D (M5).....	105
Figure 98: Interactions établies en 2D (M5)	105
Figure 99: Interactions établies en 3D (M6).....	106
Figure 100: Interactions établies en 2D (M6)	106

Introduction

Avec le vieillissement de la population, la maladie d'Alzheimer est devenue un problème majeur de santé publique. C'est une affection neurodégénérative des tissus cérébraux entraînant la perte progressive et irréversible des fonctions mentales. La maladie d'Alzheimer est la principale cause de démence chez les personnes âgées [1], selon le World Alzheimer report 2015, plus de 35,6 millions de personnes étaient touchées par cette maladie.

De nombreuses études ont montré 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 circulants dans le cerveau. Le déficit en acétylcholine peut atteindre jusqu'à 90% dans les stades sévères de la maladie [2]. Pour pallier ce déficit (en acétylcholine), les médecins font habituellement appel aux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Ces molécules empêchent la dégradation de l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique, ils 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'acétylcholinestérase que nous nous sommes intéressées dans notre étude.

Notre travail concerne l'étude, *in silico*, des interactions entre l'acétylcholinestérase et les nouveaux analogues proposés de la rivastigmine, en se basant sur la structure chimique de cette dernière et sur la relation structure activité, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette enzyme et de contribuer au développement de nouvelles molécules pour lutter contre cette maladie en faisant appel à une étude (approche), *in silico*, de modélisation des interactions enzyme -inhibiteur (protéine- ligand) appelée la méthode de docking moléculaire.

Récemment, la méthode de docking moléculaire a gagné beaucoup d'intérêt dans de nombreuses stratégies de développement de médicaments, elle permet de prédire l'effet biologique d'un grand nombre de molécules dans un temps raisonnable et de proposer à la fin une série réduite de molécules à synthétiser et à tester expérimentalement sur une cible donnée [4].

La partie théorique de notre travail a été organisée en chapitres. Nous avons d'abord traité l'historique, la définition, ainsi que la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer dans le premier chapitre, nous avons ensuite détaillé, dans le 2^{ème} chapitre, les différents inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et les généralités sur le docking moléculaire dans le 3^{ème} chapitre.

La partie pratique traite la prédiction, *in silico*, de nouveaux analogues de la rivastigmine ainsi qu'ADMET avec une conclusion sur les molécules potentiellement actives dépourvues de toxicité et pouvant constituer des candidats médicaments potentiels.

Objectifs

Le traitement de la maladie d'Alzheimer repose essentiellement sur quelques molécules inhibitrices dont l'effet est principalement le traitement des troubles de la mémoire et cognitifs, avec quelque molécules pouvant être utilisées comme complément alimentaire pour renforcer la mémoire.

Dans ce contexte, notre travail consiste à proposer de nouveaux produits en s'inspirant de la structure chimique de médicaments mis sur le marché. Pour atteindre cet objectif, nous avons fixé plusieurs objectifs secondaires :

- Apporter des modifications structurelles sur la rivastigmine :

Une étude approfondie des médicaments commercialisés nous a permis de choisir la rivastigmine pour son efficacité thérapeutique avec moins d'effets indésirables.

- Une étude détaillée de la structure chimique de la rivastigmine nous a permis de proposer de nouveaux analogues en apportant des modifications structurelles sur la partie carbamate.

- Evaluation de l'affinité pour la cible (acétylcholinestérase) par un docking moléculaire.

- Compléter l'étude par une prédiction *in silico* des propriétés ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité).



CHAPITRE I :
Généralités sur la maladie
d'Alzheimer

1 Maladie d'Alzheimer

1.1 Historique

A la fin du XIX^{ème} siècle, l'état de démence du sujet âgé était considéré par la grande majorité des psychiatres comme habituel et lié à l'usure normale du temps. Ce sont les travaux de l'école de Munich, autour de Kraepelin, un des deux psychiatres allemands à croire à l'intérêt de l'étude histologique du cerveau dans les maladies mentales, qui ont conduit à mieux comprendre ces maladies. Plusieurs médecins rejoignent alors le groupe de Munich dont Aloïs ALZHEIMER qui s'était initié à l'étude microscopique du cerveau aux côtés de Franz Nissl [5].

Alzheimer rapporte l'observation d'une femme de 51 ans qui a présenté un délire de jalousie suivi d'une « désintégration » des fonctions intellectuelles. L'examen au microscope du cerveau de la patiente a révélé la présence, dans le cortex cérébral, de lésions analogues à celles de la démence sénile, les plaques séniles, associées à des lésions jusque-là inconnues, caractérisées par des amas anormaux de fibrilles dans les neurones, les dégénérescences neurofibrillaires. A la suite de cette première observation, c'est Kraepelin lui-même qui, en 1912, dans son traité de psychiatrie, parle pour la première fois de la « maladie d'Alzheimer » définie alors comme une démence du sujet jeune, rare et dégénérative. C'est ainsi que fut « découverte » la maladie d'Alzheimer [5].

Il fallait attendre le dernier tiers du XX^{ème} siècle pour voir les connaissances sur cette maladie évoluer sensiblement. La description de la maladie d'Alzheimer est un peu différente de sa description initiale. Elle est caractérisée par une démence dégénérative contrairement aux autres causes de démences, vasculaires, toxiques ou carencielles. Elle ne peut plus être considérée comme une maladie du sujet jeune car de multiples études ont montré de nombreux tableaux cliniques de démence chez le sujet âgé s'accompagnaient des deux types de lésions cérébrales (plaques séniles et dégénérescence neurofibrillaire). En fait, c'est surtout une maladie des personnes âgées qui peut aussi, mais plus rarement survenir à un âge plus jeune. Elle est fréquente dans tous les pays tout au moins dans ceux où des études épidémiologiques ont pu être menées. Au cours de ces années, de nombreux travaux, en particulier américains, ont été menés afin d'affiner les critères de diagnostic et définir les indicateurs de sévérité de la démence, indispensable à l'évaluation des premiers traitements. Au cours de ces dernières années, la maladie d'Alzheimer est restée longtemps dans l'ombre et a souffert, tout au moins en France, d'un manque de reconnaissance qui a certainement

limité les moyens mis en œuvre pour faire face au défi douloureux auquel les familles sont confrontées [5].

Les données épidémiologiques de la dernière décennie, ont mis en évidence une forte augmentation de l'incidence de la MA [6]. Selon les prévisions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de malades devrait presque doubler tous les 20 ans pour atteindre 65,7 millions d'ici 2030 et 115,4 millions d'ici 2050 rivalisant avec la prévalence actuelle de l'obésité et du diabète avec des proportions plus élevées dans les pays développés que dans les pays non développés [7].

Au niveau national, les chiffres ne cessent d'augmenter. D'après une étude menée au niveau du Centre hospitalo-universitaire (CHU) Franz Fanon de Blida, la prévalence de la maladie d'Alzheimer chez les patients âgés de 65 ans et plus est estimée à 200 000 cas en 2017 [8]. En revanche, on compte près de 100 000 cas de patients atteints de la MA, en 2004, pour la même tranche d'âge [9].

Au terme de ce survol historique, il apparaît que :

- La distinction entre démence sénile et démence présénile n'a plus lieu d'être;
- Parmi les démences, on distingue les démences dégénératives dont la plus fréquente est une maladie bien individualisée, touchant surtout les personnes âgées : c'est la maladie d'Alzheimer;
- L'identification de cette maladie est une étape essentielle pour la recherche scientifique et médicale mais du point de vue de la prise en charge des malades, l'ensemble des démences pose les mêmes problèmes pratiques [10].

1.2 Définition

La maladie d'Alzheimer (MA) représente la plus commune des démences séniles, c'est une maladie progressive, chronique, neurodégénérative et irréversible. Elle se caractérise par une détérioration progressive de la mémoire et des facultés cognitives conduisant à des répercussions sur les activités de la vie quotidienne [11].

D'un point de vue clinique, elle affecte progressivement et insidieusement les fonctions cognitives du patient (mémoire, langage, raisonnement apprentissage, résolution de problème, prise de décision, perception attention...) aboutissant, in fine, à une perte de l'autonomie. Les

symptômes cliniques sont considérés comme étant liés à l'altération neuronale qui touche principalement l'hippocampe, siège de la mémoire, et les structures néocorticales associatives donnant à la maladie d'Alzheimer son surnom « maladie de la mémoire » [7].

D'un point de vue physiologique, elle implique une cascade complexe d'évènements, caractérisée par la présence entre les neurones de plaques séniles constituées par une accumulation de peptide β amyloïde, et par la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires dans le neurone causé par la protéine Tau hyperphosphorylée anormalement agrégée [7].

La formation de plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaire entraînent progressivement le dysfonctionnement des synapses, des neurones et leur mort fonctionnelle [7].

Les plaques séniles qui sont observées au cours du vieillissement et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) qui sont aussi retrouvées dans d'autres démences dégénératives, ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer. Mais c'est leur association chez un même patient qui est caractéristique de cette maladie, éminemment complexe et spécifiquement humaine.

Cette affection survient tardivement dans la vie, à l'exception de rares cas d'apparition précoce dus à la présence de mutations génétiques familiales [12].

1.3 Différentes formes de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une affection polyfactorielle qui résulte de l'interaction entre un terrain génétique et des facteurs de l'environnement. L'implication des gènes dans la maladie d'Alzheimer est double : d'une part, il existe des formes familiales et d'autre part, dans les formes, de loin les plus fréquentes dites sporadiques, où sont impliqués des facteurs de risque génétique (polymorphisme de l'ADN) [13].

1.3.1 Forme familiale

Environ 5% des cas déclarés de la maladie d'Alzheimer sont dus à l'hérédité [14]. Elle apparaît de manière précoce (<60ans). Sa transmission s'effectue selon un mode autosomique dominant, c'est à dire que la propagation génétique ne touche qu'un sujet sur deux à chaque génération.

La majorité des formes familiales sont causées par des mutations sur les trois gènes suivants :

- Le gène de la Protéine Précurseur de l'Amyloïde (APP) : localisé sur le chromosome 21, Ce gène code pour une protéine glycosylée transmembranaire, dont la forme la plus longue comporte 770 acides aminés, qui contient à la jonction des domaines membranaires et extracellulaires, la séquence correspondant au peptide A β . La mutation APP la plus connue est la double mutation suédoise sur les codons 670/67 [13].
- Le gène Préséniline 1 (PS1), situé sur le chromosome 14, code pour une protéine membranaire de 467 acides aminés comportant 7 à 9 domaines transmembranaires et une grande boucle hydrophile situé entre le 6^{ème} et 7^{ème} domaine transmembranaire. La PS1 fait partie du complexe γ -sécrétase intramembranaire, impliqué dans la production du peptide A β . Depuis la découverte de ce gène, 185 mutations affectant 405 familles ont été rapportées.
- Le gène Préséniline 2 (PS2), situé sur le chromosome 1, présente une forte homologie de séquence en acides aminés (67%) avec le gène PS1. La PS2 fait partie également du complexe de la γ -sécrétase. A ce jour, uniquement 13 mutations faux-sens de ce gène ont été décrites chez 22 familles [13].

1.3.2 Formes sporadiques

Les formes sporadiques représentent 99% des cas, elles sont associées à des facteurs de risque, dont les principaux sont : l'âge, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, les accidents vasculaires cérébraux et le diabète, les femmes et les personnes ayant des antécédents familiaux de démence ont un risque plus élevé. En revanche, un haut niveau d'études, une consommation modérée d'alcool et une consommation régulière de poissons riches en oméga3 fruits et légumes pourraient avoir un effet protecteur vis à vis du risque de démence [13].

À côté des gènes impliqués dans la transmission mendélienne (APP, PS1 et PS2) un quatrième gène impliqué dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer. Il s'agit du gène Apolipoprotéine E (Apo E), situé sur le chromosome 19. Ce gène code pour une protéine de 299 acides aminés et se diversifie sous la forme de trois allèles chez l'homme : ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4. Ces gènes (ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3, ApoE ϵ 4) codent pour trois protéines ApoE isoformes E2, E3 et E4, qui sont responsables du transport et de la redistribution des lipides dans le sang. Les protéines ApoE2 et ApoE3 participent au développement neuronal en apportant les lipides nécessaires à la maturation des neurones. A l'inverse, l'ApoE4 est neurotoxique et provoque un métabolisme de l'énergie cérébrale et les dégénérescences neurofibrillaires [13].

L'allèle $\epsilon 4$ de l'Apo E, découvert à l'origine comme un facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer en 1993 reste de loin la variante de séquence la plus importante favorisant le risque d'apparition tardive de la maladie d'Alzheimer en raison de sa prévalence élevée (35% à 40%) [13].

1.4 Physiopathologie

Selon le consensus international, la MA est une affection polyfactorielle qui s'articule autour de deux types principales de lésions cérébrales: les plaques séniles (PS) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Les hypothèses physiopathologiques de la MA sont fondées sur l'analyse spatio-temporelle des lésions de même que sur la perturbation de l'homéostasie environnementale à proximité de celle-ci. Les processus de formation et d'évolution de ces lésions ont été étudiés au niveau moléculaire pour mettre en évidence les principaux acteurs impliqués, mais ils ne sont pas encore parfaitement élucidés [15].

À partir de données expérimentales, plusieurs hypothèses ont été émises : Il existe particulièrement trois: l'hypothèse cholinergique, l'hypothèse amyloïde et l'hypothèse de la pathologie Tau [15,16].

Ces différentes lésions protéiques mises en évidence sont liées et engendrent la dégénérescence neuronale. On peut citer la présence d'un stress oxydatif permanent, un état d'inflammation continu et la perturbation de l'homéostasie des métaux, cela conduit à un dysfonctionnement mitochondrial [15].

1.4.1 Hypothèse cholinergique

L'hypothèse cholinergique est la plus ancienne et la mieux connue, elle est fondée sur l'atteinte du système cholinergique au cours de la MA. A ce jour, les stratégies thérapeutiques disponibles sont issues de cette hypothèse. Il n'existe d'ailleurs sur le marché quasiment que des médicaments agissant sur le système cholinergique.

Dans le cortex cérébral des patients atteints de la MA, un déficit redondant en acétylcholine a été révélé par des explorations biochimiques. Au cours de temps, les plaques amyloïdes ont été incriminées *in vitro* préférentiellement dans la dégénérescence des neurones du cortex affectant donc la transmission cholinergique. De plus les symptômes neurologiques ont été associés à ce déficit. De nombreuses études visant à restaurer de façon symptomatique cette neurotransmission ont vu alors le jour. Elles ont permis d'identifier une enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE) responsable de dégradation de l'acétylcholine en choline,

comme cible préférentielle. Il en résulte qu'aujourd'hui sur le marché du médicament, quatre inhibiteurs d'AChE composent l'arsenal thérapeutique disponible [17].

1.4.2 Hypothèse amyloïde

L'hypothèse dominante est que les dépôts de peptide A β dans différentes zones cérébrales sont à l'origine de la MA, dont le processus initial est constitué par la formation d'agrégats amyloïdes (le processus spécifique de la maladie) qui contribueraient à la formation des DNF et donc les dommages neuronaux. Cette hypothèse est désignée sous le nom de "cascade amyloïde". L'orientation de la recherche thérapeutique a été dirigée vers la découverte de médicaments capables de stopper les dépôts amyloïdes et donc la formation des DNF [15,16].

Les plaques séniles sont des formations extraneuronales constituées d'un dépôt central d'un peptide amyloïde A β , qui est entouré d'une couronne de débris de prolongements neuronaux. Ce peptide issu du métabolisme d'une protéine membranaire, protéine précurseur de l'amyloïde, APP. À l'état physiologique, le peptide A β est produit à une faible quantité sous forme soluble. Dans la maladie d'Alzheimer, ce peptide se retrouve en grande quantité qui s'accumule sous forme insoluble afin de constituer le cœur des plaques amyloïdes et cela est dû soit à un dysfonctionnement au niveau de sa production (une déviation de métabolisme de l'APP) ou bien au niveau de sa clairance [16].

1.4.2.1 Protéine précurseur de l'amyloïde ou APP

La protéine précurseur de l'amyloïde est une protéine transmembranaire qui présente une forte homologie avec certains récepteurs cellulaires. L'APP est ubiquitaire, on la retrouve dans les membranes plasmiques mais également sur les réticulums endoplasmiques et l'appareil de Golgi. La forme d'APP la plus représentée dans le cerveau est la forme à 695 acides aminés. La partie extracellulaire située du côté N-terminale représente 88% de l'APP695, tant dis que le domaine intracellulaire de l'APP ne représente qu'une partie infime de la molécule. Le peptide A β est le produit du clivage de l'APP. Le segment relatif à la formation du peptide A β est composé d'une partie extracellulaire et d'un segment transmembranaire. En fonction des sécrétases impliquées, le clivage de l'APP induit la production de différents peptides [18].

La protéine précurseur de l'amyloïde est métabolisée selon deux voies biologiques, la voie non amyloïdogénique, la plus commune et la voie amyloïdogénique responsable de la production de A β .

- La voie non amyloïdogénique : représente le processus de maturation qui conduit à la production de fragment N-terminal de l'APP après clivage par α -sécrétase. Cette voie induit la production de peptides qui ont des effets bénéfiques sur le tissu cérébral. D'une part, la coupure de l'APP au milieu de la séquence du peptide A β , ce qui inhibe sa formation. D'autre part, la partie N-terminale de l'APP libérée dans l'espace extracellulaire également appelée sAPP α possède une activité neurotrophique et neuroprotectrice [18].

La partie C- terminale de 83 acides aminés aussi appelée C83 reste fixée à la membrane, elle sera dégradée via la voie lysosomale ou est dégradée par γ -sécrétase ce qui induit à la formation d'un domaine intracellulaire de l'APP (AICD pour APP IntraCellular Domain) et d'un peptide nommé p3 qui sera libéré dans l'espace extracellulaire.

- La voie amyloïdogénique : est le processus de maturation qui conduit à la formation de peptide A β . Elle fait intervenir deux types de sécrétases: la β -sécrétase et la γ -sécrétase. La β -sécrétase clive l'APP du côté N-terminale libérant ainsi une grande partie de la molécule initiale dans l'espace extracellulaire (sAPP β). Le peptide de 99 acides aminés restant (C99) est ensuite clivé par la γ -sécrétase libérant des peptides A β de différentes tailles dans l'espace extracellulaire et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) [18].

La β -sécrétase, aussi appelée BACE1 (β APP Cleaving Enzyme) ou memapsin, est responsable de la quasi-totalité de la production d'A β . Il existe un homologue de BACE 1 nommé BACE2, mais il n'est que faiblement représenté dans le cerveau. L'inactivation de BACE1 inhibe presque totalement la production d'A β [18].

La γ -sécrétase est un complexe multiprotéique qui porte l'activité enzymatique permettant le clivage de l'APP, il est formé par 4 protéines :

Les présénilines 1 et 2, la nicastrine (NCT), Aph-1 et Pen -2. L'inactivation d'une seule de ces quatre protéines provoque une diminution drastique de la production de peptide A β .

La γ -sécrétase peut réaliser deux types de coupures distinctes conduisant à la production de peptides de 40 (A β 40) ou de 42 (A β 42) acides aminés. Cette coupure intervient au niveau de l'insertion de l'APP dans la membrane cellulaire. Lors de la maladie d'Alzheimer la forme A β 42 se retrouve majoritaire et s'agrège plus facilement par rapport à la forme A β 40.

La γ -sécrétase conditionne aussi la longueur des AICD: ils peuvent être composés de 57 (AICD57) ou de 59 (AICD59) acides aminés. Ces peptides joueraient le rôle de facteur de transcription intracellulaire [18].

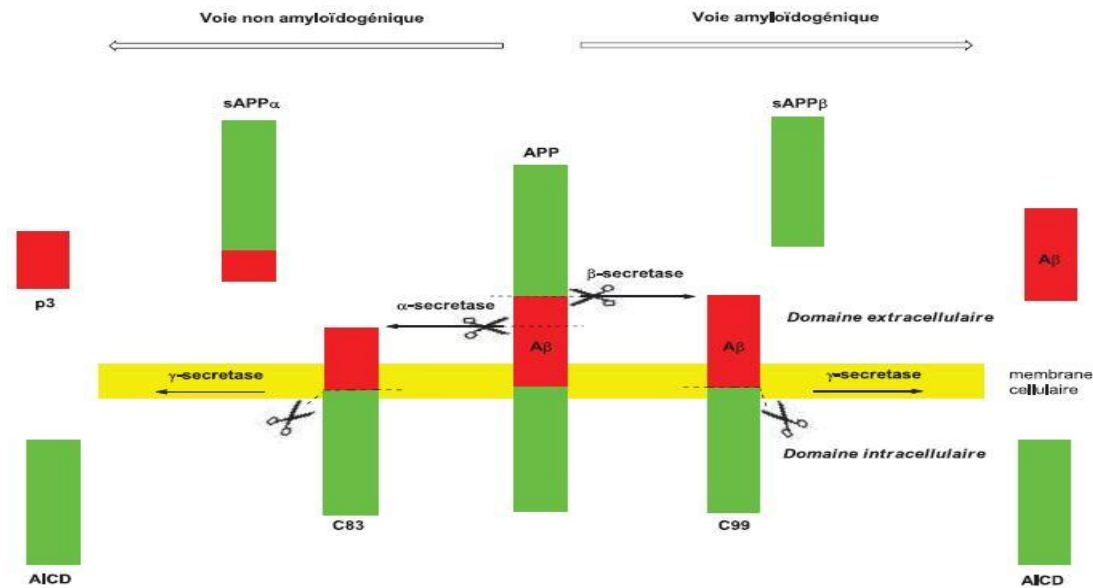


Figure 1: Voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique.

1.4.2.2 Agrégation

L'agrégation du peptide β -amyloïde est au centre de toute l'hypothèse amyloïde. Initialement l'A β est libéré sous forme de monomères solubles de 4 kDa. Sous l'effet de facteurs encore mal connus, ces monomères interagissent entre eux donnant naissance à un large éventail d'oligomères. L'agrégation et l'évolution des formes oligomériques de l'A β mènent à la formation de fibrilles insolubles et à terme à la formation de plaques amyloïdes. Ce processus n'est pas spécifique à l'A β . Il s'agit d'un processus de nucléation et de polymérisation emprunté par de nombreuses molécules "agrégantes" [18].

L'agrégation des peptides A β est sous le contrôle de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à la charge, à l'hydrophobicité et aux propriétés structurales secondaires de la molécule. Le peptide A β présente une forte propension à former des feuilles β -croisées plutôt que des hélices α ce qui le rend prompt à former des agrégats amyloïdes. Les facteurs extrinsèques regroupent les variations de température, pH, stress oxydatif ou encore la concentration de peptides A β qui vont moduler l'intensité de formation des agrégats [18].

Si le processus d'agrégation est considéré comme étant le point le plus important de la cascade amyloïde, il faut noter que le peptide A β peut se retrouver sous différentes formes agrégées dans le cerveau. Pendant longtemps, les formes insolubles d'A β ont été considérées comme étant les formes les plus toxiques à cause de leur forte représentativité dans les plaques séniles, cependant leur implication dans les processus neurodégénératifs est fortement remise en cause [18].

1.4.2.3 Synaptotoxicité

Au cours de la MA, le nombre de synapses est fortement réduit dans les zones de fortes densités en A β oligomériques. Les molécules de signalisation situées au niveau de synapses qui permettent la mise en place des processus de mémoires sont altérées. L'A β induit également une diminution de la libération des neurotransmetteurs présynaptiques et une modification des courants ioniques post-synaptiques, liée à une endocytose des récepteurs du glutamate [18].

1.4.2.4 Atteintes membranaires

L'un des mécanismes de toxicité neuronale de l'A β est l'induction de dommages de la membrane cellulaire. L'A β peut provoquer la formation de canaux ou de pores à travers la membrane plasmique. Cette augmentation de la perméabilité favorise l'entrée d'ion calcium, déséquilibre de l'homéostasie calcique et au final induit l'apoptose des neurones. Ces pores ont pu être mis en évidence dans le tissu cérébral de patients atteints de la MA par microscopie à transmission électronique à haute résolution. De plus, un déséquilibre de l'homéostasie calcique a pu être mis en évidence chez des patients atteints de la MA [18].

1.4.2.5 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un élément majeur (Sultana 2009). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'oxyde d'azote (RNS) sont les acteurs de stress oxydant.

Dans les conditions physiologiques, les mitochondries et la chaîne respiratoire sont la principale source de ROS dans les cellules. La production excessive de ROS au cours de la MA serait donc liée à un dysfonctionnement des mitochondries. L'A β s'accumule à l'intérieur des mitochondries et altère le métabolisme énergétique, la chaîne de transport des électrons, la production d'ATP, la consommation d'oxygène et le potentiel membranaire. Les quantités de radical superoxyde et de peroxyde d'hydrogène augmentent alors considérablement.

La microglie activée est aussi une source importante de production de RNS. Les dommages causés par les ROS et RNS sont nombreux : une peroxydation des lipides membranaires produit des aldéhydes toxiques, l'oxydation de certaines protéines conduit à la formation des dérivés carbonés ou nitrés et une oxydation de l'ADN mitochondrial qui provoque des cassures des brins d'ADN [18].

1.4.2.6 Inflammation

On trouve une forte quantité de cellules microgliales et astrocytaires activées dans le cerveau des patients atteints de la MA, particulièrement à proximité des amas fibrillaires de A β (Wyss- Coray 2002). Conçus à la base comme mécanisme de défense immunitaire du système nerveux, ces deux types cellulaires finissent par participer au développement de la pathologie. Par exemple, la microglie activée réalise un travail de protection en internalisant l'A β et en la dégradant.

Cependant la quantité de A β étant importante dans la MA, la microglie est activée de manière chronique. Elle produit alors un ensemble de chémokines et de cytokines qui vont endommager les tissus environnants. Les chémokines induisent la migration de monocytes du sang périphérique vers les espaces cérébraux à forte densité en plaques amyloïdes. Les cytokines comme l'interleukine 1, l'interleukine 6 et le facteur tumoral de nécrose α (TNF- α) vont induire des lésions sur les cellules endommagées comme sur les cellules saines accélérant ainsi le processus létal. Les astrocytes activés libèrent une série de molécules destinées à combattre l'invasion de l'A β mais qui sont aussi peu spécifiques envers leurs cibles (protéine C-réactive, alpha1-anti chymotrypsine...). Enfin, la microglie activée comme l'A β fibrillaire est capable de stimuler la voie du complément favorisant ainsi l'autolyse des cellules environnantes (McGeer 2001) [18].

1.4.2.7 Action sur la protéine Tau

L'hypothèse amyloïde propose une action du peptide A β sur les modifications de la protéine Tau qui mène à la formation des DNF. Ce mode d'action passe notamment par le stress oxydant causé par le peptide A β . Le stress oxydant favorise l'hyperphosphorylation de Tau et donc favorise le processus d'agrégation de la protéine [18].

1.4.3 Hypothèse de la protéine tau

Elle suggère que la formation d'agrégats intracellulaires de la protéine Tau hyperphosphorylée serait à l'origine de la maladie. L'évolution des signes cliniques concorde plus avec la progression de la pathologie Tau qu'avec la pathologie amyloïde. De plus, cette théorie est également appuyée par le fait que ces lésions sont retrouvées dans de nombreuses autres pathologies à démence. Des traitements basés sur cette hypothèse ont également été développés [19].

1.4.3.1 Protéine Tau

La protéine tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (Microtubulus Associated Proteins, MAP). C'est une phosphoprotéine, de 352 à 441 acides aminés, possédant plusieurs sites de phosphorylation et largement exprimée dans le cerveau. La principale fonction de la protéine tau est de maintenir la stabilité des microtubules (filaments de cytosquelette) au niveau des axones. Elle sert également au transport intracellulaire des organites et à l'organisation spatiale de la cellule. Il existe six isoformes de la protéine tau codées par le gène situé sur le chromosome 17. Ces isoformes diffèrent par la répétition d'un motif particulier, noté R. Trois isoformes répètent le domaine R trois fois et sont appelées 3R, les trois autres le répètent quatre fois et sont appelées 4R. Ces motifs "R" servent de point d'ancrage aux microtubules. L'isoforme "4R" présente une interaction plus forte avec les microtubules en les consolidant et en donnant des prolongements plus longs et plus rigides [20].

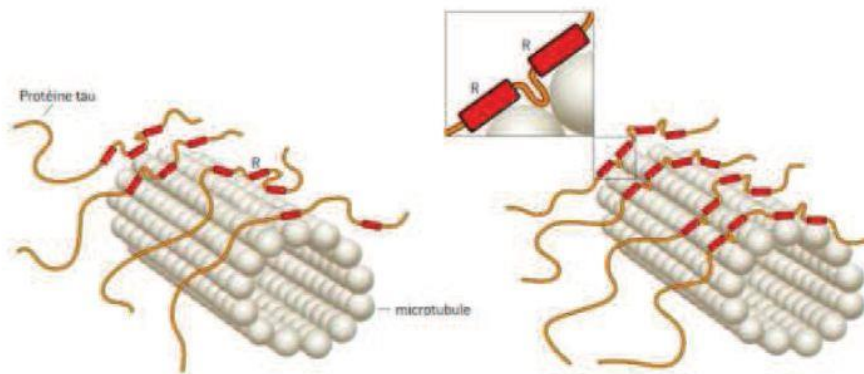


Figure 2: Formes 3R (à gauche) et 4R (à droite) de la protéine tau.

1.4.3.2 Hyperphosphorylation de Tau et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

Dans les conditions physiologiques, l'état de phosphorylation de tau est régulé par différentes protéines kinases et phosphatases. Ces enzymes maintiennent un équilibre qui permet à la protéine tau de réaliser correctement son rôle de gaine par les microtubules. Or, dans la MA, l'activité des protéines phosphatases [Protéines phosphatases 1 et 2A (PP-1 et PP-2)] diminue d'environ 20 à 30 %. Cela crée un déséquilibre en faveur de certaines kinases qui hyperphosphorylent tau. Parmi ces kinases, on peut citer la Glycogène synthase Kinase-3 β (GSK-3 β), la protéine Kinase -5 cycline-dépendante (cyclin-Dependant Kinase 5, CDK5) ou les kinases ERK1/2 associées aux microtubules (Mitogen Activated protein (MAP) kinase ERK1/2), cette hyperphosphorylation conduit tau à se détacher des microtubules et à sa réorganisation sous forme de neurofibrilles torsadées intracellulaires [20].

Par ailleurs, il a été approuvé que certaines kinases (GSK- β , CDK5, ERK2...) peuvent être activées par ApoE et A β pour conduire in fine à l'hyperphosphorylation de tau. Il existe donc un lien étiologique entre la cascade amyloïde et les dégénérescences neurofibrillaires [20].

2 Traitement de la maladie d'Alzheimer

2.1 Historique

Ce n'est qu'au milieu des années 90 que les scientifiques ont eu espoir avec l'apparition des premiers traitements (inhibiteurs d'acétylcholinestérases) contre la maladie d'Alzheimer. À titre de comparaison, la maladie de Parkinson a été décrite en 1817, avec une hypothèse dopaminergique dans les années 1960 et une approche thérapeutique comme la dopathérapie disponible dans les années 1960-1970. Le succès relatif de la dopathérapie dans la maladie de Parkinson a orienté la recherche thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer. En effet, les années 1970 coïncident avec l'hypothèse cholinergique dans la maladie d'Alzheimer, avec l'idée que restaurer les niveaux d'acétylcholine serait aussi efficace que l'effet observé pour la dopamine dans la maladie de Parkinson. La démonstration de la perte des neurones cholinergiques et le lien avec les lésions cérébrales ont conforté cette hypothèse et ont permis aux premiers inhibiteurs d'acétylcholinestérases d'être approuvés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer dans les années 1990 [21].

Actuellement, aucun traitement pharmacologique ne permet de guérir la MA et les maladies apparentées. Ni même permettant d'arrêter son évolution, néanmoins il existe des médicaments qui ont la capacité de ralentir les symptômes de la maladie, tels que la perte de la mémoire, les problèmes de langage et de raisonnement et les difficultés motrices. Ces traitements peuvent améliorer la qualité de vie durant plusieurs années [22]. 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 [23].

2.2 Traitements symptomatiques

2.2.1 Neuroleptiques

Chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer, les troubles de comportement sont très fréquents, les patients se mettent à pousser des cris, s'agitent, deviennent agressif. Cette agressivité présente un danger pour le patient ou pour ses proches. Dans ce cas, le recours des médecins aux neuroleptiques (antipsychotiques) est fréquent malgré l'absence d'indication dans la prise en charge de ces troubles [24].

Cependant, des études ont montré que ces molécules étaient inefficaces lorsqu'elles sont utilisées à long terme et qu'elles exposaient les patients à des effets secondaires importants : risque d'accident vasculaire et surtout la sédation et les problèmes de communication [24].

2.2.2 Antiglutamates

Ces molécules agissent sur les récepteurs du glutamate, substance produite en excès par les cellules nerveuses des malades atteints d'Alzheimer, entraînant ainsi la destruction d'autres cellules, les cellules réceptrices. Une forte concentration de glutamate induit un effet neurotoxique qui se traduit par l'activation des récepteurs (NMDA), cela permet l'influx massif intracellulaires des ions Ca^{2+} induit par les dépôts amyloïdes. La forte concentration de Ca^{2+} induit la production des radicaux libres qui contribuent à la mort des cellules neuronales.

Les antiglutamates bloquent l'interaction du glutamate avec les cellules réceptrices par le blocage de l'entrée des ions Ca^{2+} , ce qui retarde le processus de neurodégénérescence et ralentit la perte de mémoire et le déclin des fonctions cognitives. Cette classe thérapeutique, apparue en 2002, ne contient qu'un seul médicament "la mémantine" (Ebixa) qui est un antagoniste non compétitif des récepteur glutamatergiques. Elle est indiquée chez les patients plus avancés, des stades modérément sévères de la maladie. On note aussi des effets positifs sur les activités quotidiennes et les troubles du comportement. Les vertiges, les courbatures, les maux de têtes et la constipation sont des effets secondaires courants [25].

2.2.3 Vitamine E

Dans le cadre des traitements modifiant l'évolution de la maladie, la vitamine E présente un certain intérêt chez les patients souffrant d'une MA légère à modérée. Une étude publiée en 1997, qui compare la vitamine E (1 000 unités internationales, 2 fois par jour) à la sélégiline (5 milligrammes, 2 fois par jour), à la combinaison des deux et au placebo chez 341 patients, a révélé que la vitamine E (de même que la sélégiline) retarde le temps pour atteindre l'une des quatre issues suivantes : la détérioration sur l'échelle de démence (Clinical Dementia Rating Scale), la détérioration fonctionnelle, l'institutionnalisation ou le décès. Cette étude demeure controversée à certains égards. Cependant, l'innocuité de la vitamine E fait en sorte que de nombreux cliniciens l'utilisent couramment en combinaison avec les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase dans la MA légère à modérée. La dose optimale reste une source de controverse [26].

2.2.4 Inhibiteurs des cholinestérases

Ces médicaments sont les premiers traitements de la maladie d'Alzheimer. Le premier médicament, la tacrine, son usage est limité en raison de sa toxicité hépatique et depuis ont été développés des médicaments de 2^{ème} génération (donépézil, rivastigmine puis galantamine) bien mieux tolérés. Ces traitements indiqués dans les démences légères et modérément sévères [12]. (Voir chapitre II)

2.3 Traitements préventifs de la maladie d'Alzheimer

2.3.1 Antihypertenseurs

Plusieurs études suggèrent que les facteurs vasculaires constituent un facteur de risque vis à vis des démences survenant chez les personnes âgées. Preuve en est que les personnes diabétiques et les sujets victimes d'un accident vasculaire cérébral courent un risque accru (multiplié par 1,9 pour les premiers) de développer une démence. Selon l'étude Syst-Eur, une étude européenne randomisée contrôlée en double aveugle, le traitement de l'hypertension par des inhibiteurs calciques chez des sujets de plus de 60 ans réduit de 60 % l'incidence globale des démences. Un autre essai randomisé incluant un grand nombre de patients (plus de 6000) ayant des antécédents d'AVC révèle que le traitement antihypertenseur (diurétique associé à un inhibiteur de l'enzyme de conversion) conduit à une baisse significative des récurrences d'AVC et de survenue des démences. Ces travaux et d'autres justifient la poursuite des études prospectives randomisées évaluant le bénéfice d'un traitement antihypertenseur et aussi d'un traitement hypolipidémies sur l'incidence des démences chez la personne âgée [12].

2.3.2 Anti inflammatoire non stéroïdiens (AINS)

L'existence d'une réaction inflammatoire au cours de la maladie d'Alzheimer est suggérée par plusieurs observations comme la production de cytokines inflammatoires et la présence de cellules gliales activées autour de la plaque sénile. Il a également été observé que des patients rhumatisants ayant consommé des quantités importantes d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) présenteraient un risque moindre de développer une maladie d'Alzheimer mais il s'agit de données rétrospectives qui n'ont pas été confirmées par des études prospectives [12].

2.3.3 Acides gras et Oméga3

Il est établi que les acides gras polyinsaturés oméga3 sont impliqués dans la physiologie du cerveau qui est exceptionnellement riche en cet acide gras. Plusieurs études épidémiologiques ont montré que de trop faibles concentrations plasmatiques en oméga3 constituent un facteur de risque vis à vis de plusieurs types de démences dont celle d'Alzheimer. Cause ou conséquence, la répartition des acides gras poly-insaturés au sein des phospholipides cérébraux est perturbée au cours de la maladie d'Alzheimer. Ces observations attirent l'attention sur l'importance d'un apport nutritionnel suffisant en acides gras oméga3, en particulier en acide α -linoléique (ALA) et le potentiel de protection de ces lipides, présumés capables de moduler l'inflammation cérébrale, dans la prévention des démences [12].

2.3.4 Substances antioxydants

Les radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire pourraient être impliqués dans la neurotoxicité de la protéine amyloïde, la formation des DNF et la mort cellulaire. Le recours à des substances ayant des vertus anti-oxydantes pour protéger le cerveau et ralentir le processus pathologique au cours de la maladie d'Alzheimer est une piste en cours d'exploration [12].

Mis à part la prise en charge de l'hypertension artérielle, aucun traitement préventif n'a fait encore la preuve de son efficacité. Quelques essais en cours portent sur l'intérêt des omégas3, du *Ginkgo biloba* et de l'association Vitamine E et sélénium [12].

2.4 Perspectives du traitement de la maladie d'Alzheimer

- Le peptide β -amyloïde est présumé jouer un rôle crucial et précoce dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Dès lors, la stratégie visant à prévenir la formation du peptide amyloïde A β 42 constitue l'approche thérapeutique la plus logique puisque cette action préviendrait le déclenchement du processus pathologique. Parmi les approches envisageables, de loin la plus explorée est celle visant à inhiber la voie amyloïdogène qui implique la β -sécrétase puis la γ -sécrétase. Cependant, il s'est révélé plus difficile que prévu de mettre au point des inhibiteurs capables de franchir la barrière hémato-méningée. Plus encore, la complexité de la biologie de la γ -sécrétase incite à la plus grande prudence du fait que l'inhibition de cette activité pourrait également interférer avec les voies de transduction essentielles comme celles de Notch et de récepteurs à tyrosine kinase (RTK) comme Erb4B qui contrôlent le devenir, la différenciation et la prolifération cellulaire. Ces craintes ont été confirmées par des études montrant que des

inhibiteurs de la γ -sécrétase ont des effets délétères sur l'hématopoïèse et le développement des thymocytes. Ces obstacles pourraient être contournés en recourant à une approche de thérapie génique fondée sur l'ARN interférence. Elle supposerait cependant que les lésions aient une diffusion relativement limitée [12].

- Une deuxième approche a priori intéressante serait de stimuler la dégradation du peptide amyloïde par des protéases. Puisque les mécanismes de dégradation et de régulation de la dégradation sont connus et l'implication de la néprilysine (NEP) est confirmée, l'exploration de cette piste semble justifiée. La surexpression de protéases dégradant le peptide A β , comme l'IDE (Insulin Degrading Enzyme) ou la néprilysine dans des souris transgéniques, permet de réduire de manière significative les taux du peptide A β , de ralentir, voire de prévenir, la formation des plaques. D'autres approches consistent à inhiber par des petites molécules l'agrégation du peptide A β ou à stimuler la voie non amyloïdogène. Outre le fait qu'elle prévient la formation du peptide A β , cette voie présente un autre avantage, à savoir la libération du facteur sAPP α , qui est neurotrophique et neuroprotecteur [12].

- Une troisième approche vise à prévenir l'agrégation de la protéine Tau dans les neurones. Les modèles murins avec la protéine Tau mutée développent une DNF. Ils sont des outils indispensables pour découvrir des molécules capables de modifier l'état de phosphorylation de la protéine Tau. Plusieurs molécules comme des kinases (GSK3 β), des modulateurs de kinases (cdk5) et des modulateurs de phosphatases (pin1) sont en cours d'évaluation sur ces modèles murins [12].

Le vaccin par immunisation contre le peptide amyloïde A β 42 est une perspective prometteuse. Plusieurs travaux expérimentaux ont montré que des anticorps anti-peptide A β 42 injectés à des modèles murins transgéniques préviennent la formation et l'accumulation des plaques séniles dans le cerveau. Ces résultats expérimentaux sont à la base du premier essai clinique d'immunisation active contre la maladie d'Alzheimer (essai AN-1792). Un premier essai chez l'homme ayant montré la bonne tolérance de l'immunothérapie, une phase deux internationale a été mise en place en Europe (dont 10 centres en France) et aux Etats-Unis et a concerné au total 375 patients. Cet essai a été suspendu en 2002 en raison de la survenue de cas d'encéphalites d'origine auto-immune [12].

L'impact de la vaccination sur les patients, publié en 2005 dans la revue *Neurology* révèle une amélioration statistique de certaines fonctions cognitives. Pour la première fois, les marqueurs biologiques caractéristiques de la maladie ont reculé chez l'homme, certains patients décédés

à ce jour avaient une réduction des dépôts amyloïdes dans leur cerveau et les chercheurs ont observé une diminution de la protéine Tau, dont les dépôts dans le cerveau marquent la progression de la maladie, dans le liquide céphalorachidien des malades vaccinés. Ce premier essai clinique de vaccination a tourné court mais ses résultats sont néanmoins très intéressants. Selon Jean-Marc Orgogozo, co-auteur de cette étude, « Le concept thérapeutique de la vaccination est validé car les effets observés chez les malades sont proportionnels à leur quantité d'anticorps contre le peptide A β » [12].



CHAPITRE II :
Etude des inhibiteurs des
cholinestérases

Les inhibiteurs des cholinestérases inhibent la dégradation de l'acétylcholine et s'opposent au déficit cholinergique associé à la détérioration cognitive. Plusieurs études contre placebo ont montré un bénéfice sur les troubles de la mémoire et les fonctions cognitives et sur les troubles du comportement, ce qui permet de ralentir la perte d'autonomie du sujet [12].

Dans ce chapitre, nous ferons un bref rappel du neurotransmetteur acétylcholinestérase et ses récepteurs cholinergiques. Après, nous exposerons les deux types de cholinestérase et les caractéristiques structurales de l'AChE et enfin, nous détaillerons les inhibiteurs de cholinestérases.

1 Système cholinergique

Le système cholinergique joue un rôle crucial dans le système nerveux central notamment dans les mécanismes de plasticité neuronale, d'attention, d'apprentissage et de mémoire [27]. En 1914, Henry Hallett Dale présenta l'acétylcholine (ACh) comme un nouveau neurotransmetteur [28]. Ceci a été confirmé en 1921 suite à l'étude de Otto Loewi sur le nerf vague et la régulation des battements du cœur, si bien que le nom qu'il avait attribué à l'acétylcholine à cette époque était la substance vagale (vagusstoff) [29].

1.1 Acétylcholine

L'acétylcholine (ACh) est le premier neurotransmetteur qui a été découvert, au début du XXe siècle. Il est synthétisé par le neurone présynaptique à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A, suite à l'action de la choline acétyltransférase (ChAT). Par la suite, à l'aide du transporteur vésiculaire de l'ACh (VAChT), l'ACh se retrouve dans des vésicules synaptiques. À l'arrivée d'un potentiel d'action, il y a fusion des vésicules synaptiques à la membrane cellulaire et l'ACh est libérée dans la fente synaptique. Il agit ainsi sur les récepteurs cholinergiques. Puis il est rapidement hydrolysé par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) en choline et acide acétique, et la choline immédiatement récupérée par ses transporteurs présynaptiques [30].

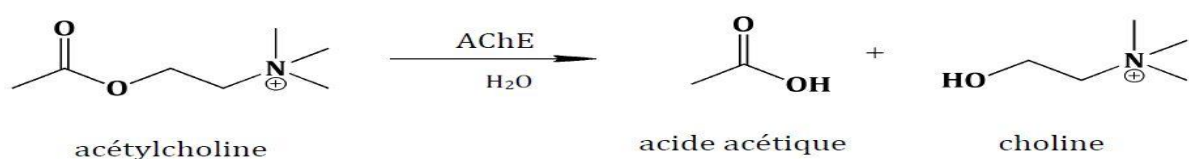


Figure 3: Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine

L'Acétylcholine joue un rôle important dans le système nerveux central et périphérique. Les neurones cholinergiques interviennent dans une variété de fonctions allant des mouvements musculaires de base (muscles squelettiques, lisses ou cardiaques) aux activités cérébrales de plus hauts niveaux tels que la conscience, la mémoire et l'apprentissage [27].

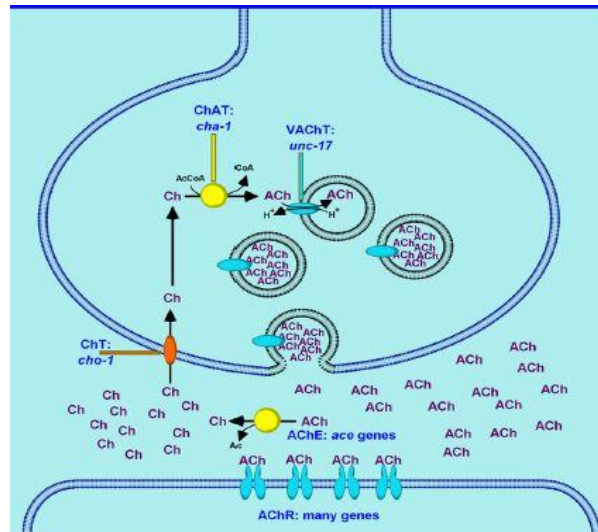


Figure 4: Synthèse et dégradation de l'acétylcholine.

L'ACh agit par sa liaison à deux types de récepteurs, les récepteurs nicotiniques et muscariniques. Ces récepteurs se retrouvent à la fois au niveau des cellules neuronales et non neuronales présentes dans le système nerveux central et périphérique.

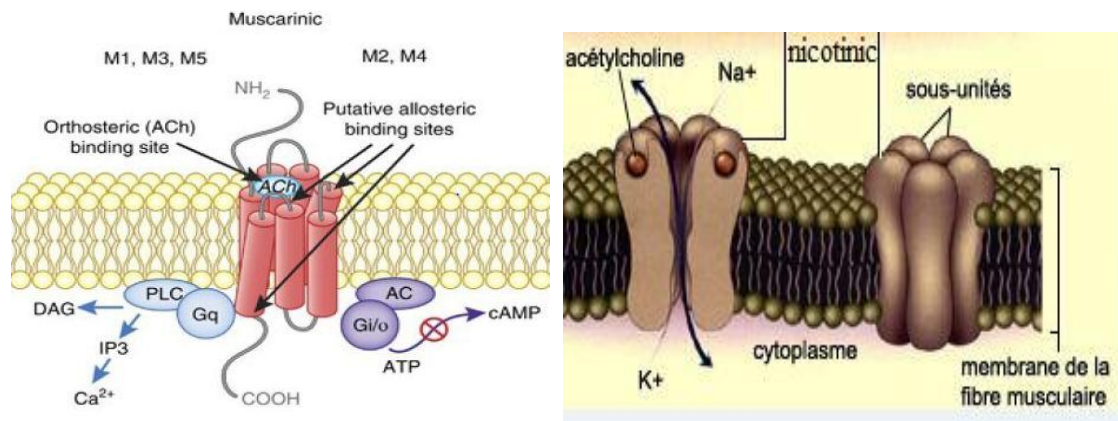


Figure 5: Récepteurs cholinergiques.

- Les récepteurs nicotiniques: sont des récepteurs ionotropes pentamériques transmembranaires, localisés au niveau du SNC, des ganglions (récepteurs N1) et des jonctions neuromusculaires (récepteurs N2) [31].

La fixation de deux molécules d'ACh sur le récepteur entraîne l'ouverture de canaux perméables aux ions sodium Na^+ et/ou potassium K^+ selon le sous-type de récepteur.

L'entrée de cations dans le compartiment post-synaptique crée une dépolarisation de la membrane et une propagation de l'influx nerveux pour les récepteurs N1 ou une contraction musculaire pour les récepteurs N2 [32].

- Les récepteurs muscariniques : sont des protéines membranaires à 7 hélices, appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Par modification de la conformation du récepteur lors de la fixation de l'ACh, la sous-unité α de la protéine G échange son GDP par un GTP, et se détache du complexe formé par les sous-unités β et γ . Lorsque la $G\alpha$ a hydrolysé son GTP en GDP, le complexe récepteur- $G\alpha\beta\gamma$ se reforme [33].

Il existe cinq sous-types de ces récepteurs muscariniques (M 1 - M 5). Les récepteurs M1, M3 et M5 sont couplés à la protéine G de la famille Gq/11 et ont un effet excitateur postsynaptique, résulte de la fermeture des canaux potassiques K^+ par l'activation de la phospholipase C.

Les sous-types M2 et M4 sont liés avec une protéine G de la famille Gi/o. Ces derniers ont un effet inhibiteur présynaptique, résulte de l'inhibition des canaux calciques Ca^{2+} voltage-dépendants par l'activation de Go. Cette inhibition produisant un feedback négatif de la libération de l'ACh. Les récepteurs M2 entraînent aussi une inhibition des nerons postsynaptique par l'activation des canaux potassique (Kir3) dépendants de la protéine G, suite à l'activation de la protéine Gi [34].

1.2 Cholinestérases

Les cholinestérases sont des hydrolases de sérine qui catalysent l'hydrolyse des esters de choline. Différents types de cholinestérases sont traditionnellement distingués sur la base de leur spécificité au substrat. Les acétylcholinestérases (AChE) sont définies par le fait qu'elles hydrolysent l'acétylcholine (ACh) plus rapidement que d'autres esters de choline et qu'elles présentent une petite activité sur la butyrylcholine (BuCh) (ou propionylcholine). Tandis que les butyrylcholinestérases (BuChE), elles sont plus actives sur la BuCh que sur l'ACh. Cependant, ces cholinestérases non spécifiques sont, également, actives sur l'ACh et un certain nombre d'autres esters de la choline [35].

1.2.1 Butyrylcholinestérase (BuChE)

Appelée aussi pseudocholinestérase, plasma cholinestérase ou acylcholine. C'est une α glycoprotéine synthétisée dans le foie. Elle est retrouvée dans le système nerveux central et périphérique, et dans la plupart des tissus [36]. La BuChE humaine a une structure très proche de l'AChE humaine, avec un site catalytique anionique (CAS) et un site périphérique anionique (PAS) reliés par une gorge hydrophobe. Mais, le CAS de la BuChE est plus grand que celui de l'AChE, dû au remplacement de deux phénylalanines par une valine et une leucine, deux résidus plus petits. Elle peut donc accueillir en son sein des substrats plus gros que l'acétylcholine comme la butyrylcholine. Certaines études ont démontrées que certains neurones cholinergiques utilisent la BuChE plutôt que l'AChE pour cliver l'ACh. Ainsi, 10% à 15% des neurones cholinergiques dans l'hippocampe et l'amygdale, expriment la BuChE au lieu de l'AChE. Généralement, chez un sujet sain, la BuChE est 4 fois moins exprimée dans le cerveau que l'AChE, cependant avec la progression de la maladie et la perte des neurones cholinergiques, l'activité de l'AChE chute de 45% tandis que celle de la BuChE augmente 2 fois plus, ce qui influence considérablement le ratio initial [20].

1.2.2 Acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme cholinergique présente principalement au niveau des jonctions neuromusculaires post-synaptiques, en particulier dans les muscles et les nerfs. Elle décompose ou hydrolyse immédiatement l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur naturel, en acide acétique et en choline. Le rôle principal de l'AChE est de mettre fin à la transmission neuronale et à la signalisation entre la synapse pour empêcher la dispersion de l'ACh et l'activation des récepteurs proches [37].

1.2.2.1 Structure tridimensionnelle

La première structure tridimensionnelle d'une AChE résolue fut celle d'une raie du poisson, *Torpedo californica* (Tc). Ce poisson torpille fut choisi pour son organe électrique, lequel lui permet d'assommer ses proies (ou ses prédateurs) en leur délivrant des décharges électriques puissantes (~100 V et ~30 A). Les électrocytes de l'organe électrique fonctionnent un peu à la manière d'une jonction neuromusculaire, l'AChE, qui y joue un rôle prépondérant, elle y est présente en grande quantité. La TcAChE est exprimée sous forme d'un dimère lié à la membrane par un lien glycophosphatidyl-inositol. C'est ce dimère qui a été purifié puis cristallisé [38].

La structure publiée en 1991 était du dimère entier d'AChE. Chaque monomère est constitué de 11 feuillets β et de 15 hélices α . L'extrémité N-terminal présente une portion de feuillet β qui n'interagit pas avec le reste de la structure. Deux hélices α de chaque monomère, dont l'hélice α C-terminale, s'associent pour former le dimère. Le paquet de 4 hélices α (4-helix bundle) participe à la mise en place d'un accollement inter-résidus très stable. La cystéine terminale (Cys537) de chacun des deux monomères établit entre elles un pont disulfure inter-chaines qui stabilisera convenablement cette interface de démérisation.

L'examen plus détaillé de la structure atomique d'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 [39].

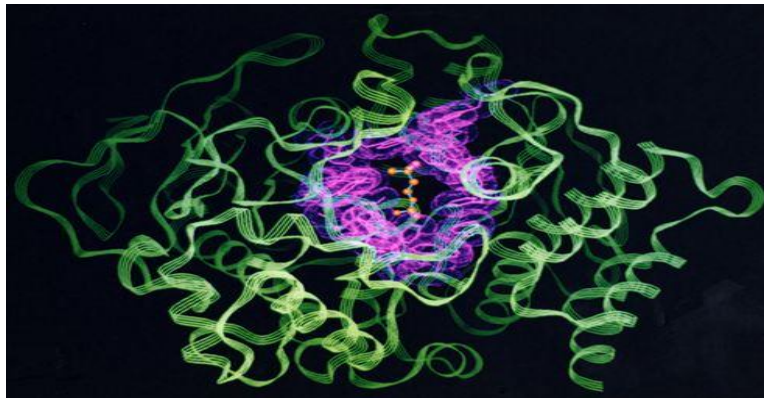


Figure 6: structure 3D de Tc AChE affichée sous forme de diagramme en ruban.

a. Site actif

Le site actif, au sein duquel se trouve la machinerie catalytique, se subdivise en un sous-site estérasique et un sous-site anionique.

- Le site estérasique : correspond au locus au niveau duquel la portion acétyl de la molécule d'ACh se fixe à la Ser200 et forme l'intermédiaire tétraédrique. L'ACh est alors clivée, libérant ainsi la choline et l'intermédiaire enzyme acétylée. Ensuite, la déacétylation aura lieu, elle régénère l'enzyme libre en libérant l'acétate.

L'His440 se comporte comme un catalyseur acido-basique pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique. Grâce à son noyau imidazole, elle établit deux liaisons hydrogène avec la Ser 200 et la Glu327 qui jouent dans cette triade catalytique le rôle de donneur et d'accepteur final de proton respectivement. La Glu32 permet à la fois de polariser l'His440 et de la maintenir dans une orientation favorable à ce transfert.

L'efficacité catalytique remarquable de l'AChE ne provient pas uniquement de sa triade catalytique. Le fond de la gorge, à sa proximité, est en réalité tapissé de résidus utiles à

l'optimisation de la réaction catalytique. Ainsi, la charge négative qui se forme sur l'oxygène du carbonyle de l'ACh au cours de l'acétylation est stabilisée dans une poche nommée trou « oxyanion ». Cette poche est constituée des résidus Gly117, Gly118 et Ala201. De manière analogue, le groupement méthyle du carbonyle de l'ACh (puis de la sérine acétylée) est stabilisé par un ensemble de résidus aromatiques. Il s'agit des résidus Trp233, Phe288, Phe290 et Phe331 qui forment la « poche acyle ». Cette poche assure un rôle essentiel dans la sélectivité de l'AChE pour ses substrats, et qui ne pourra hydrolyser efficacement que les esters pouvant loger leur portion aliphatique [38].

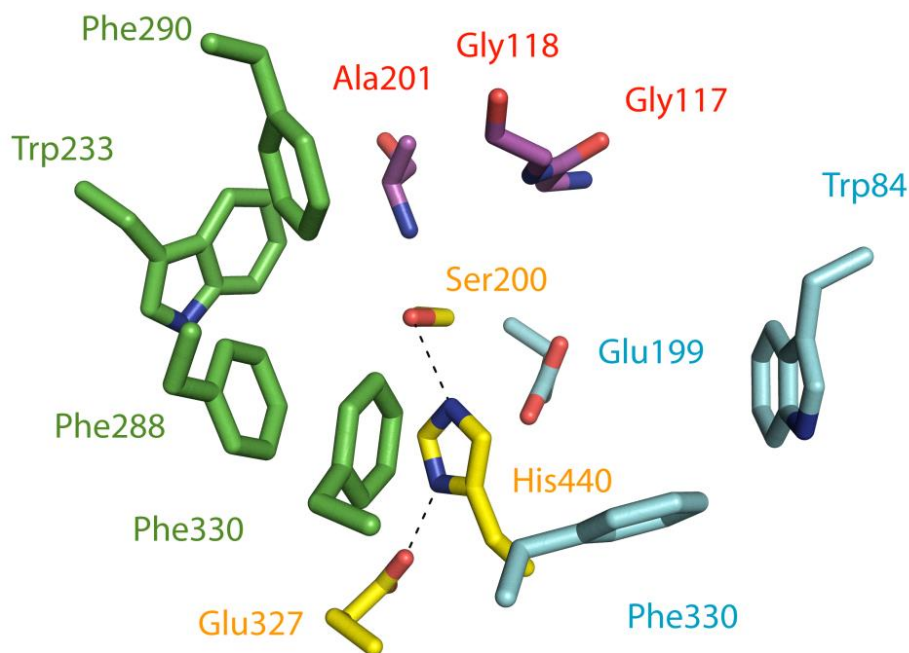


Figure 7: Le site actif de la TcAChE.

- Le site anionique : en face du site estérasique, au fond de la gorge, se situe le site anionique. 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 chargé négativement 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, 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 π 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 plus importants contributeurs à cette énergie de stabilisation [39, 40].

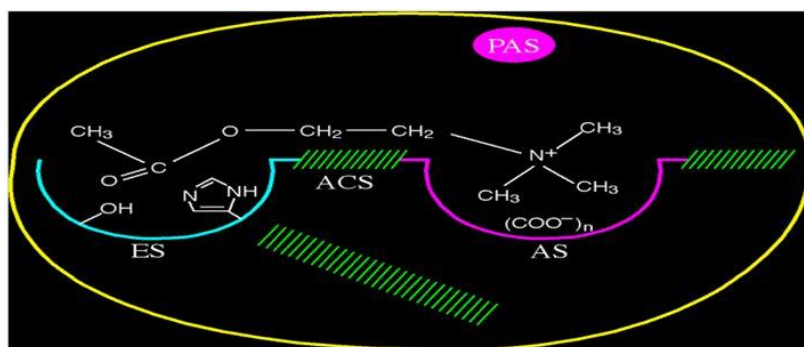


Figure 8: Schéma représentatif du site actif d'AChE.

b. Gorge aromatique

La gorge qui mène au site actif de l'AChE est à l'origine de débats récurrents concernant le fonctionnement de l'enzyme. Sa profondeur est de 20 Å, et les 14 résidus qui la tapissent sont essentiellement de nature aromatique. A mi-hauteur, elle présente un resserrement (bottleneck) au niveau des résidus Tyr121, Phe330 et Phe331. Dans la structure native, l'espace accessible au solvant est d'environ 3 Å. Si la structure était statique, seules des molécules d'eau pourraient traverser la gorge. La flexibilité conformationnelle est donc essentielle au fonctionnement de l'enzyme, en permettant le passage des substrats et des produits, vers et à partir du site actif.

La gorge de l'AChE guide et oriente les substrats. Bien que le mécanisme n'ait pas été confirmé, l'hypothèse d'un guidage électrostatique a toutefois été retenue. Puisque la charge électrique nette de l'enzyme est négative, et compte tenu de la forte dépendance de l'activité de l'AChE à la force ionique, il a été imaginé que la répartition des charges puisse jouer un rôle dans le fonctionnement de l'enzyme. Il a ainsi pu être mis en évidence que l'AChE possède un champ électrostatique parallèle à l'axe de la gorge. Bien que la mutation de 7 des résidus acides à l'origine du champ électrostatique (situés près de l'entrée de la gorge) n'a pas révélé une influence du potentiel électrostatique, des simulations de mouvements browniens ont conforté l'idée d'un guidage électrostatique par la gorge des substrats [38, 40].

c. Site périphérique

Le site périphérique (PAS) est un site de liaison aux substrats et ligands situé à l'entrée de la gorge qui mène au site actif. En effet, le PAS a d'abord été caractérisé par sa capacité à lier des ligands cationiques. Cette dénomination a été en quelque sorte légitimée lorsque fut identifié son résidu le plus important, le Trp279, bien que celui-ci soit absent dans l'AChE du poulet. Le PAS est essentiellement constitué de résidus aromatiques. Par des mesures de cinétique enzymatique combinées à l'utilisation de mutants et de ligands spécifiques du PAS, on a pu identifier en sus du Trp279, les résidus Tyr70, Tyr121, l'Asp72 et la Tyr334. La caractérisation du PAS a été confirmée par les structures des complexes de l'AChE avec le décaméthonium, la fasciculine, le propidium et d'autres inhibiteurs spécifiques du PAS, ainsi que par dynamique moléculaire [38]. Il se lie aux substrats cationiques, notamment aux ligands trop gros pour pénétrer dans la gorge. Il fournit un site de liaison pour les inhibiteurs allostériques [39].

1.2.2.2 Mécanisme catalytique de l'acétylcholinestérase

L'AChE (acétylcholine acétyle hydrolase – EC 3.1.1.7) est une carboxylestérase de type B, appartenant à la famille des sérines hydrolases.

Cette famille comprend, entre autres, la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase. Les sérines hydrolases sont considérées comme des enzymes relativement rapides et efficaces, on y trouvera en effet toujours une poche responsable de la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique, appelée «trou oxyanion », et une autre en charge de la spécificité de substrat, et nommée « poche acyle », dans le cas de l'AChE.

Le mécanisme catalytique des sérines hydrolases (schéma), est le suivant [41,42] :

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

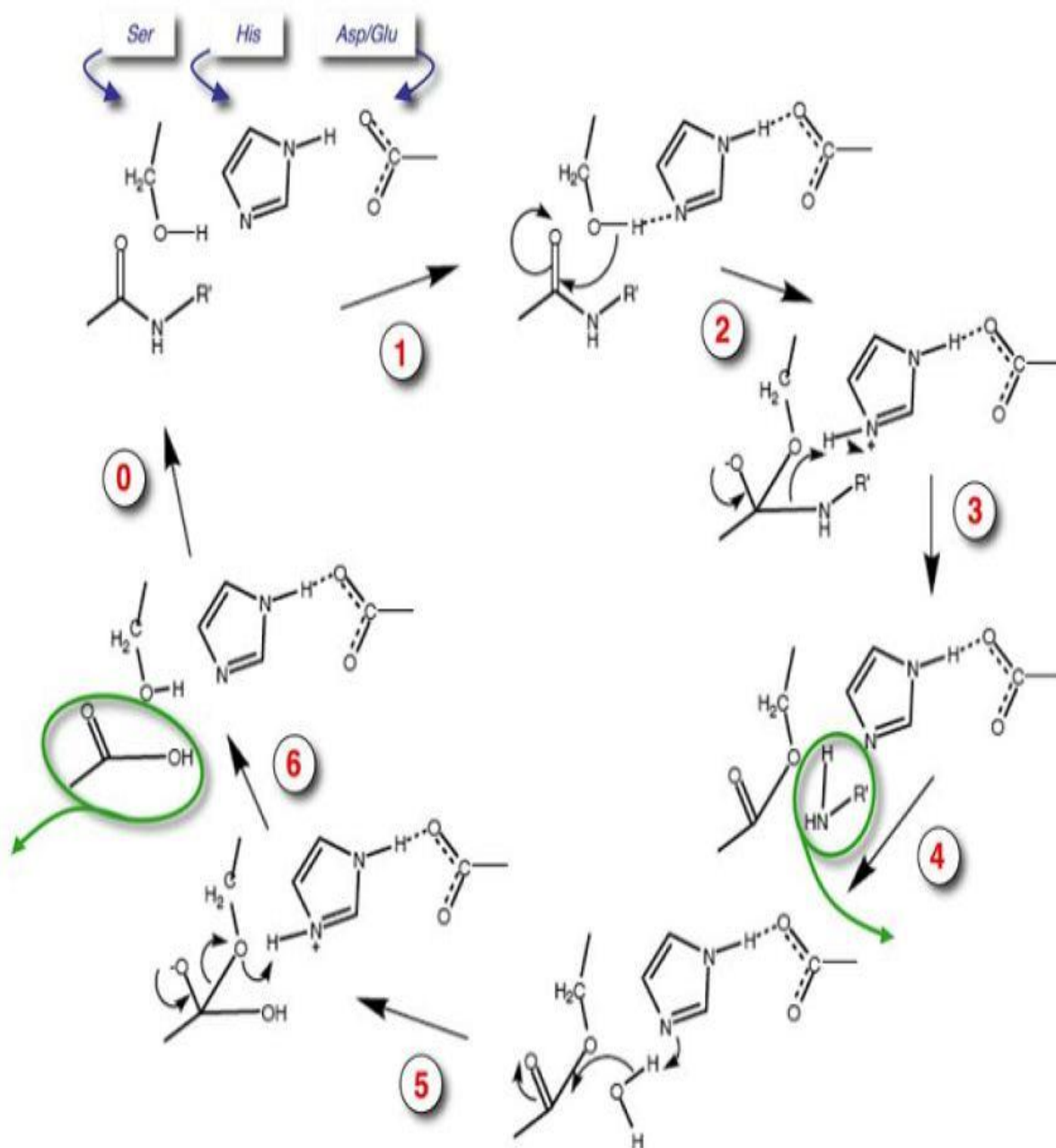


Figure 9: Mécanisme général d'hydrolyse par une sérine hydrolase.

2 Inhibiteurs de cholinestéras

Afin de corriger le déficit de la transmission cholinergique à l'origine de certains troubles cognitifs retrouvés dans la MA, des chercheurs ont préalablement tenté de stimuler de façon directe le neurone post-synaptique cholinergique. Ils ont pour cela développé des molécules agonistes des récepteurs cholinergiques. Les résultats se sont montrés décevants, aussi bien en matière d'efficacité mais aussi de par les nombreux effets indésirables entraînés par la stimulation des récepteurs cholinergiques périphériques. Par la suite, les recherches se sont

orientées vers des agonistes cholinergiques spécifiques des récepteurs centraux, mais là aussi, il n'y avait pas ou peu de bénéfice. Les seules molécules cholinergiques ayant démontré une efficacité dans le traitement de la MA sont les inhibiteurs de l'AChE, qui sont capables de stimuler la transmission cholinergique de façon indirecte [43].

Le mécanisme d'action général des inhibiteurs de cholinestérase est d'empêcher la dégradation de l'ACh dans la fente synaptique, donc l'augmentation de leur disponibilité, par une inhibition de l'enzyme catabolique acétylcholinestérase (AChE).

L'inhibition de l'AChE améliore la neurotransmission cholinergique en prolongeant la présence d'ACh dans la fente synaptique et améliore la possibilité de leur action sur la cellule post-synaptique [44].

Cette approche est limitée aux patients qui ont des neurones présynaptiques intacts et fonctionnellement actifs capables de synthétiser et de libérer de l'ACh. Par conséquent, les AChEIs peuvent être plus utiles dans les premiers stades de la MA et perdent leur efficacité avec le temps. Ils ont montré une utilité thérapeutique claire à la fois sur les performances cognitives, ainsi que sur la qualité de vie de ces patients.

Un grand nombre d'AChEIs a été développé, qui diffèrent entre elles par la sélectivité pour l'AChE et la BuChE, le mécanisme d'inhibition et la réversibilité. Les AChEI peuvent être divisés en plusieurs groupes [45].

2.1 Inhibiteurs réversibles et irréversibles de l'acétylcholinestérase

2.1.1 Inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase

Les organophosphates sont inclus dans ce groupe, sont des esters ou des thiols dérivés d'acide phosphorique, phosphonique, phosphinique ou phosphoramidique.

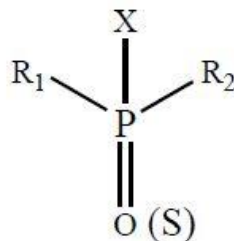


Figure 10: Structure chimique générale des organophosphates.

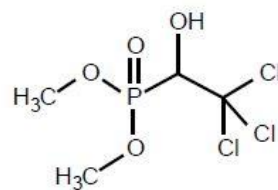
R₁ et R₂ sont des groupes aryles ou alkyles liés à l'atome de phosphore. Le groupe X «groupe partant», peut appartenir à une large gamme de groupes halogènes, aliphatiques, aromatiques

ou hétérocycliques. En médecine et en agriculture, le terme «organophosphates» désigne un groupe d'insecticides et d'agents neurotoxiques qui inhibent l'AChE.

La réaction de l'enzyme avec ces inhibiteurs ressemble à la réaction d'acylation d'un substrat. Mais les dérivés produits ont une durée de vie plus longue que celle de l'acétyl-enzyme. L'inhibition de l'enzyme entraîne une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses neuronales et des jonctions neuromusculaires. Les symptômes typiques d'une intoxication aiguë sont l'agitation, la faiblesse musculaire, les fasciculations musculaires, le myosis, l'hypersalivation et la transpiration. Les intoxications graves peuvent provoquer une insuffisance respiratoire, une perte de conscience, une confusion, des convulsions et / ou la mort [46].

Les composés organophosphorés, donnent un phosphoryl-enzyme, qui ne s'hydrolyse que très lentement ou pas du tout. Certains de ces dérivés peuvent être réactivés par des composés nucléophiles (oximes). Cependant, dans certains cas, le phosphoryl-enzyme subit une réaction dite de "vieillessement", dans laquelle un groupe alkyle lié au phosphore est éliminé. Cette réaction de "vieillessement", conduit à une inhibition irréversible de l'enzyme [47].

Un seul de ces composés pourrait devenir un médicament pour la maladie d'Alzheimer: il s'agit du métrifonate, qui après une activation métabolique donne du dichlorvos. Néanmoins, un dysfonctionnement neuromusculaire avec insuffisance respiratoire et décès a été signalé par la société pharmaceutique et la FDA, et le développement du métrifonate comme traitement de la maladie d'Alzheimer a été stoppé [48].



Métrifonate

Figure 11: Structure chimique de métrifonate.

2.1.2 Inhibiteurs réversibles de l'acétylcholinestérase

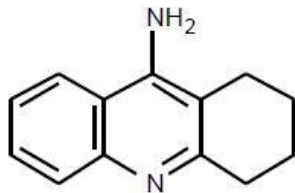
Les AChEIs réversibles interagissent avec l'enzyme près de son site catalytique, sans produire de complexe modifié de manière covalente [45].

2.1.2.1 Tacrine

La tacrine, une aminoacridine considérée comme « la première génération » des inhibiteurs de l'AChE, reçoit en 1993 l'approbation de l'US Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des stades légers à modérés de la MA [43]. Elle est capable d'inhiber l'AChE de façon mixte, réversible, mais non sélective [49].

La tacrine possède une courte demi-vie (de 2 à 3 heures), ceci se révèle être un important handicap qui limite son utilisation, en effet, les conditions de son administration s'avèrent contraignantes avec la nécessité de quatre prises par jour [43].

La tacrine possède de nombreux effets indésirables de type cholinergique et notamment gastro-intestinaux (nausées, vomissements, anorexie et diarrhée) mais le problème majeur est son hépatotoxicité. L'alanine aminotransférase (ALAT) et dans une moindre mesure l'aspartate aminotransférase (ASAT) augmentent généralement environ 6 semaines après le début du traitement chez plus de 25 % des patients. L'élévation des transaminases est dans la majorité des cas asymptomatique, elle se normalise dès l'arrêt du traitement [43]. Son utilisation est largement limitée en raison de son hépatotoxicité [45].



Tacrine

Figure 12: Structure chimique de tacrine.

2.1.2.2 Donépézil

C'est un dérivé de la pipéridine, c'est le deuxième médicament approuvé par la FDA pour le traitement de la MA légère à modérée en 1996. Le donépézil est un inhibiteur d'AChE sélectif, réversible et non compétitif, possède une longue demi-vie (environ 70 heures) et une seule prise quotidienne suffit. Certaines études cliniques ont montré que le donépézil améliore également la fonction cognitive chez les patients présentant des symptômes graves de la MA [45, 46]

Des effets indésirables de types cholinergiques (gastro-intestinaux : nausées, vomissements, diarrhée, anorexie, douleurs abdominales) ont été notés, mais sont moins fréquents que dans

le cas de la tacrine, ainsi qu'une augmentation du tonus vagal cardiaque provoquant une bradycardie [46]. Aucune hépatotoxicité n'a été notée avec le donépézil [43].

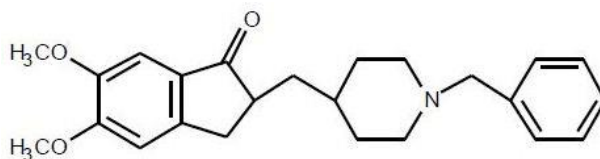


Figure 13: Structure chimique de donépézil.

2.1.2.3 Galantamine

galantamine est un alcaloïde avec amine tertiaire, isolé à partir des plantes faisant partie de la famille des Amaryllidacées. C'est un inhibiteur sélectif, compétitif et réversible de l'AChE [50], et aussi un modulateur allostérique des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, donc augmente la sensibilité des récepteurs nicotiques. La galantamine affecte non seulement la transmission cholinergique, mais également d'autres systèmes de neurotransmetteurs, tels que le glutamate et l'acide γ -aminobutyrique (GABA). C'est un AChEI prescrit pour le traitement de la maladie d'Alzheimer légère et modérée.

Les effets secondaires de la galantamine sont similaires à ceux des autres inhibiteurs de l'AChE, principalement avec des symptômes gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales et anorexie) [46].

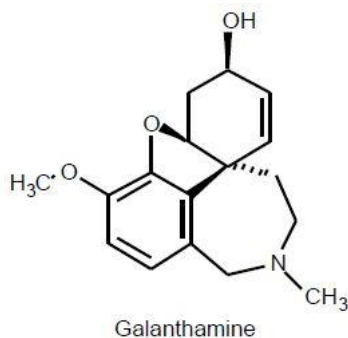


Figure 14: Structure chimique de galantamine.

2.1.2.4 Huperzine A

L'huperzine A est un alcaloïde extrait de la plante médicinale chinoise *Huperzia serrata*. C'est un inhibiteur puissant, réversible et sélectif de l'acétylcholinestérase, et possède des capacités neuroprotectrices avec un degré de toxicité très bas [45,51].

L'huperzine A ayant une utilisation thérapeutique potentielle dans la maladie d'Alzheimer, c'est un médicament approuvé en Chine pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (MA).

Mais aux États-Unis, il est pris comme complément alimentaire pour le soutien de la mémoire, il n'a pas été approuvé par la FDA comme traitement de la MA ou d'autres troubles cognitifs [52].

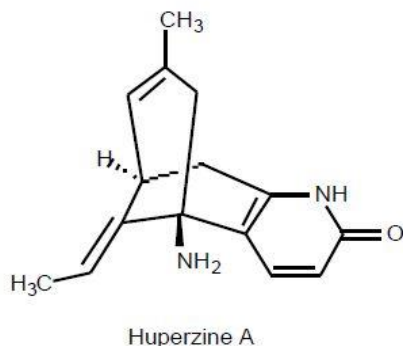


Figure 15: Structure chimique de l'hyperzine A.

2.1.3 Inhibiteurs pseudo-réversibles de l'acétylcholinestérase

Les inhibiteurs pseudo-réversible, appelés aussi lentement réversibles, comprennent d'un groupe de carbamates. Ces composés interagissent avec l'OH-sérine dans la triade catalytique du site actif essentiellement de la même manière que l'ACh. L'enzyme carbamylée résultante est hydrolysée à une vitesse plus lente que l'enzyme acétylée. Le prototype de cette classe est la physostigmine [45].

2.1.3.1 Physostigmine

La physostigmine connue sous le nom d'esérine, est un alcaloïde isolé des graines du haricot calabar, *Physostigma venenosum*. Elle a été le premier ChEI étudié pour le traitement de la MA. Cet alcaloïde possède une activité inhibitrice non sélective, c'est un ligand potentialisateur allostérique (APL), qui peut agir comme un agoniste et un modulateur de faible puissance du récepteur nicotinique.

Malgré ces premiers résultats encourageants, son utilisation a été arrêtée après la fin des essais cliniques de phase III dans la MA, en raison de sa demi-vie courte, de sa biodisponibilité variable et de son index thérapeutique étroit [53].

Des effets indésirables gastro-intestinaux, notamment nausées, vomissements, diarrhée, anorexie, dyspepsie et des douleurs abdominales ont été démontrés avec la physostigmine. Elle n'est pas considérée comme un médicament « approuvable », car le rapport bénéfique/risque a été jugé défavorable [43].



Physostigmine

Figure 16: Structure chimique de physostigmine.

Ces considérations ont stimulé l'intérêt pour la conception de nouveaux inhibiteurs liés à la Physostigmine avec des propriétés pharmacocinétiques améliorées. La suppression de la fonction carbamate dans la physostigmine n'a aucun effet sur la puissance en tant qu'APL, mais cette suppression réduit considérablement sa puissance d'inhibition de l'AChE. Le substituant alkyle carbamoyl azote affecte fortement le profil d'affinité. Une modification utile de la structure de la Physostigmine a été le remplacement du groupe méthyle du fragment carbamate par un groupe alkyle aliphatique ou un groupe phényle. Elle conduit aux dérivés : epastigmine et phenserine [53].

2.1.3.2 Epastigmine

L'epastigmine est un dérivé carbamate de la physostigmine (heptyl-physostigmine). Le groupe carbamoylméthyle de la physostigmine a été remplacé par un groupe carbamoylheptyle. Ce composé est moins toxique que la physostigmine avec une activité inhibitrice plus puissante pour la BuChE, et une durée d'action plus longue (La demi-vie moyenne de récupération de l'AChE était d'environ 10h) [53,54].

L'epastigmine améliore la performance cognitive. Il est bien toléré et les effets indésirables cholinergiques sont d'intensité légère à modérée. Mais il y a un effet indésirable hématologique (granulocytopénie) associé au traitement par l'epastigmine, cet effet a conduit à la suspension d'autres essais cliniques [53].

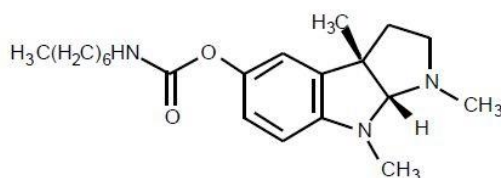


Figure 17: Structure chimique d'epastigmine.

2.1.3.3 Phenserine

La phenserine est un dérivé phényl carbamate de la physostigmine, c'est un inhibiteur sélectif et non compétitif de l'AChE. Ce carbamate possède deux mécanismes d'action dans le traitement de la MA, c'est un inhibiteur de l'AChE et de la protéine précurseur β -amyloïde (β -APP). [53,55].

La phenserine montre une toxicité plus faible et une amélioration significative des performances cognitives par rapport à la physostigmine dans les études précliniques, avec une demi-vie supérieure à 8 h. Son énantiomère, posiphen, n'a pas l'action inhibitrice de l'AChE, mais possède l'équipotence sur la réduction de la production d'APP et d'A β . [55,56].

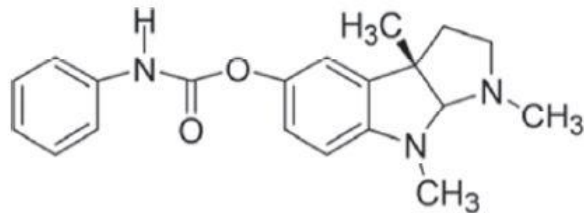
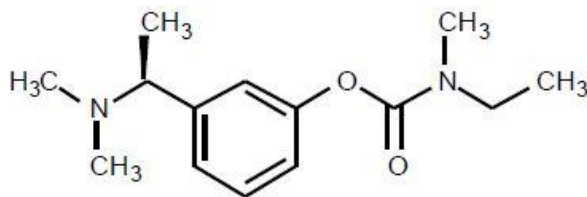


Figure 18: Structure chimique de phenserine.

2.1.3.4 Rivastigmine

C'est un dérivé miotine de la physostigmine, elle représente un inhibiteur de l'AChE pseudo irréversible et non compétitive, mais moins puissante que la physostigmine. Cependant, elle a une durée d'action plus longue, d'une bonne tolérance et d'une toxicité plus faible. La rivastigmine inhibe à la fois l'AChE et la BuChE avec une sélectivité significative du système nerveux central. C'est la seule ChEI avec une inhibition significative de la BuChE. [53, 54,55]

La rivastigmine améliore les fonctions cognitives, la participation aux activités quotidiennes et les troubles du comportement chez les patients atteints de MA légère à modérée. Les effets indésirables comprennent nausées, vomissements, diarrhée, anorexie, maux de tête, une syncope, des douleurs abdominales et des étourdissements, le plus souvent, ils sont légers à modérés, de courte durée et sensibles à la réduction de la posologie. La rivastigmine a été approuvée par la FDA pour le traitement de la MA légère à modérée en 2000. [46, 53, 56]



Rivastigmine

Figure 19: Structure chimique de rivastigmine.

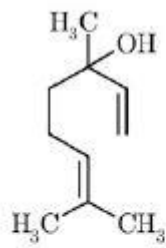
Actuellement, quatre inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChEIs) approuvés par la Food and Drug Administration des États-Unis pour le traitement de la MA sont la tacrine, le donépézil, la rivastigmine et la galantamine, qui sont indiqués dans le traitement symptomatique de la MA dans ses formes légères à modérées. Cependant, la tacrine est rarement utilisée en raison de son hépatotoxicité [57].

2.2 Antiacytélinestérase dérivé des plantes

De nombreuses études ont été menées afin de développer de nouvelles molécules inhibitrices de l'AChE à partir de produits naturels. En conséquence, un certain nombre de plantes utilisées comme activateur de mémoire ont été testées pour leur activité anticholinestérasique. D'autres études ont montré que certains composés phytochimiques possèdent une activité inhibitrice potentielle de l'AChE et de la BuChE comme les alcaloïdes, les terpènes, les stérols, les flavonoïdes et les glycosides.

Parmi les familles ayant des composés pouvant être utilisés comme inhibiteurs de cholinestérases, nous citons Buxacées, Amaryllidacées (contient la galantamine) et Lycopodiacees (contient l'huperzine A) [58].

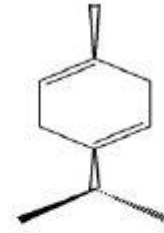
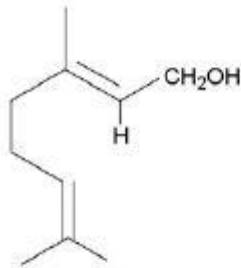
La majorité des monoterpénoïdes inhibent l'enzyme acétylcholinestérase. La fenchone, le γ -terpinène, le géraniol et le linalol ont montré une inhibition compétitive réversible de l'enzyme. La S-carvone, l'estragole et le Camphre ont produit une inhibition mixte pour cette enzyme. Aucune inhibition de l'enzyme par l'E-anéthole n'a été observée. La fenchone, la S-carvone et le linalol ont produit l'inhibition la plus élevée [59].



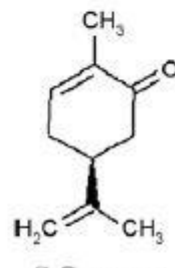
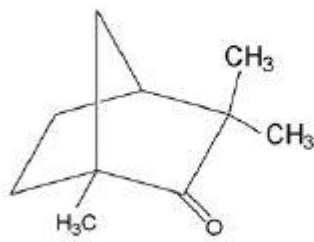
Linalool



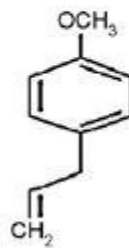
Camphor

 γ -Terpinene

Geraniol

*S*-Carvone*E*-Anethole

Fenchone



Estragole

Figure 20: Structure chimique de certains monoterpénoïdes.



CHAPITRE III :
Docking moléculaire

1 Modélisation moléculaire

Le développement important au cours de ces dernières années des moyens informatiques a permis à la chimie de s'enrichir d'outils informatiques spécialement dédiés à la représentation des molécules. Ainsi, que ce soit avec des superordinateurs ou de simples ordinateurs de bureau, tout chimiste peut aujourd'hui faire une étude plus ou moins exhaustive et précise des systèmes moléculaires grâce à la modélisation moléculaire [60].

On définit la modélisation moléculaire comme une application des méthodes théoriques et de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique [61]. Elle a pour but de prédire la structure et certaines propriétés chimiques de molécules ou de systèmes de molécules. C'est une technique permettant non seulement de représenter les propriétés et les réactions chimiques, mais aussi de manipuler les modèles des structures en deux ou trois dimensions [62].

Elle est utilisée pour simuler des systèmes moléculaires en utilisant des méthodes de calculs théoriques telles que la mécanique quantique (QM), la dynamique moléculaire (DM), la mécanique moléculaire (MM) et, depuis quelques années, l'association QM/MM qui paraît très porteuse [63]. Parmi les méthodes de la modélisation moléculaire, on trouve l'amarrage moléculaire (docking) [64].

2 Docking moléculaire

2.1 Définition

Le docking ou l'amarrage moléculaire décrit un processus dans lequel une molécule (ligand) est placée dans le site actif d'une protéine cible dans un espace tridimensionnel (3D).

Deux aspects sont importants : la prédiction de l'affinité du complexe [ligand- protéine], et la prédiction de la position correcte du ligand dans le site actif de la protéine. La prédiction de l'affinité est liée à différents ligands de la série, certains conviennent mieux que d'autres. La prédiction de position est liée à la même molécule de ligand mais dans des orientations différentes [65].

Le but principal de l'amarrage moléculaire est de simuler par ordinateur le processus d'identification moléculaire et d'obtenir une conformation optimisée de manière à minimiser l'énergie libre du système global [66].

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes complémentaires : le docking et le scoring.

- Le Docking est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- 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 [67].

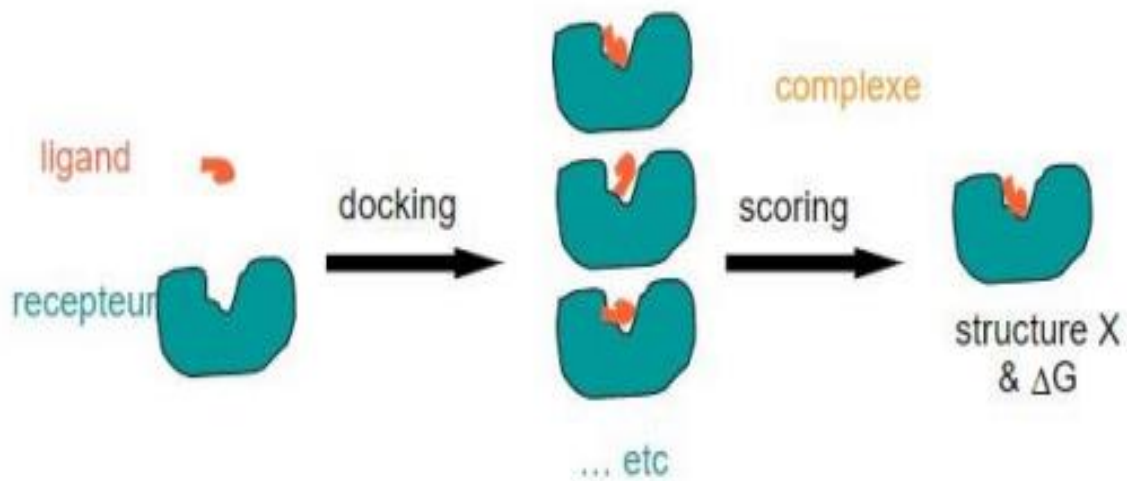


Figure 21: Schématisation de l'amarrage moléculaire.

Deux catégories de docking peuvent être établies selon la manière dont la flexibilité des molécules est traitée au cours de l'échantillonnage.

2.2 Docking rigide

Au cours du docking rigide, la protéine et le ligand sont tous deux traités comme entièrement rigides. Ainsi, seuls les degrés de liberté translationnels et rotationnels du ligand relativement au récepteur sont explorés. Cette simplification s'apparente à considérer un modèle de liaison de type "serrure-clé" où ni le ligand ni le récepteur ne subissent de réarrangements conformationnels suite à leur interaction [66].

Le docking rigide est généralement employé pour l'amarrage entre deux macromolécules (docking protéine-protéine ou protéine/acide nucléique structuré) pour lesquelles les degrés de

liberté sont trop importants pour réaliser un échantillonnage conformationnel efficace dans des temps de calculs raisonnables [66].

2.3 Docking flexible

Le docking flexible considère à la fois la flexibilité du ligand et du récepteur. Les degrés de liberté conformationnels de ce dernier peuvent être limités à certaines chaînes latérales ou bien considérés également des mouvements plus larges impliquant par exemple les différents arrangements possibles entre domaines d'une protéine. Ce type de docking représente une approche plus réaliste en considérant des modèles de liaison du ligand au récepteur de type ajustement induit et/ou la sélection conformationnelle. En revanche, l'exploration de l'ensemble des degrés de liberté du ligand et du récepteur implique des difficultés importantes liées au temps de calculs nécessaires pour exploiter le docking flexible efficacement [66].

2.4 Docking semi-flexible

Dans le docking semi-flexible, le ligand est flexible et la protéine est rigide, l'échantillonnage des degrés de liberté du ligand s'ajoute aux explorations translationnelles et rotationnelles. Ce type de docking repose sur l'hypothèse que la conformation du récepteur utilisée est apte à reconnaître le ligand. Il est "asymétrique" et généralement utilisé pour l'amarrage protéine-ligand. Les approches de docking semi-flexible ou flexible sont plus généralement appliquées à la modélisation d'interaction entre protéines et ligand [68].

2.5 Principes du docking moléculaire

Le problème majeur pour l'étape de docking est de parcourir le mieux possible l'espace conformationnel. La complexité de ce problème est en fonction du nombre de degrés de liberté, de translation, de rotation en plus des conformations de départ possibles du ligand. Afin d'éviter des calculs que les machines ne peuvent résoudre ou seulement dans des temps bien trop importants, plusieurs approximations sont possibles. Les algorithmes de recherche de la flexibilité du ligand peuvent se classer en trois principes, nommés combinatoire, stochastique et déterministe [69].

2.5.1 Approche combinatoire

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

degrés de liberté. Pour cela, des critères de fin sont imposés pour éviter à l'algorithme de parcourir des portions de l'espace qui ne mèneraient qu'à de mauvaises solutions. Dans un premier temps le ligand est découpé en parties rigides et flexibles. Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs « ancrés » rigides sont définies, ensuite une première partie rigide est mise en interaction avec le récepteur puis les parties flexibles sont ajoutées de manière successive avec une exploration des angles de torsion. Le plus important est le choix des fragments de base à placer en premier dans le site car il est très difficile pour les algorithmes de compenser une mauvaise position initiale. Les différentes implémentations changent selon la manière dont le premier segment rigide est placé dans le site et dans les procédures d'élimination quand le nombre d'angles de rotation augmente. Nous supposons que la position du segment rigide de départ ou ancre fait partie des n positions de plus basse énergie possible. Le nombre n détermine la largeur de l'arbre de recherche. Cette hypothèse peut s'avérer être un biais dans le cas de petits segments 'ancres' car ceux-ci sont susceptibles de s'adapter à de nombreux endroits à la surface du récepteur entraînant la construction de branches sans intérêt [69].

Cette méthode a été incorporée dans plusieurs programmes dont Dock et FlexX. Le programme FlexX positionne l'ancre à partir d'une modélisation des interactions chimiques et effectue une sélection automatique des fragments de base. Les fragments sont ajoutés de manière incrémentale. Chaque angle possible est construit et les angles qui produisent des recouvrements avec le récepteur ou des conflits internes sont rejetés. A chaque ajout, le calcul de l'énergie est pratiqué et les molécules partiellement construites sont classées. Cette procédure est répétée jusqu'à la construction complète de la molécule [69].

2.5.2 Approche stochastique

L'approche stochastique consiste à effectuer des changements aléatoires dans la structure tridimensionnelle du ligand. Habituellement, il s'agit de modifier un degré de liberté à chaque fois. L'un des points faibles de cette méthode est l'incertitude de convergence. Pour l'éviter, il faut multiplier les calculs, indépendamment les uns des autres. Un des principaux algorithmes stochastiques est la méthode de Monte Carlo [70].

2.5.3 Approche déterministe

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

minimum local car leurs capacités à surmonter des barrières énergétiques sont faibles. Il s'agit de l'approche la plus simple et la plus directe [71].

2.6 Processus de scoring

2.6.1 Principe

Les résultats du docking consistent le plus souvent en différentes poses du ligand dans le site d'interaction, correspondant à plusieurs conformations favorables que le ligand peut adopter [72].

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. Le principe thermodynamique est le suivant [73] :

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

Concrètement, le score est une estimation de la puissance d'interaction et l'affinité de liaison entre deux molécules après avoir été passées par l'étape de docking. Il n'est donc pas réaliste de corréler une activité mesurée avec la valeur d'un score. Il est plus judicieux d'établir une corrélation des constantes d'inhibition K_i avec les scores in silico. Une mauvaise corrélation entre les affinités expérimentales et les scores ne signifie pas pour autant que la fonction de scoring est mauvaise. En effet, les molécules dont on connaît les affinités mesurées expérimentalement ne couvrent qu'un très faible intervalle de score comparé au large intervalle proposé par une fonction de scoring. L'utilisation des fonctions de scoring est double. Tout d'abord, elles permettent de déterminer la conformation qui représentera au mieux le ligand concerné. Cette conformation est appelée « première pose ». L'autre utilisation des scores est de pouvoir classer les premières poses de chaque ligand afin d'établir un classement final des molécules les plus prometteuses [73].

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

Nous avons utilisé dans cette étude principalement les fonctions de scoring provenant du module C-Score. Celui-ci compte cinq fonctions de scoring dont FlexX Score, Chemscore, PMF score, Dock Score et Gold Score [73].

2.6.2 Familles de fonctions de scoring

Les fonctions de scoring peuvent être classées dans quatre grandes catégories : les fonctions empiriques et les fonctions basées sur la connaissance (encore appelées « knowledge-based »), fonctions de score basées sur les champs de force et fonctions de score consensus [73].

Ces quatre classes de fonctions sont basées sur un ensemble de complexes ligand-protéine. Elles ont donc la faiblesse de ne pouvoir prédire que des interactions qui ne dévient pas trop de celles ayant été répertoriées dans les complexes étudiés [73].

2.6.2.1 Fonctions de scoring empiriques

Ces fonctions calculent directement l'affinité en utilisant des termes représentant l'interaction [64] (liaison hydrogène, contact hydrophobe, interaction ionique, surface de contact, chaque terme est déterminé par des méthodes de régression multivariées appliquées à un ensemble d'apprentissage. Les scores provenant de FlexX, DOCK, GOLD et Chemscore sont issus de fonctions de type empirique. Cinq principaux critères justifient le choix d'une fonction :

-L'exactitude, c'est-à-dire qu'une fonction de scoring doit proposer une précision acceptable dans un contexte défini.

-Le domaine d'application : il doit être assez étendu pour pouvoir permettre de prédire des composés par interpolation et extrapolation. Le modèle prédictif ne doit pas être trop restrictif.

Des méthodes linéaires permettent généralement d'obtenir un modèle capable d'extrapoler et d'interpoler. Les modèles issus de méthodes non linéaires (réseaux de neurones par exemple) ont parfois l'inconvénient de trop suivre les points ayant servi à leur élaboration et sont donc incapables d'interpoler et d'extrapoler [73].

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

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

différentes les unes des autres. Toutefois, cette faiblesse peut être améliorée en élargissant les bases de données de complexes récepteur-ligand mais également en utilisant des méthodes de validation croisée afin de s'assurer que les coefficients de corrélation sont stables [73].

-La vitesse à des fins de criblage virtuel : les fonctions de scoring doivent être suffisamment rapides pour être appliquées au criblage virtuel. Toutefois, le facteur limitant n'est pas les fonctions de scoring mais le processus de docking [73].

-L'interprétation physique : il est souhaitable que le nombre de termes employés dans la régression soit le plus faible possible. L'ajout d'un nouveau terme doit faire la preuve d'un véritable bénéfice. Ceci est nécessaire pour obtenir une équation simple, facilement interprétable de manière physique [73].

2.6.2.2 Fonctions de type knowledge-based

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

Cette alternative aux fonctions empiriques est plus tolérante quant aux interactions présentes au sein du complexe. Leurs expressions sont moins strictes que dans le cas des fonctions empiriques. La fonction PMF et Drug Score fait partie de cette classe de fonction [73,74].

2.6.2.3 Fonctions de score basées sur les champs de force

Les fonctions de score basées sur un champ de force qui est une fonction mathématique exprimant l'énergie d'un système par la somme de divers termes issus de la mécanique moléculaire. L'utilisation de champ de force permet de calculer l'énergie d'interaction du complexe récepteur-ligand (interactions intermoléculaires) et l'énergie interne du ligand. Les interactions entre récepteur et ligand comprennent souvent des termes de Van der Waals et électrostatiques [75,76].

Parmi les fonctions de score qui se basent sur les champs de force les plus rigoureux, nous avons comme exemple AMBER et CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) [77,78].

2.6.2.4 Fonctions de score consensus

Les fonctions de score consensus, combinent les informations obtenues à partir des différents scores, afin de compenser les erreurs des fonctions de score individuelles. Plusieurs études ont montré que ces fonctions performant le calcul des énergies libres des complexes et ainsi les interactions protéine - ligand mieux que les fonctions individuelles. Un exemple de fonction de score consensus est X-CSCORE qui combine un PMF et ChemScore [73,76,79,80,81,82].

2.6.3 Description des fonctions de scoring utilisées

2.6.3.1 Fonction de scoring DOCK

Dock-Score, élaborée par Kunst, dérive directement du champ de force AMBER39. Cette fonction est composée de deux termes électrostatique et stérique.

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

Où E est l'énergie dépendante de la distance (d) entre deux points susceptibles d'interagir [73].

- Forces électrostatiques : ce sont des interactions électrostatiques courantes qui se produisent lorsque les molécules portent des charges.
- Forces stériques : les molécules sont proches, ce type de forces apparaît et affecte la réactivité chimique.
- Forces de réaction du solvant : le ligand et/ou la protéine sont tous deux affectés par les molécules de l'environnement qui se trouvent dans le solvant, de sorte que des réactions chimiques peuvent se produire créant de telles forces [74].

2.6.3.2 Fonction de scoring GOLD

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

$$\text{Gold-Score} = E_{\text{liaison H}}(d, \alpha) + E_{\text{stérique}}(d) + E_{\text{Van der Waals}}$$

Les deux premiers termes (énergie de liaison hydrogène et stérique) sont pondérés par la distance entre les deux entités appartenant au ligand et au récepteur. L'énergie de liaison hydrogène est également pondérée par l'angle entre les deux entités. Des pénalités sont

apportées lorsque la liaison ou le contact stérique sont en dehors d'un certain angle ou d'une distance fixée [73].

2.6.3.3 Fonction de scoring FlexX

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

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

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

Plus l'écart entre la géométrie de la liaison observée et la géométrie idéale est important, plus le terme est pénalisé et moins son énergie ΔG sera importante. Le terme lipophilique évalue les contacts atomiques entre la protéine et le ligand (interactions favorables hydrophobes et contacts déstabilisants) [73].

2.6.3.4 Fonction de scoring Chemscore

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

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

L'énergie de liaison hydrogène est pondérée par la distance et l'angle entre les entités « donneur » et « accepteur ». Le terme correspondant à la liaison du ligand avec un métal est pondéré par la distance entre l'atome du ligand et le métal [73].

2.6.3.5 Fonction de scoring PMF

PMF (Potential Mean Force) est une fonction basée sur la connaissance (knowledgebased) mise au point par Muegge. Cette approche exploite l'information structurale de développement d'une fonction de scoring empirique rapide pour estimer l'affinité de liaison

des ligands dans les complexes récepteurs extraite de la Protéine Data Bank et la convertit en énergie libre d'interaction entre paires d'atomes protéine-ligand. Les effets entropiques, enthalpiques et de solvation sont traités de manière implicite. Une étude comparative sur les algorithmes de docking et les fonctions de scoring met en évidence que PMF est une fonction qui fonctionne bien dans le cas de cavité très polaires. Nous verrons plus tard que ceci peut être une explication de la défaillance de PMF dans nos deux projets, dont le site actif est majoritairement à tendance lipophile [73].

2.7 Logiciels de docking

Le docking moléculaire a pour objectif essentiel de prédire la conformation la plus favorable du ligand au sein de son récepteur. Initié au début des années 1980, ce domaine s'est développé pour devenir de nos jours un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs. A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaire (commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités dans le tableau ci-dessous [82] :

Tableau I: Exemples de logiciels de docking

Programme	Traitement du ligand	Recherche conformationnelle	Algorithme de recherche	Fonction de score
AutoDock	Flexible	Stochastique	Génétique	Basée sur les champs de force
Dock	Flexible	Systématique	Fragmentation / reconstruction	Basée sur les champs de force
FlexX	Flexible	Systématique	Fragmentation / reconstruction	Basée sur les connaissances
FRED	Rigide	Systématique	Recherche exhaustive	Basée sur les connaissances
Glide	Flexible	Stochastique	Monte Carlo	Empirique
Gold	Flexible	Stochastique	Génétique	Basée sur les champs de force
ICM	Flexible	Stochastique	Monte Carlo	Basée sur les champs de force
Surflex-Dock	Flexible	Systématique	Hammerhead modifié	Empirique
PRO LEADS	Flexible	Stochastique	Tabou	Empirique

2.8 Applications

Il y a deux principales applications du programme de docking. La plus ancienne est la prédiction du mode d'interaction. La seconde consiste à optimiser des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer les performances

des différents programmes de docking pour chaque application. L'aptitude d'un algorithme à trouver l'emplacement correct du ligand par rapport à son récepteur est habituellement déterminée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (root-mean-square déviation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal. La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate. En général, les erreurs de docking sont dues à un échantillonnage insuffisant ou à une fonction de score inadéquate [83,84,85].

3 Principales interactions moléculaires

3.1 Liaisons hydrogène

Sont des interactions d'origine électrostatique entre un atome électronégatif dit "accepteur " (charge partielle δ^-) et un atome d'hydrogène polaire (charge partielle δ^+) qui est lié à un atome électronégatif dit "donneur" (charge partielle δ^-) d'une façon covalente. Elles agissent à très courte distance (0.8 à 2.8 Å) [86].

Ces liaisons jouent un rôle crucial dans le repliement protéique, les changements conformationnelle et la reconnaissance protéine/ ligand, elles affectent les propriétés physico-chimiques des molécules notamment la perméabilité membranaire et la solubilité qui sont des éléments importants pour le développement d'un nouveau médicament [87].

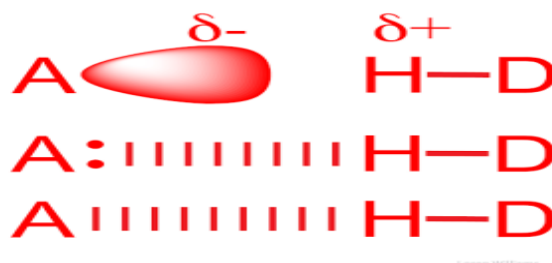


Figure 22: Liaison hydrogène.

3.2 Interactions de Van der Waals

Également nommées interactions de London ou forces de dispersion. Elles résultent de l'interaction des nuages électroniques de deux atomes adjacents conduisant à la présence d'une force attractive pour des distances de 3 à 4 Å, et sont très importantes en pratique à cause de leur très grand nombre, les interactions de VdW sont essentiellement responsables de la complémentarité stérique lors d'un phénomène de liaison [88,89]



Figure 23: Interactions de Van der Waals.

3.3 Interactions pi-cation

Ce sont des interactions non liées de nature électrostatique impliquent un cation (un ion chargé positivement) et un système π (par exemple un cycle aromatique). Le critère de distance permet d'identifier de manière géométrique les interactions cation- π : la distance entre le centre chargé et le centre géométrique du système π doit être inférieure à 5Å environ [86].

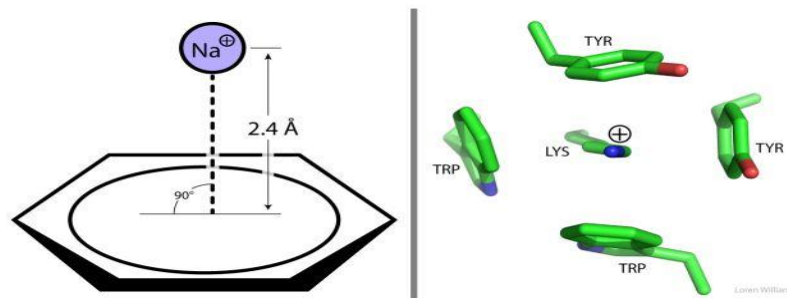


Figure 24: Interactions cation- pi

3.4 Interaction hydrophobe

Les acides aminés dont le radical est hydrophobe et apolaire ont la capacité d'empêcher la formation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau. Ils forment dans la structure des protéines des zones hydrophobes où les molécules d'eau ne peuvent former aucune liaison avec les radicaux d'acides aminés [90].

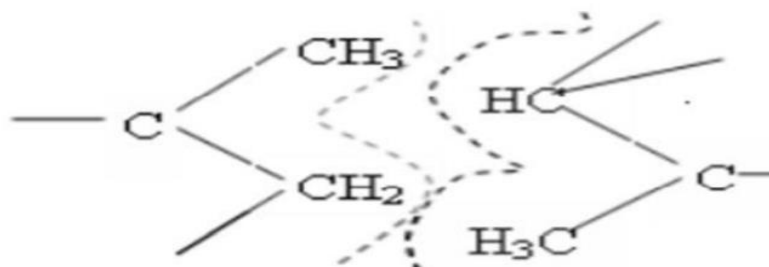


Figure 25: Liaison hydrophobe

3.5 Interaction électrostatique

Les acides aminés chargés positivement ou négativement peuvent donner des interactions électrostatiques. Ces dernières agissent à longues distances (environ 10Å), entre des groupes d'atomes électriquement chargés [87].

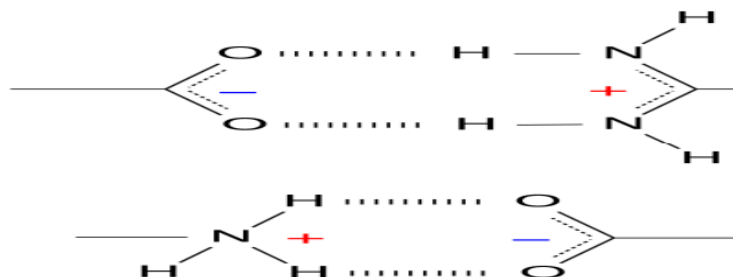


Figure 26: Interactions électrostatiques.

3.6 Interactions entre système π

Les interactions non liées π - π impliquent des systèmes π comme les cycles aromatiques. Ces derniers sont très souvent présents dans les macromolécules biologiques et les ligands organiques. Deux configurations sont essentiellement observées expérimentalement.

- Interaction π - π en forme de T ("edge to face") : les deux cycles aromatiques forment un angle droit et leurs centres géométriques (centroïdes) sont distants environ de moins de 5,5Å.
- Interaction π - π face à face : les deux cycles aromatiques sont parallèles et leurs centres géométriques sont distants environ de moins de 4Å. Deux sous catégories peuvent être formées selon la présence d'un décalage entre les deux cycles parallèles qui sont (conformation décalée) ou non (conformation en sandwich) [91].

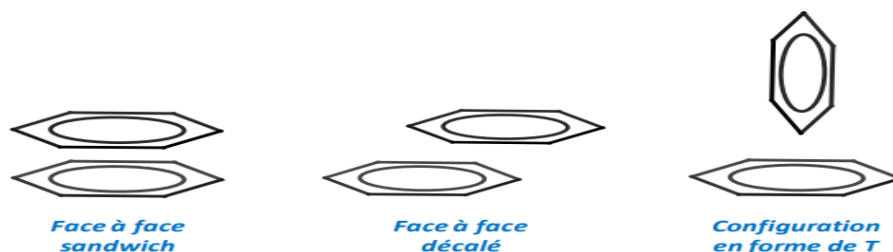


Figure 27: Interactions non liées π - π

4 Prédiction ADMET in silico

Le principe actif rencontre plusieurs barrières ADME dans l'organisme. Chaque passage d'une barrière ADME est susceptible d'engendrer une diminution de sa concentration. La concentration en principe actif est déterminante pour obtenir un temps d'exposition assez long avec la cible afin d'engendrer un effet thérapeutique efficace. Ainsi, une optimisation des leads orientée sur l'activité biologique peut donner des composés qui sont très efficaces comme ligands pour la cible visée, mais également l'optimisation des propriétés ADME-Tox (Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion - Toxicité) indispensable pour le passage des barrières physiologiques et l'innocuité du médicament [92].

ADMET in silico est l'utilisation de la modélisation informatique pour comprendre les relations structure-propriété et pour prédire les propriétés pharmacocinétiques à partir de la structure du composé. Les approches QSAR sont l'une des méthodes les plus populaires pour prédire l'ADMET d'un composé. Elles sont des équations mathématiques permettant d'estimer les paramètres ADMET de nouveaux composés [93]. La prise en compte de ces critères dès les phases précoces de recherche et développement (R&D) est nécessaire pour tenter de diminuer le taux d'échec des candidats-médicaments et limiter le temps et les coûts des tests expérimentaux [94].

4.1 Absorption

L'absorption est la pénétration d'une substance dans l'organisme. Il est préférable d'avoir des médicaments qui peuvent être administrés par voie orale, donc nous nous intéressons à l'absorption du tube digestif qui regroupe les phénomènes impliqués dans le transfert d'un xénobiotique du tractus gastro-intestinal vers la circulation sanguine. Le principe actif en solution traverse les cellules épithéliales via des mécanismes de transport paracellulaire ou transcellulaire (passif pour les molécules lipophiles et actif par des transporteurs et dans certains cas des vésicules pour les molécules hydrophiles). Ainsi, la solubilité, la lipophilie ou encore le pKa sont des propriétés physicochimiques principales pour l'absorption d'une molécule dans l'organisme. Le logarithme de la solubilité aqueuse (LogS), le logarithme du coefficient de partition entre les phases H₂O/Octanol (LogP) et le LogP à un pH spécifique (LogD) sont des grandeurs généralement utilisées dans le but d'estimer la capacité du composé à être absorbé par l'organisme par le biais d'une diffusion passive [92].

La règle de Lipinski ou règle des cinq, permet de prédire si un candidat médicament sera mal absorbé par voie orale à partir de sa structure. Elle repose sur des propriétés physico-chimiques à savoir :

- Un poids moléculaire (PM) inférieur ou égale à 500 g/mol ;
- Log P inférieur ou égale à 5 ;
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur ou égale à 5 ;
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur ou égale à 10.

La violation de deux ou plus de ces conditions prédit qu'une molécule est susceptible de poser des problèmes d'absorption par voie orale [95].

Des compléments ont été apportés, notamment par Veber :

- Le nombre de liaisons de rotation (FRB) est inférieur ou égale à 10 ;
- La surface polaire de la molécule (PSA) est inférieure ou égale à 140 Å² [96].

Les molécules qui ont réussi à traverser la membrane des cellules épithéliales peuvent être confrontées au mécanisme d'efflux, aussi il peut faire face à l'obstacle du métabolisme. En effet, le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) est une enzyme du métabolisme présente de façon extra hépatique également dans les cellules intestinales. La famille des transporteurs ABC, dont la glycoprotéine P (P-gp) fait partie, contribue à l'efflux des xénobiotiques du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire [92].

La biodisponibilité (F) reflète la fraction biodisponible dans la circulation sanguine après les phases d'absorption et le premier passage hépatique. Cette fraction biodisponible va pouvoir ensuite être distribuée dans l'organisme [92].

4.2 Distribution

La distribution regroupe les phénomènes impliqués dans le transport via la circulation sanguine et le partage du xénobiotique entre le sang et les différents tissus de l'organisme. Le principe actif présent dans la circulation sanguine se fixe de façon réversible avec les protéines plasmatiques. L'affinité du xénobiotique pour ces protéines va déterminer le rapport entre la fraction libre en solution et la fraction liée aux protéines. Seule la fraction libre peut quitter la circulation systémique en traversant les membranes des capillaires sanguins, afin de diffuser dans les tissus et induire l'effet thérapeutique désiré. Le phénomène de fixation sera exprimé expérimentalement par le pourcentage de la fraction liée aux protéines plasmatiques

(PPB) ou par le pourcentage de la fraction libre dans le plasma (F_u). Le volume de distribution (V_d) est généralement utilisé pour pouvoir déterminer le mode de diffusion tissulaire du principe actif. Il s'agit en fait d'un volume apparent [92].

Le système nerveux central est doté d'une barrière hémato-encéphalique (Blood- Brain Barrier (BBB)). Cette barrière de protection rend difficile la distribution du principe actif libre dans le système nerveux central (SNC). Mais les médicaments qui agissent au niveau du système nerveux central (SNC) doivent traverser cette barrière hémato-encéphalique (BHE) pour atteindre leur cible moléculaire [92].

4.3 Métabolisme

La phase du métabolisme peut être décrite comme un processus de biotransformation du principe actif par lequel il va être plus polaire, et par conséquent plus facilement dissout dans les milieux aqueux afin d'être éliminé par l'organisme. Les réactions métaboliques sont généralement divisées en deux phases. Les réactions de phase I regroupent les biotransformations. Les réactions de phase II ont pour but de conjuguer un ou plusieurs groupes fonctionnels polaires. Majoritairement, ces réactions de phase II suivent les réactions de phase I, mais elles peuvent aussi s'appliquer directement sur le principe actif [92].

Plusieurs enzymes participent à ces réactions biochimiques. Certaines de ces enzymes sont plus impliquées que d'autres dans le métabolisme des médicaments. Les cytochromes P450 sont une famille d'hémoprotéines impliquées dans les réactions de phase I. Les isoenzymes CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 et CYP1A2 sont majoritairement responsables du métabolisme des médicaments chez l'homme. Ces cytochromes présentent une large diversité de substrats, si bien que des molécules très différentes peuvent être métabolisées par la même isoenzyme [92].

Le principe actif peut être substrat, il sera donc métabolisé par le cytochrome, il peut également avoir un effet inhibiteur et bloquer le cytochrome, et enfin il peut aussi avoir un effet inducteur vis-à-vis de la cellule et favoriser l'expression d'un ou plusieurs cytochromes. Tout ceci peut conduire à des interactions médicamenteuses cliniquement significatives [92].

4.4 Excrétion

La phase d'excrétion regroupe les phénomènes impliqués dans l'élimination du principe actif et de ses métabolites. Cette phase est principalement assurée par les reins et le foie [92].

Le principe actif et ses métabolites vont pouvoir traverser les membranes des hépatocytes selon les mécanismes de transport transcellulaire, dans le but d'être sécrétés dans les canicules biliaires. De la sorte, la bile est un suc digestif sécrété par les hépatocytes, mais également une voie d'élimination pour le foie. Le xénobiotique et ses métabolites sécrétés dans la bile vont regagnés l'intestin par le biais du canal cholédoque avant d'être potentiellement réabsorbés par l'organisme ou être excrétés dans les selles [97,92].

L'excrétion rénale débute par la filtration glomérulaire des molécules dissoutes dans le sang et leur transfert dans l'urine primitive au niveau de la capsule de Bowman. Dans le tubule proximal, certaines molécules médicamenteuses peuvent être activement sécrétées du flux sanguin dans la lumière tubulaire par le biais de transporteurs. Ces molécules suivant l'écoulement tubulaire du néphron et au cours de cet écoulement, l'eau va être réabsorbée, ce qui aura pour conséquence une diminution du volume urinaire et une augmentation de la concentration du principe actif dans l'urine définitive. La réabsorption tubulaire des molécules médicamenteuses se produit principalement au niveau du tubule distal selon un phénomène de diffusion passive, et dépend de leur degré de dissociation au pH urinaire (les espèces moléculaires neutres seront plus facilement réabsorbées). D'autre part, les métabolites dans le sang sont plus facilement éliminés par les reins que le principe actif, car l'augmentation de leur polarité augmente leur solubilité dans l'urine primitive lors de la filtration glomérulaire après élimination rénale [97].

Plusieurs paramètres physiologiques permettent d'estimer l'élimination d'un xénobiotique. L'un des plus importants est la clairance totale, qui correspond à la capacité de l'organisme à éliminer la molécule après avoir regagné la circulation systémique. La clairance totale est déterminée en cumulant les clairances rénale et hépatique. Un autre paramètre physiologique est le temps de demi-vie d'élimination correspondant au temps nécessaire pour que la concentration du xénobiotique dans le plasma diminue de moitié [92].

4.5 Toxicité

La mise au point de nouveaux médicaments exige que des études toxicologiques soient effectuées afin d'estimer l'innocuité de ces nouvelles entités moléculaires avant la demande d'AMM auprès des autorités compétentes [92].

De nombreuses méthodes *in silico* ont donc été mises en place pour tenter de prédire la toxicité, les effets secondaires et le métabolisme des composés, c'est ce qu'on appelle la

toxicologie in silico ou toxicologie computationnelle : construction de bases de données toxicologiques, établissement des modèles QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), et méthodes basées sur la structure chimique des composés [98 ,99].

Dans le cadre des approches in silico, la toxicité des candidats médicaments peut être étudiée à différentes échelles. En effet, des méthodes traitent les phénomènes de toxicité globale, par exemple les modèles de cancérogénicité, tandis que d'autres méthodes traitent les facteurs de la toxicité conduisant à des manifestations locales, comme la toxicité propre à un organe. De ce fait, plusieurs facteurs de toxicité sont étudiés lors de la recherche et du développement de nouveaux médicaments et peuvent être la cause de l'arrêt d'un projet [92].

Le test d'Ames est une méthode simple pour tester la mutagénicité d'un composé, il utilise plusieurs souches de la bactérie *Salmonella typhimurium* qui portent des mutations dans les gènes impliqués dans la synthèse de l'histidine, de sorte qu'elles ont besoin d'histidine pour la croissance. La variable testée est la capacité du mutagène à provoquer un retour à la croissance sur un milieu exempt d'histidine [100].

L'hépatotoxicité et la cardiotoxicité sont de plus en plus étudiées de nos jours, en raison de leur impact important dans le processus de R&D de nouveaux médicaments et du nombre croissant d'études expérimentales publiées [92]. Le gène hERG (gène humain lié à l'éther-a-go-go) code pour une protéine de canal potassique appelée Kv11.1, et joue un rôle important dans le potentiel d'action cardiaque. L'inhibition du gène provoque une cardiotoxicité potentiellement mortelle. Par conséquent, il est important d'évaluer le blocage du canal hERG des composés principaux dans un processus de découverte précoce des médicaments [101].



PARTIE PRATIQUE

1 Matériel et méthodes

Dans le but d'étudier *in silico* de nouveaux dérivés de la rivastigmine, inhibiteurs probables de la protéine cholinestérase impliquée dans la maladie d'Alzheimer, nous avons entrepris dans cette partie une étude par docking moléculaires afin de prédire le mode d'interaction le plus probable des composés proposés ainsi que la rivastigmine utilisé comme référence avec la cible.

1.1 Docking moléculaire

1.1.1 Matériel

1.1.1.1 Cible moléculaire et ligands

a. Cible moléculaire

Dans notre étude, nous nous sommes intéressées à une seule cible : « Acétylcholinestérase » protéine en complexe avec un inhibiteur co-cristallisé « galanthamine ». C'est une cible importante dans le domaine thérapeutique.

La structure tridimensionnelle de la cible constituée de quatre chaînes (A, B, C et D) obtenue avec une résolution de 2.40 Å et disponible sous le code 4ey6 sur PDB (banque de données sur les protéines) qui est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques : protéine essentiellement et acide nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Ces données expérimentales sont déposées dans la PDB par des biologistes et des chimistes du monde entier et appartiennent au domaine public [102].



Figure 28: Informations relatives à 4EY6.

b. Ligands

Dans notre partie pratique, nous avons choisi la rivastigmine qui est un inhibiteur d'AChE comme référence, sur laquelle nous avons apporté des modifications structurales sur la partie Carbamate afin d'améliorer les analogues structuraux ayant des propriétés pharmacocinétiques, tout en prenant en considération les données de la relation structure activité de cette famille chimique indiquant que :

- La présence de l'amine tertiaire et les alkyles sont indispensables pour l'activité [103].

Nous avons proposé six dérivés de rivastigmine, leurs structures chimiques ont été dessinées et optimisées dans le ChemDraw Ultra 8.0 puis enregistrées sous forme PDB.

- 3-(1-(diméthylamino)éthyl) phényléthyl(méthyl)carbamate (Rivastigmine).
- 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényldiméthylcarbamate (M1).
- 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényldiéthylcarbamate (M2).
- 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényl carbamate (M3).
- 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényl piperidine-1-carboxylate (M4).
- 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényl piperazine-1-carboxylate (M5).
- 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényl pyrrolidine-1-carboxylate (M6).

Les ligands qui ont fait l'objet de notre étude sont les nouveaux analogues de la rivastigmine proposés dans notre travail, la rivastigmine utilisée comme référence ainsi que la galantamine : le ligand co-cristallisé dans le site actif du cible choisie utilisée pour valider notre protocole de docking.

La structure de la galantamine utilisée pour valider notre protocole de docking est optimisée et tracée par ChemDraw Ultra 8.0. La structure de la cible avec la galantamine co-cristallisée obtenue par diffraction des rayons X, avec une résolution de 2.40 Å, a montré une orientation inattendue du ligand dans le site actif, ainsi que des interactions protéine-ligand inhabituelles. L'inhibiteur se trouve lié à la base de la gorge du site actif, interagissant à la fois avec la poche de liaison à l'acyle et le principal site de liaison à l'ammonium quaternaire. Cependant, le groupe amine tertiaire de la galanthamine n'interagit pas directement avec Trp84. Une étude d'amarrage utilisant le programme AUTODOCK prédit correctement l'orientation de la galanthamine dans le site actif [104].

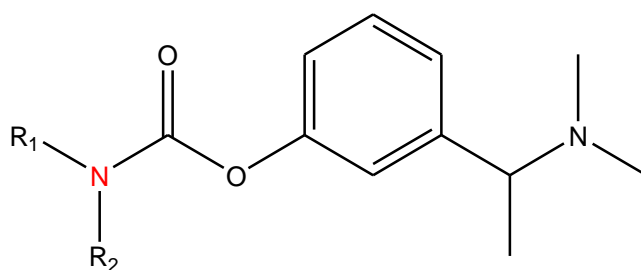
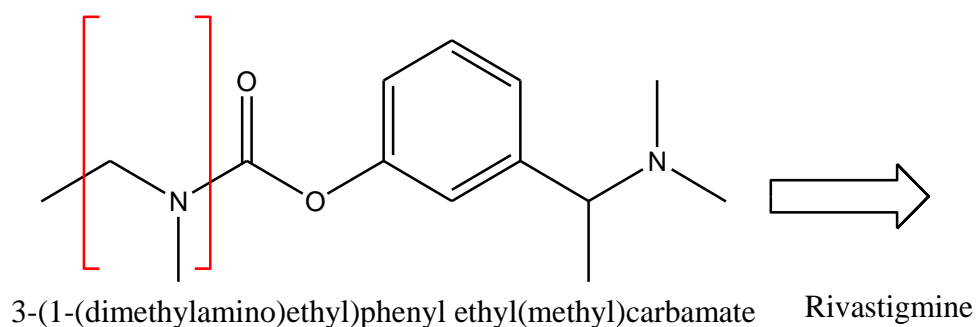


Figure 29: Structure chimique générale de nouveaux dérivés de la rivastigmine.

1.1.1.2 Logiciels utilisés

a. ChemDraw (version Ultra 8.0)

Le ChemDraw est un outil complet destiné aux chimistes et biologistes, intégrant toute une gamme d'outils intelligents permettant de faciliter les travaux des chercheurs, il a été développé en 1985 par David A. Evans et Stewart Rubenstein. C'est un outil essentiel pour illustrer les concepts chimiques et biologique, il est simple à utiliser, puissant et permet de dessiner de manière intuitive et efficace en deux et trois dimensions [105].

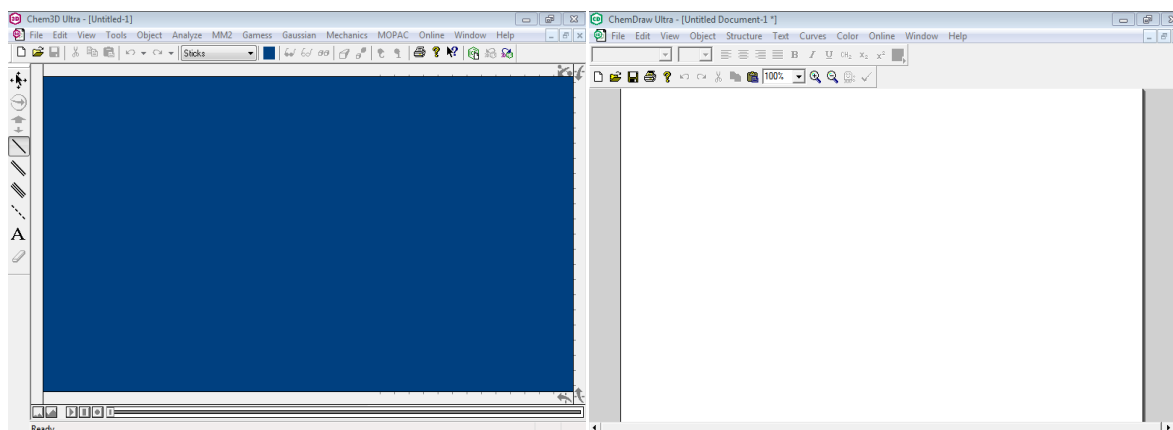


Figure 30: Interface du logiciel ChemDraw.

b. AutoDockTools

AutoDock Tools est un module du progiciel MGL Tools spécialement conçu pour générer des entrées (fichiers PDBQT) pour AutoDock ou Vina et qui permet de :

- Visualiser les molécules en 3D et les préparer pour le docking;
- Configurer le fichier de paramètres AutoGrid (GPF) à l'aide d'une représentation visuelle de la zone de grille et de widgets basés sur des curseurs, lancer AutoGrid et AutoDock;
- Lire les résultats d'un travail AutoDock et les afficher graphiquement [106].

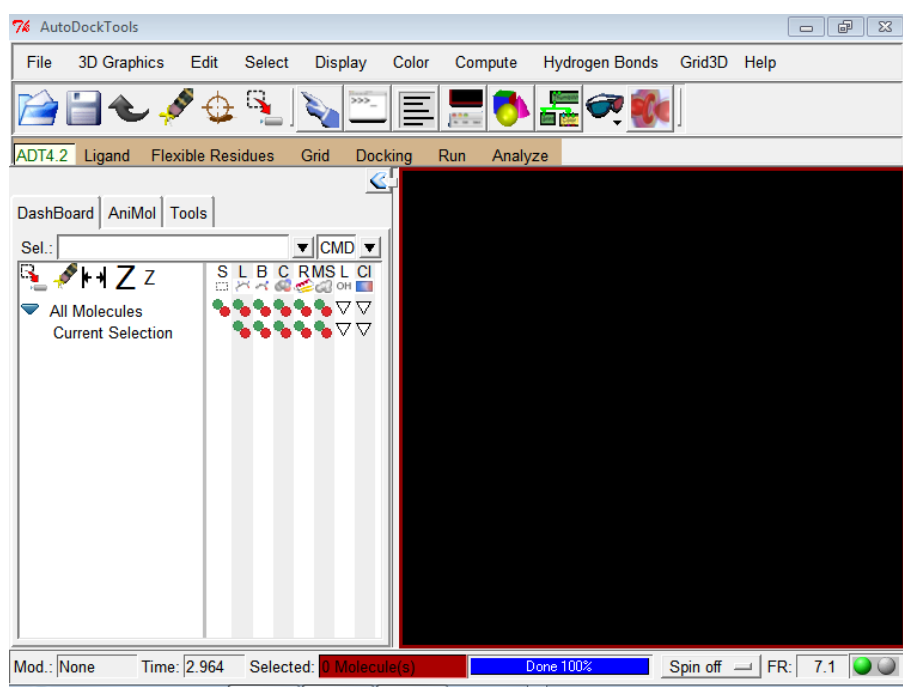


Figure 31: Interface du logiciel AutoDock Tools.

c. AutoDockVina

AutoDock Vina est une nouvelle génération de logiciel d'accueil du MGL (Molecular Graphics Laboratory). Il réalise des améliorations significatives de la précision moyenne des prédictions de mode de liaison, AutoDock Vina ne nécessite pas de choisir les types d'atomes et de pré-calculer les cartes de grille pour eux. Au lieu de cela, il calcule les grilles en interne pour les types d'atomes nécessaires, et il le fait pratiquement instantanément [107].

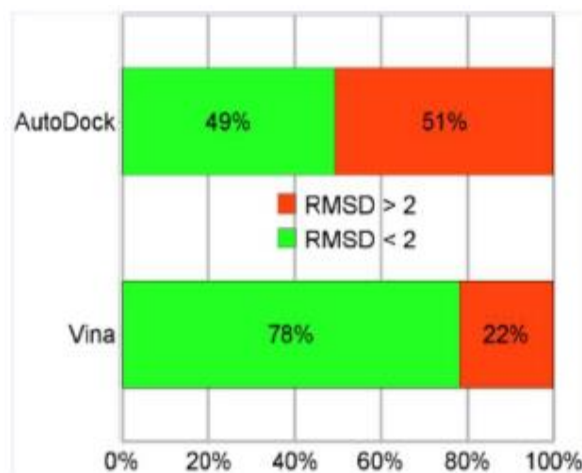


Figure 32: Précision de prédiction du mode de liaison sur l'ensemble de test pour AutoDock et AutoDock Vina.

d. BIOVIA Discovery Studio

Biovia Discovery Studio est un outil de visualisation, qui permet un affichage 3D d'une structure de molécule biologique et les résultats des poses obtenus par les logiciels d'amarrage.

Il propose plusieurs fonctions telles que : la présentation des liaisons chimiques (liaison hydrogène, Van der Waals, pi-sigma...), la mesure de distances interatomiques, l'annotation des acides aminés (nom, numéro), choix de couleur (selon les atomes, les structures...), la capacité de cacher et puis afficher à nouveau les différentes molécules [108].

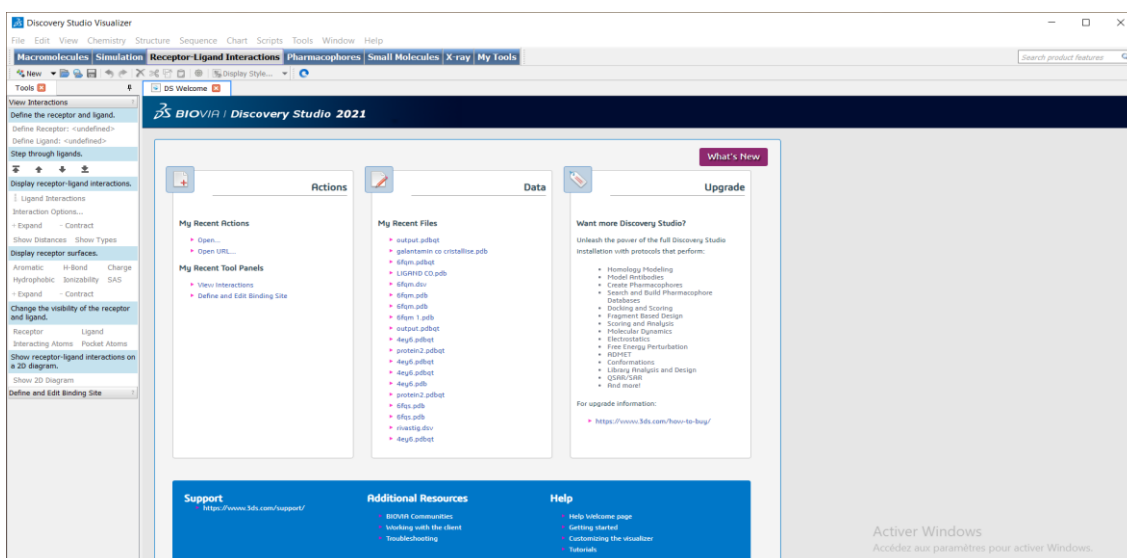


Figure 33: Interface du logiciel Biovia Discovery Studio

e. Pymol

PyMOL est un logiciel de visualisation moléculaire, créé par Warren DeLano. En plus d'offrir de nombreuses possibilités de transformé en format 3D, le logiciel PyMOL permet de réaliser des animations, des alignements de structure, de générer des structures,... etc. Il est l'un des outils le plus utilisé dans la publication scientifique. Il s'agit d'un logiciel libre et gratuit [109].

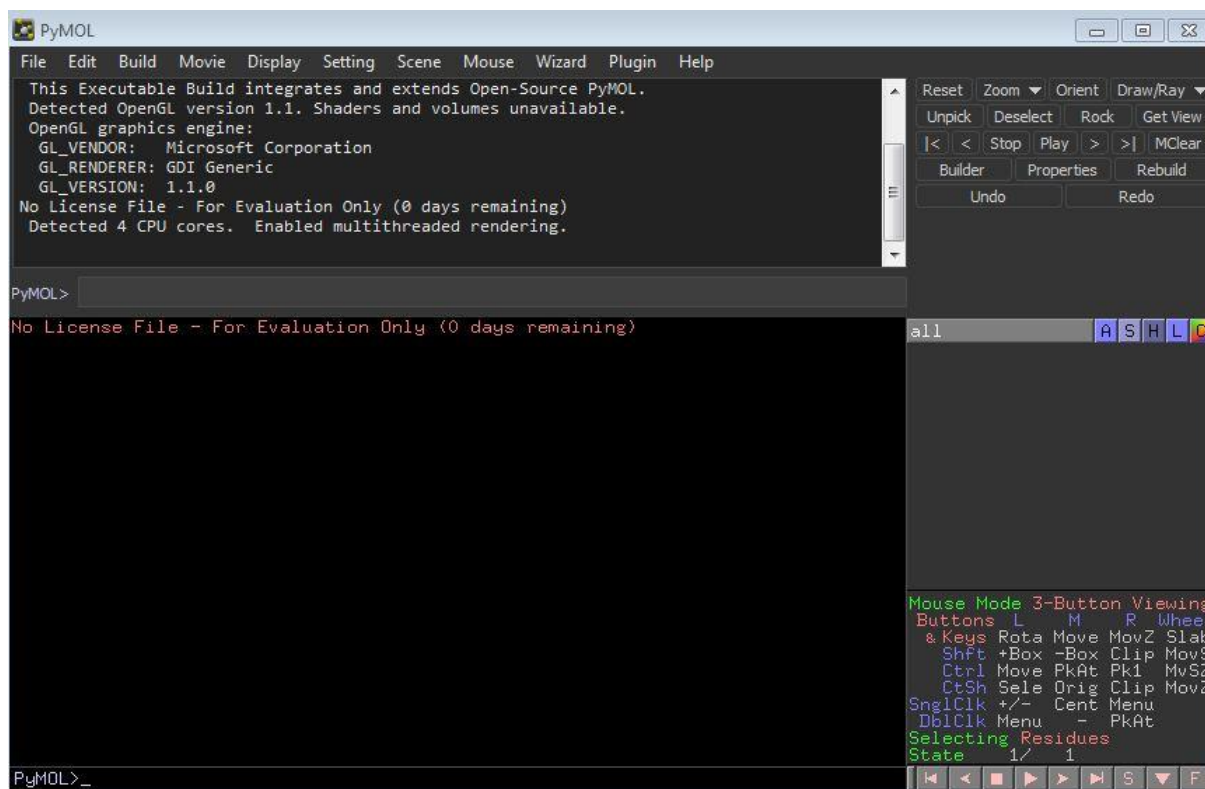


Figure 34: Interface du logiciel Pymol.

1.1.2 Méthode

1.1.2.1 Préparation des molécules pour le docking moléculaire

a. Préparation de la protéine (cible)

La structure 3D de la 4ey6 téléchargée est sous forme de complexe où elle est liée aux ligands co-cristallisés, dont la galantamine. Cette protéine est constituée de quatre chaînes A, B, C et D.

La préparation du récepteur s'est faite par les étapes suivantes :

- Nettoyage de la cible 4ey6 (élimination des ligands co-cristallisés) comme suit:
 - Ouvrir le programme AutoDock Tools;
 - Importation de la protéine 4ey6 sous forme pdb (Figure 35);
 - Sélection puis élimination des ligands co-cristallisés (Figures 36, 37 et 38);
- Elimination des molécules d'eau ensuite insertion des hydrogènes polaires nécessaires aux différentes interactions (Figure 39,40);
- Addition des charges partielles dites de « Kollman » (Figure 41);
- Sauvegarder la structure sous le format pdbqt (Figures 42 et 43).

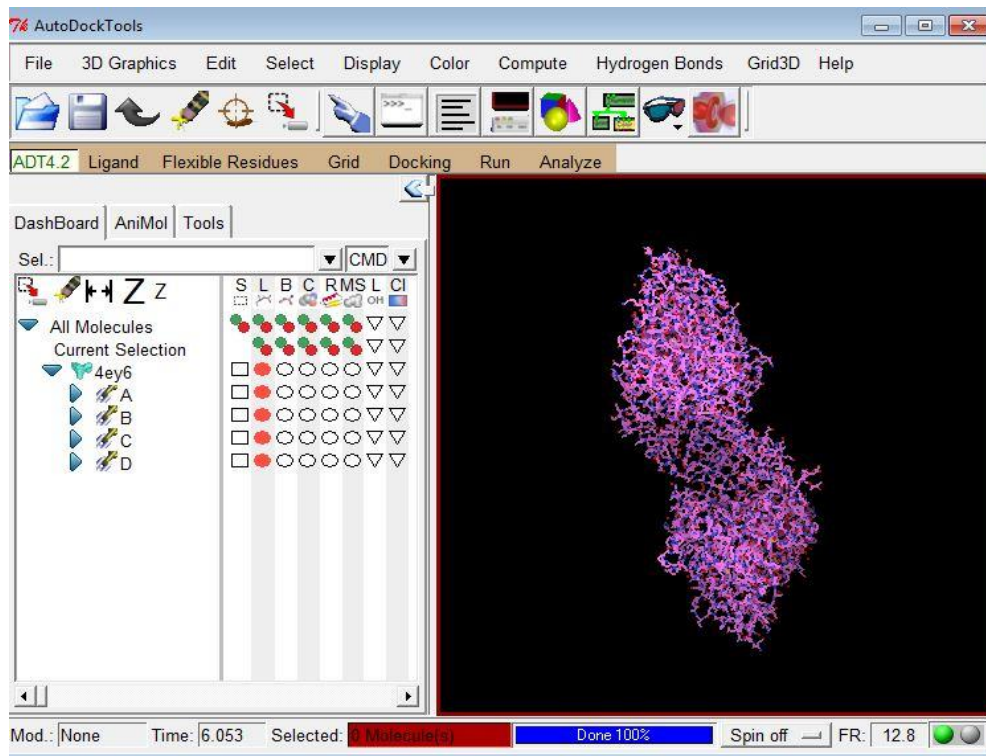


Figure 35: Importation de la protéine 4ey6 sous forme pdb sur AutoDock Tools.

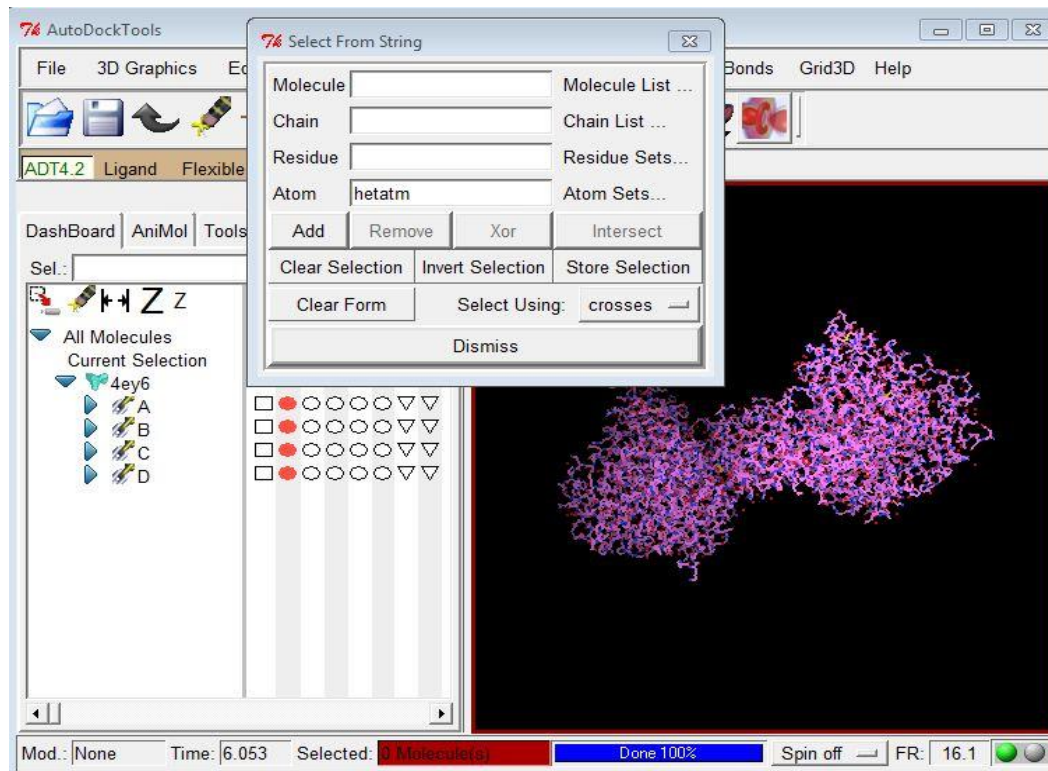


Figure 36: Sélection des ligands co-cristallisés (1/2).

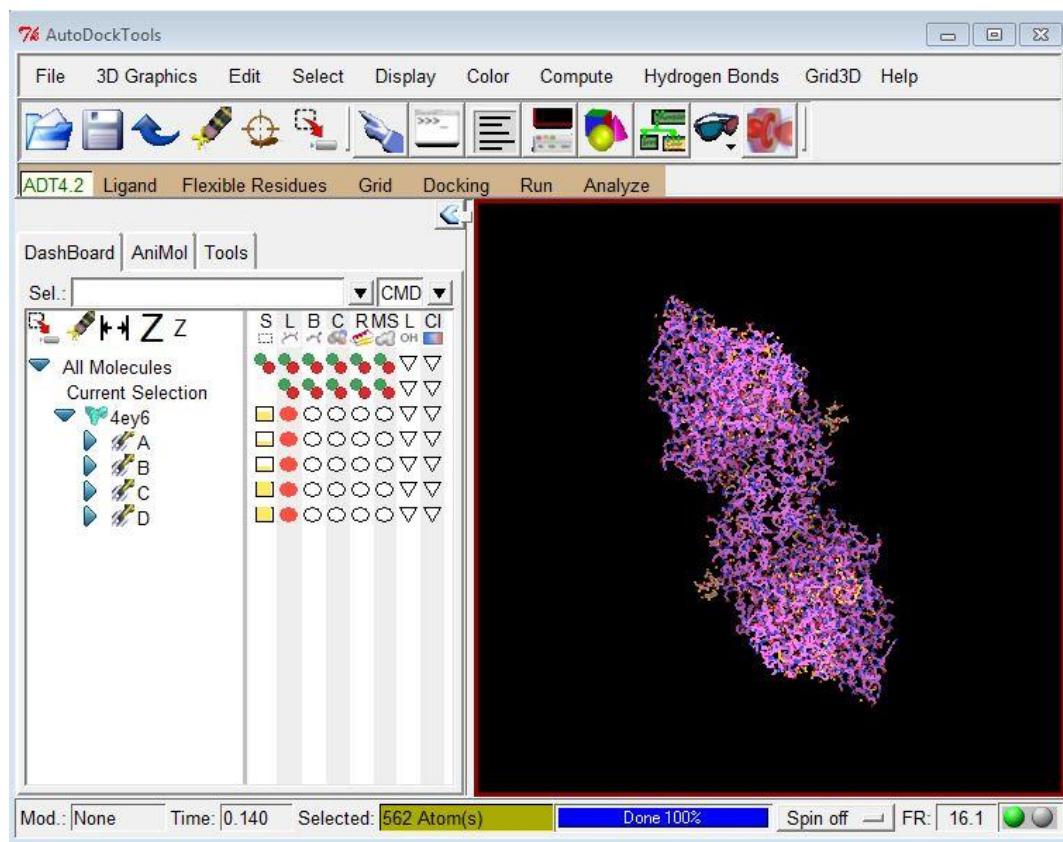


Figure 37: Sélection des ligands co-cristallisés (2/2).

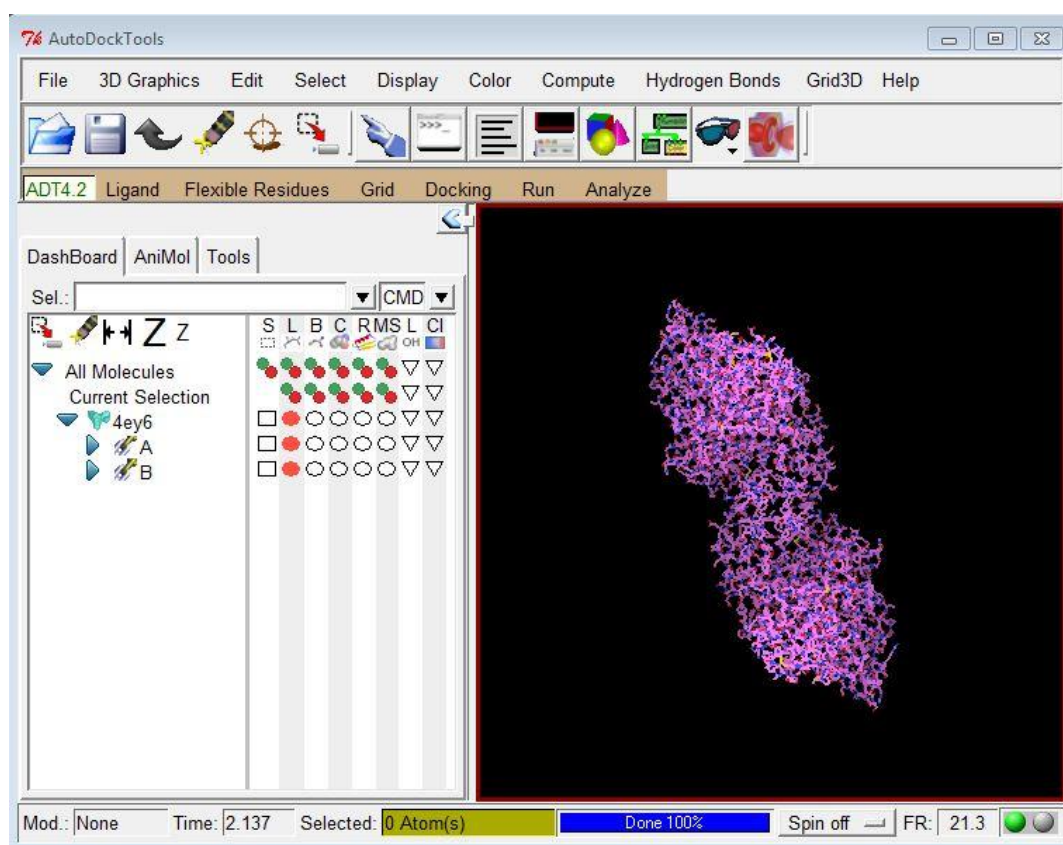


Figure 38: Elimination des ligands co-cristallisés.

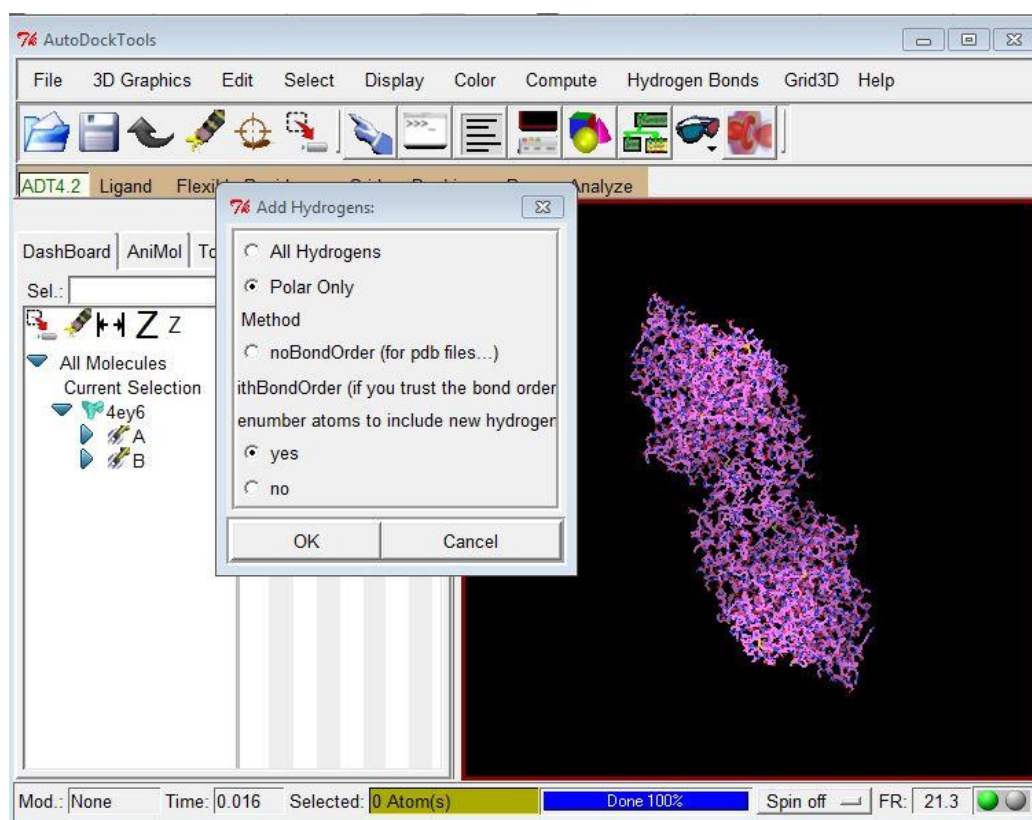


Figure 39: Addition des hydrogènes polaires nécessaires aux différentes interactions a la structure (1/2).

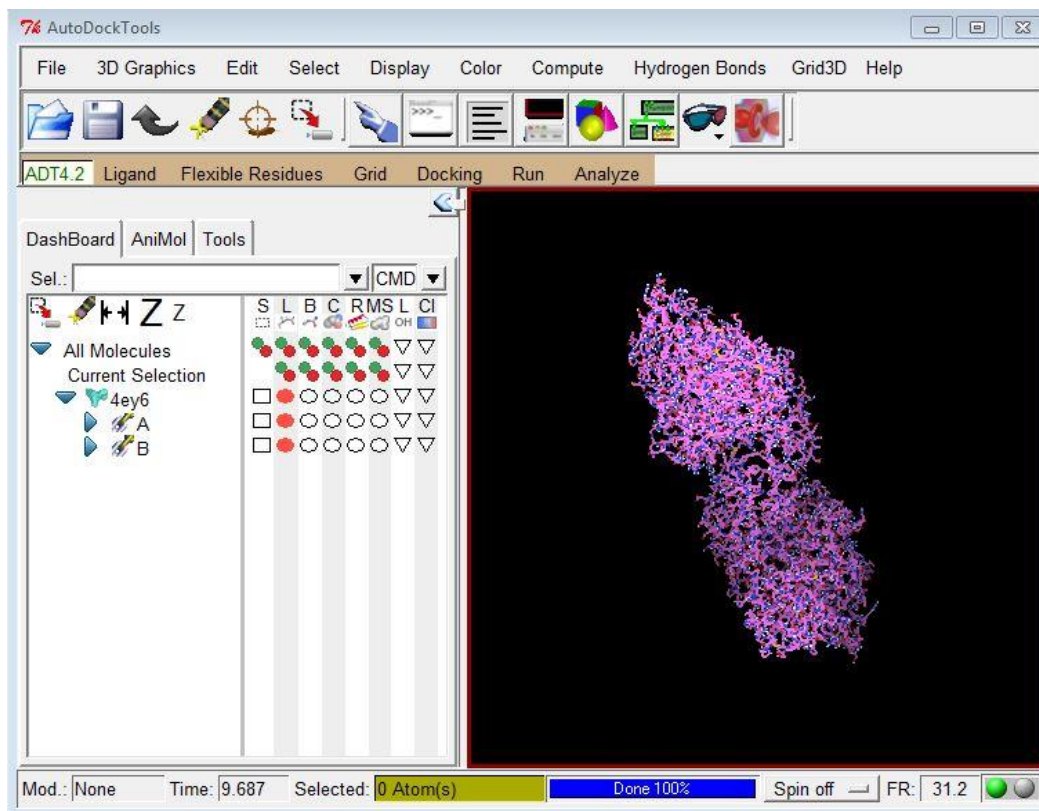


Figure 40: Addition des hydrogènes polaires nécessaires aux différentes interactions a la structure (2/2).

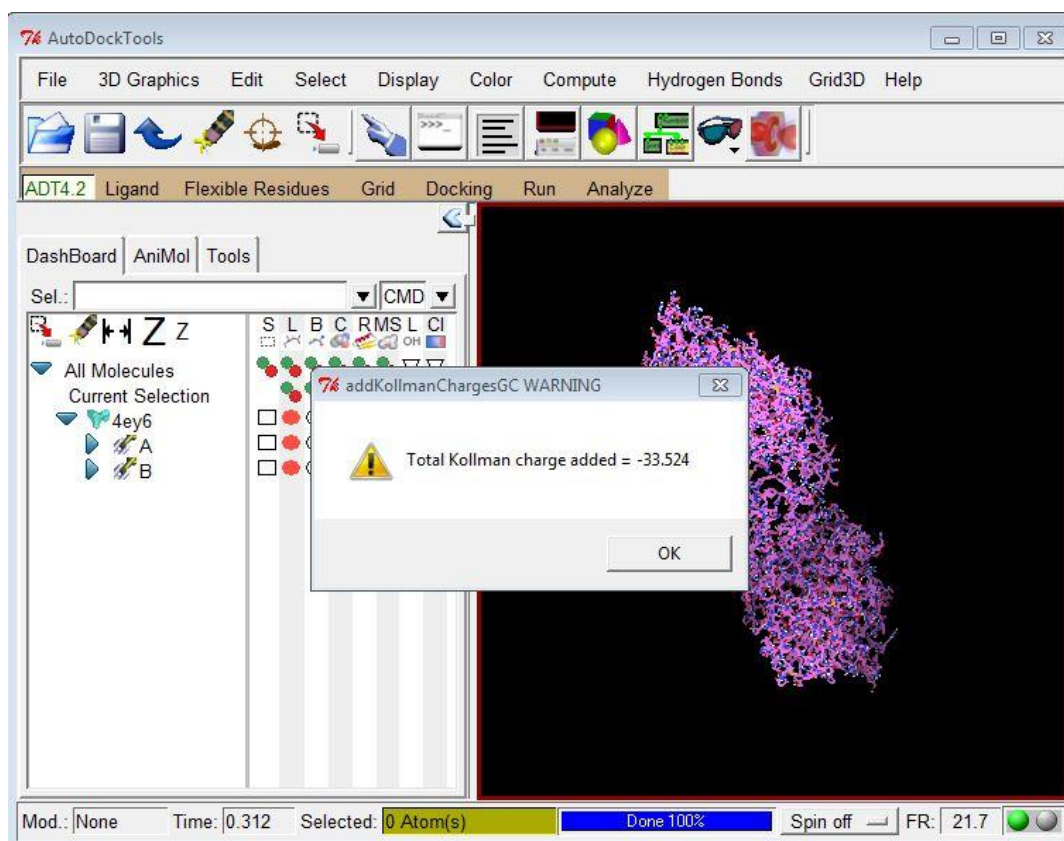


Figure 41: Addition des charges partielles (charge de kollman).

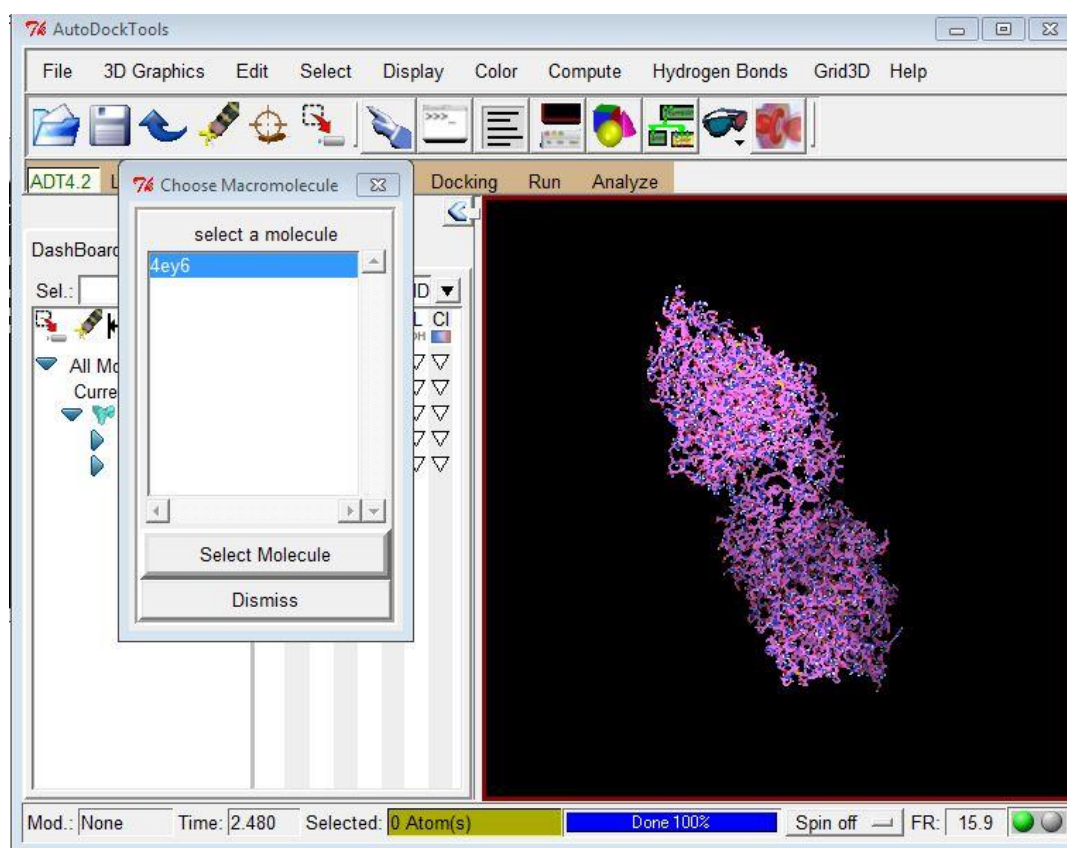


Figure 42: Enregistrement de la protéine sous forme pdbqt (1/2).

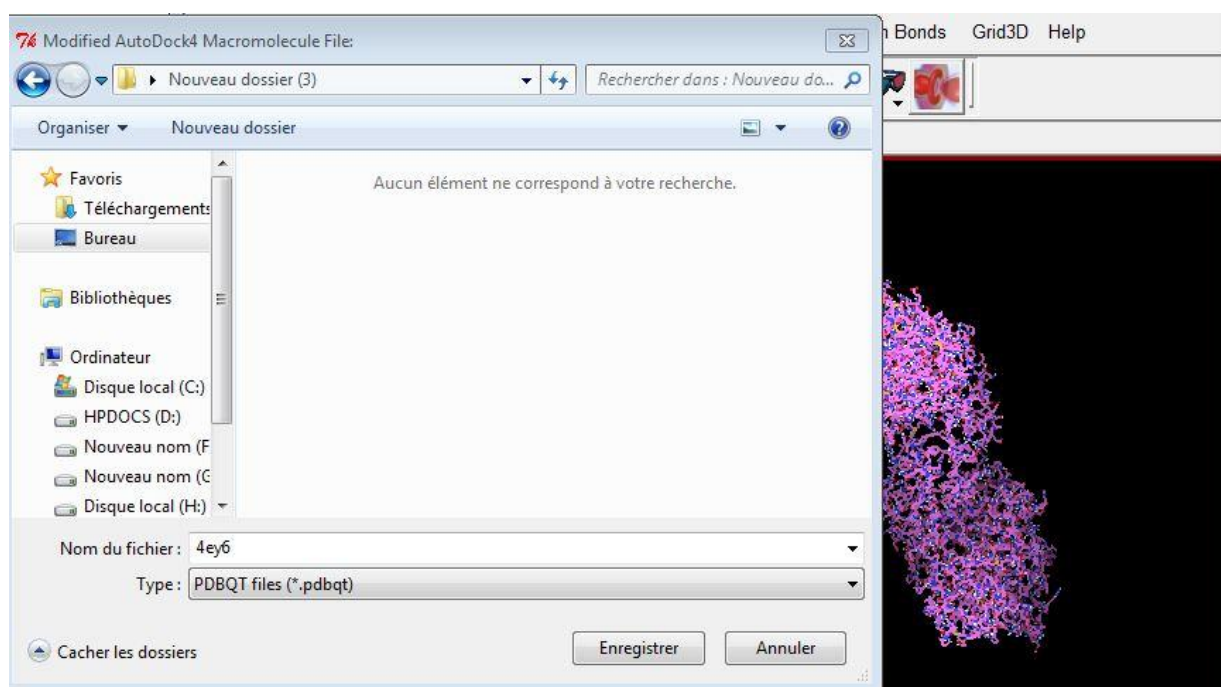


Figure 43: Enregistrement de la protéine sous forme pdbqt (2/2).

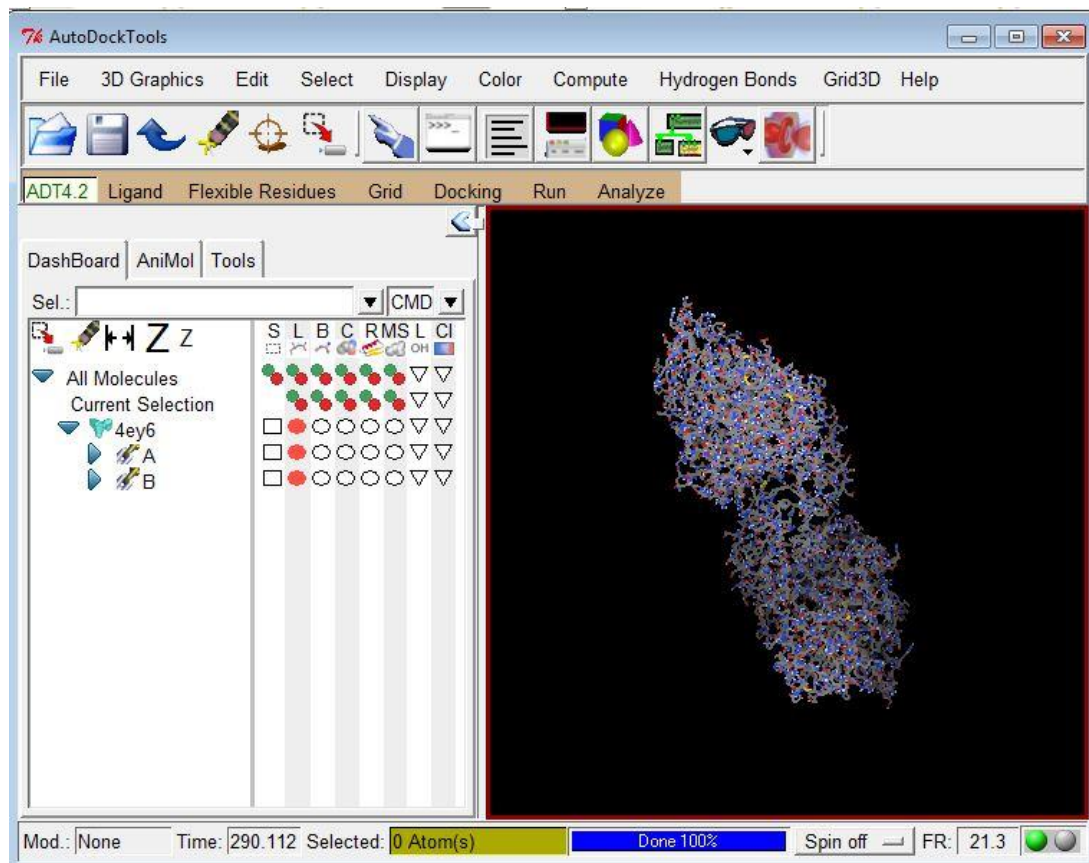


Figure 44: Format pdbqt de la protéine (4ey6).

b. Préparation des ligands

Les ligands tracés et optimisés par ChemDraw sont enregistrés sous forme pdb.

La préparation des ligands pour le processus de docking est effectuée par deux étapes :

- Définir la molécule comme ligand;
- Enregistrer le ligand sous format pdbqt;

Les étapes de préparation des ligands sont illustrées dans les figures ci-dessous :

(Nous avons pris l'exemple de rivastigmine).

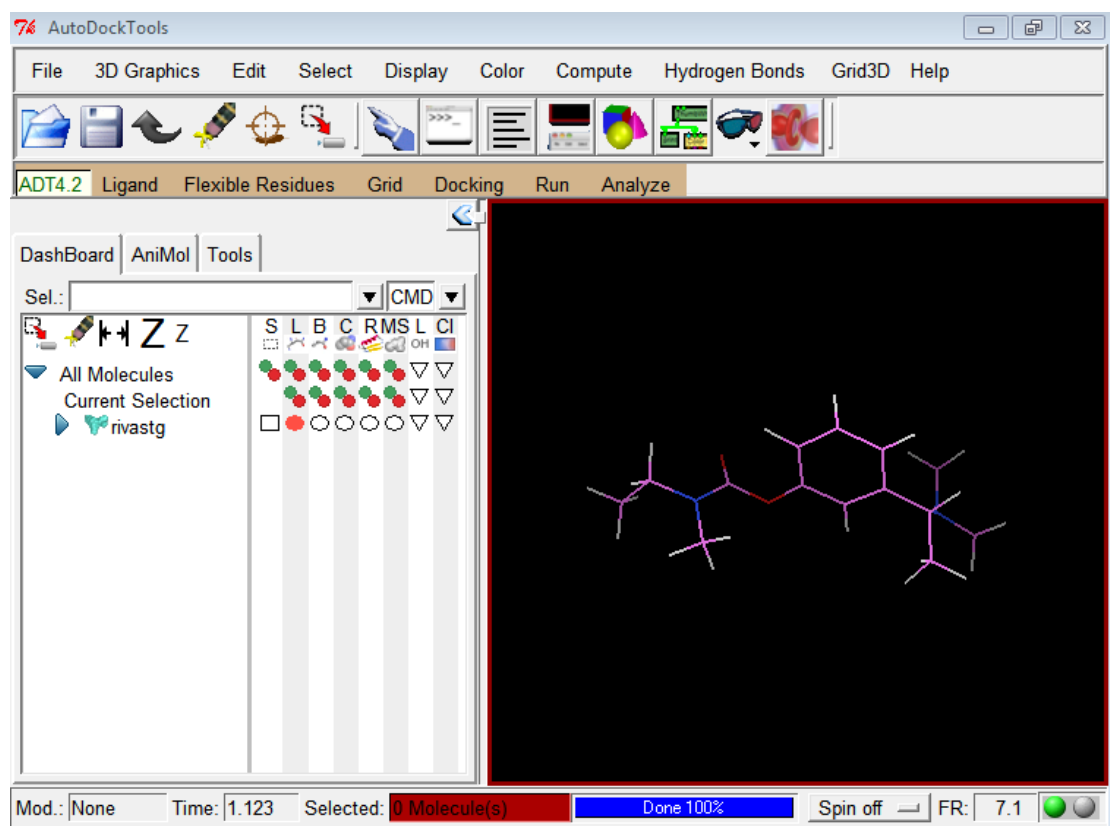


Figure 45: Importation du ligand sur AutoDock Tools.

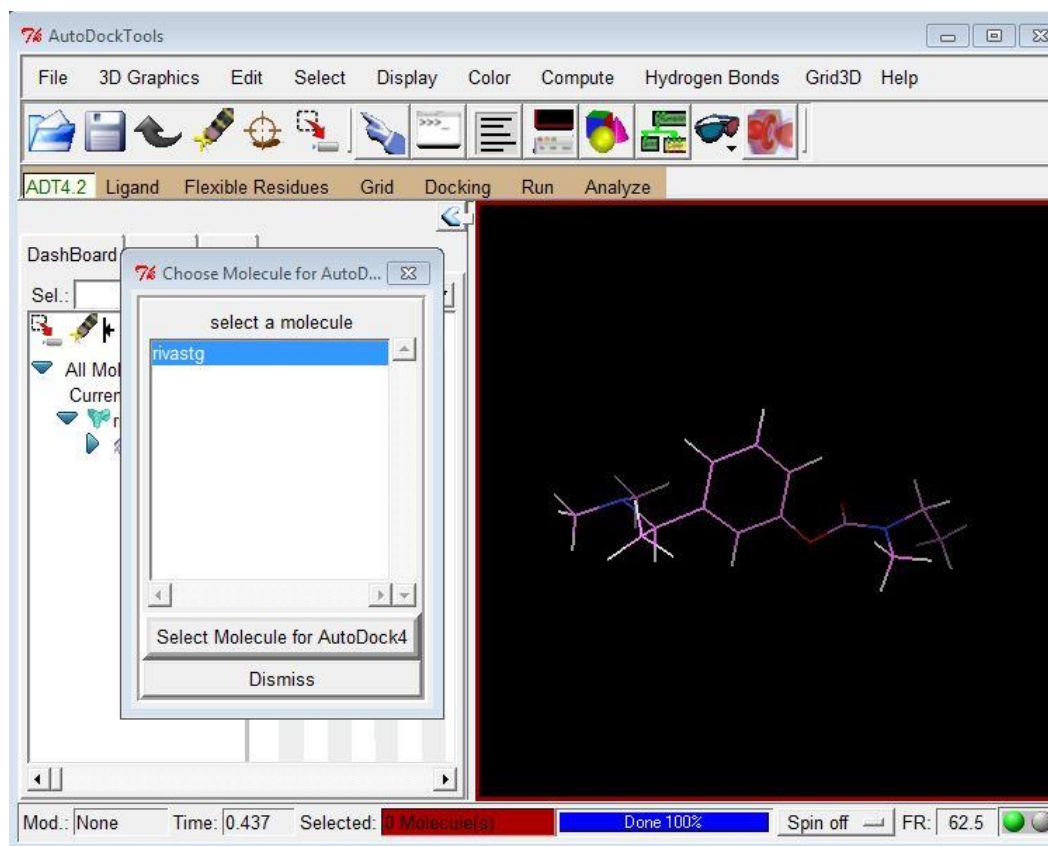


Figure 46: Définition de la molécule comme ligand (1/2).

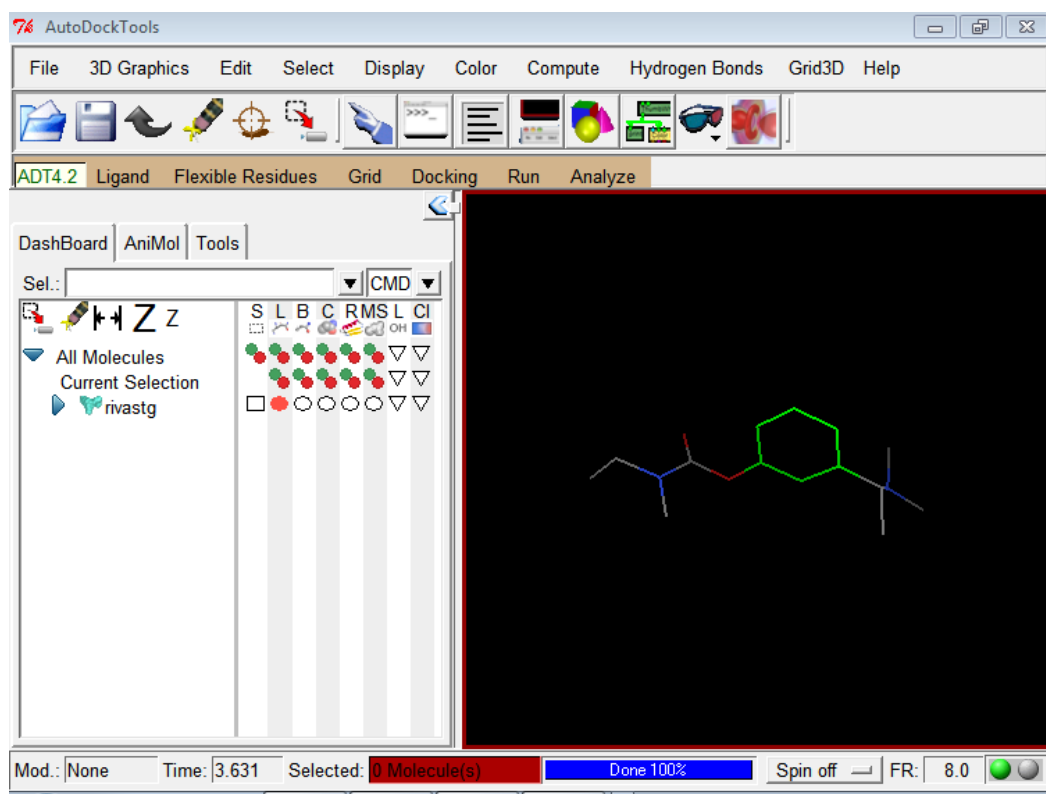


Figure 47: Définition de la molécule comme ligand (2/2).

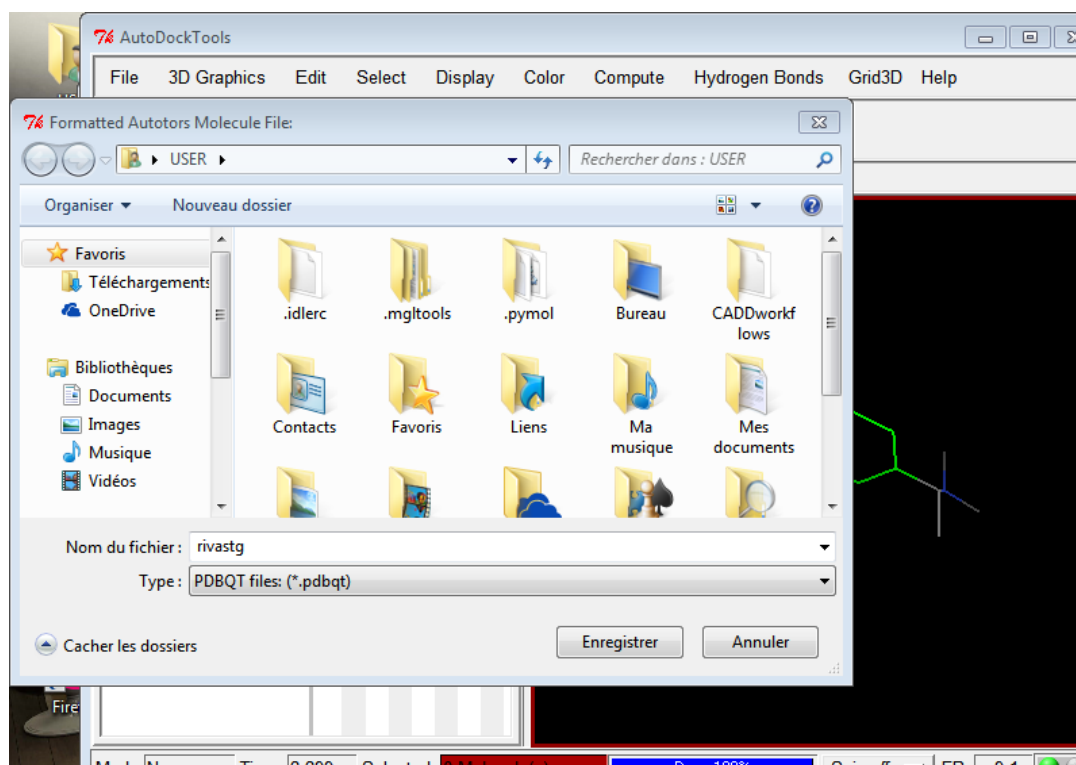


Figure 48: Enregistrement du ligand sous forme pdbqt.

1.1.2.2 Protocole de docking

Le docking moléculaire a été réalisé en utilisant les logiciels AutoDock Tools et Vina, qui permettent de rechercher les meilleures conformations du ligand dans le site actif du récepteur.

Après avoir préparé les deux entités : le récepteur et le ligand, il faut déterminer la zone de recherche : une grille de potentiel tridimensionnelle ou « Grid Box » que le logiciel place dans le récepteur englobant largement le site actif de la protéine étudiée et permettant la libre rotation du ligand dans ce site.

Cette boîte est déterminée par ses dimensions et les coordonnées X, Y et Z de son centre en plus de l'espacement ou la maille de la grille fixée par défaut à 0.375 Å (correspondant au quart de la longueur d'une simple liaison C-C).

L'ensemble de ces instructions est sauvegardé dans un fichier texte de paramétrage portant l'extension «.txt » que le programme AutoDock Vina se charge de l'utiliser pour le docking

Le processus de docking est réalisé comme suit :

- Ouvrir les deux fichiers PDBQT du récepteur et du ligand sur AutoDock Tools;
- Choisir l'enzyme 4ey6 comme macromolécule;
- Définir les différents paramètres du Grid Box (les coordonnées du centre, la maille de la grille et les dimensions de la boîte);
- Créer un fichier texte nommé « config.txt », qui contient toutes les informations nécessaires pour le docking;
- Rechercher l'invite de commande Windows et ouvrir une fenêtre (AutoDock Vina ne possède pas d'interface utilisateur graphique comme pour AutoDock, alors on travaille avec via l'invite de commande);
- Entrer dans la commande les liens des dossiers nécessaires au docking (le dossier contenant les structures du ligand et du récepteur, les informations du Grid Box et le dossier contenant le logiciel AutoDock Vina);
- Spécifier les fichiers nécessaires aux docking (récepteur, ligand et config) et les fichiers qui vont contenir les résultats (log et output);

- Lancer le docking pour rechercher la meilleure pose correspondant à la plus basse énergie.

Les différentes étapes du docking sont représentées dans les figures ci-dessous.

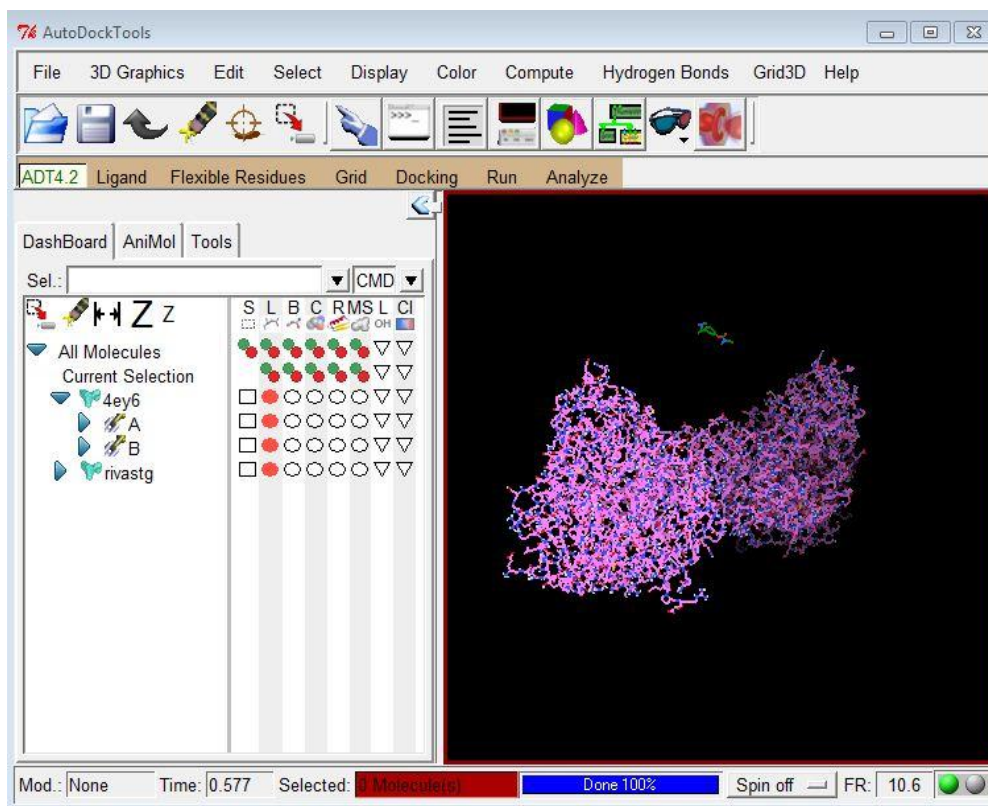


Figure 49: Ouverture des deux fichiers pdbqt du récepteur et du ligand

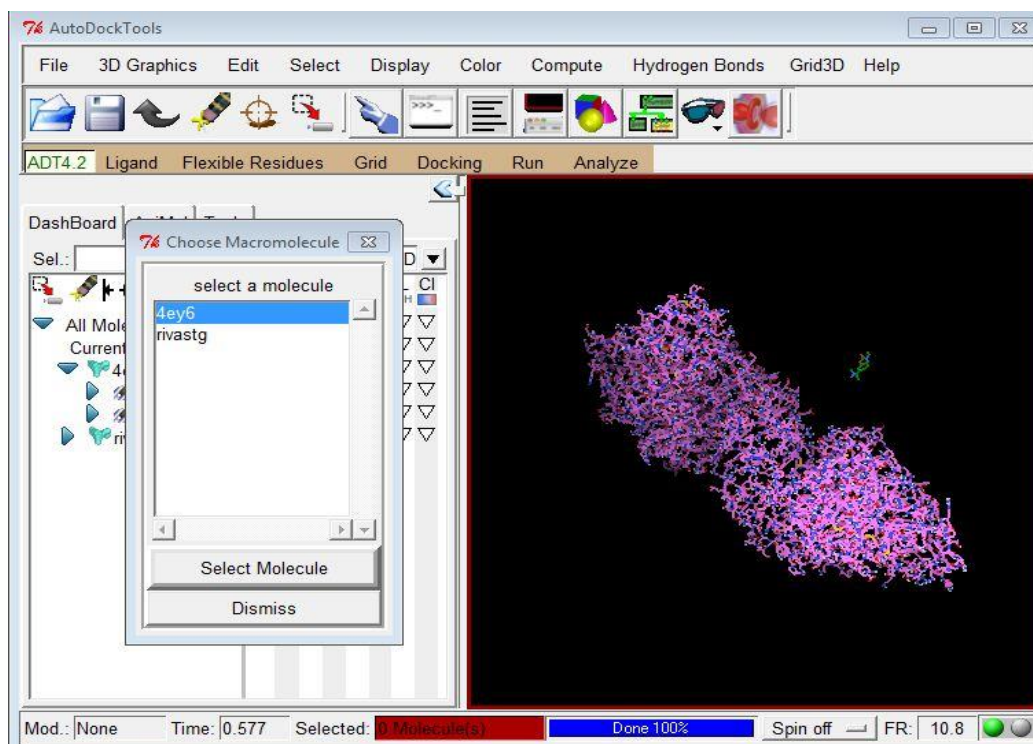


Figure 50: Choix l'enzyme 4ey6 comme macromolécule.

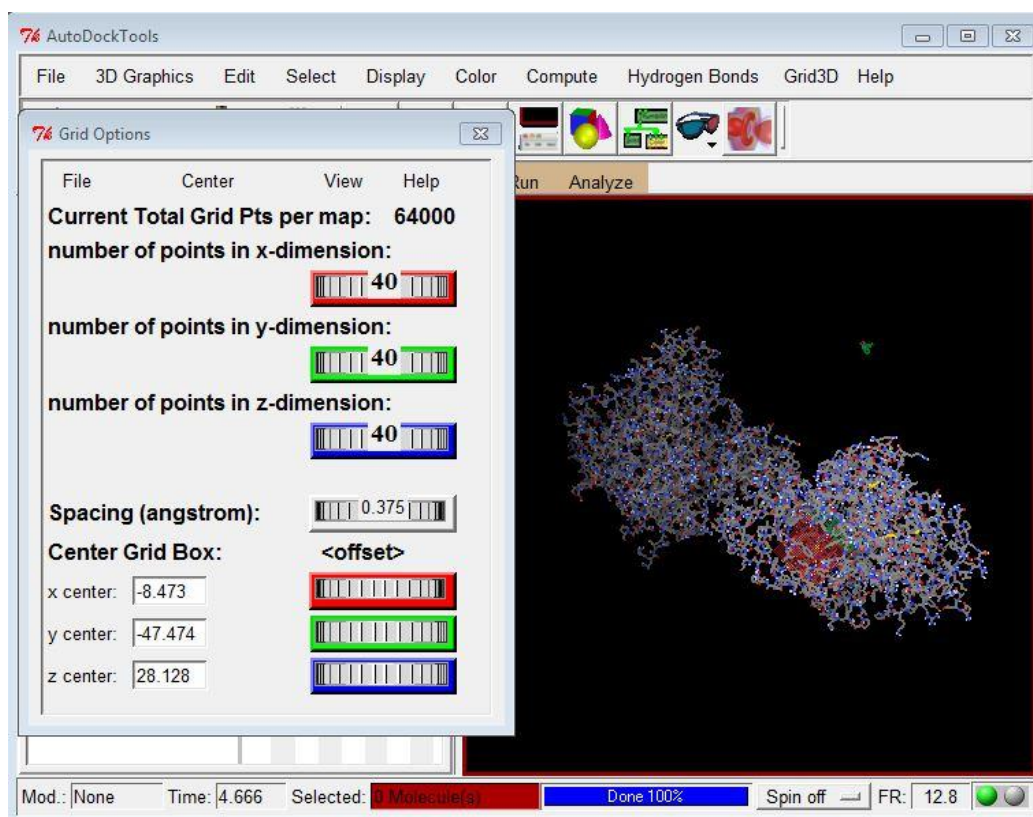


Figure 51: Grid Box et définition des différents paramètres.

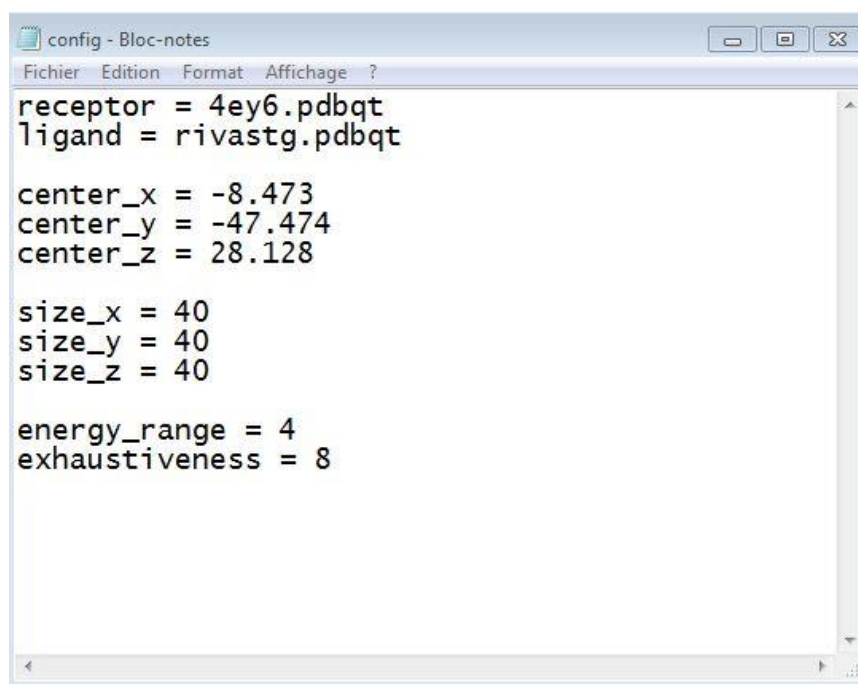
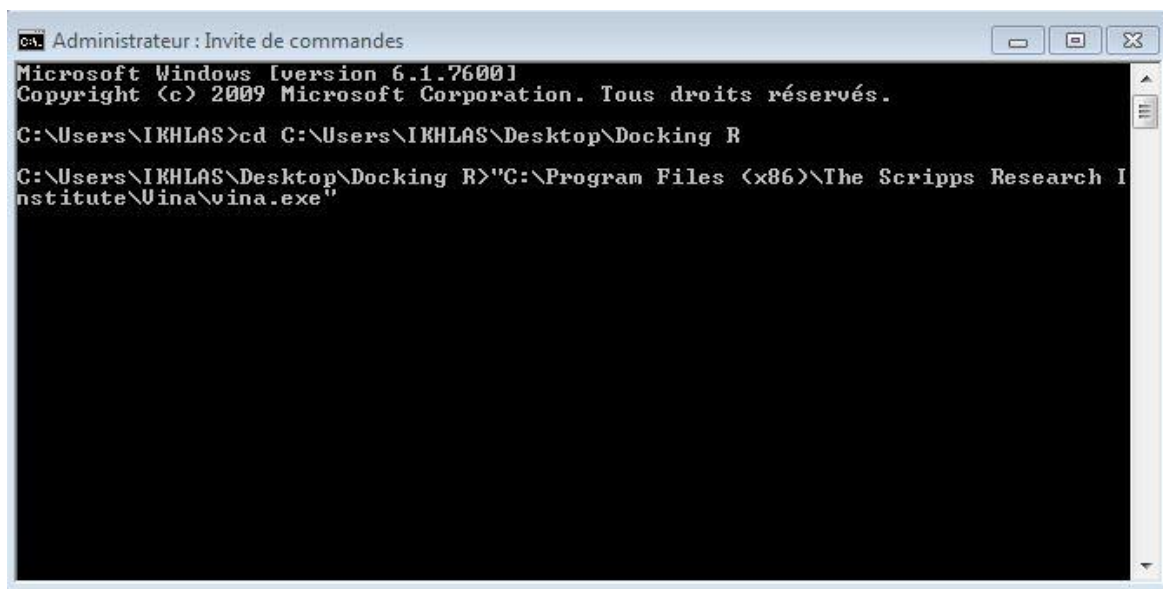


Figure 52: Création d'un fichier texte nommé « config.txt », qui contient toutes les informations nécessaires pour le docking.

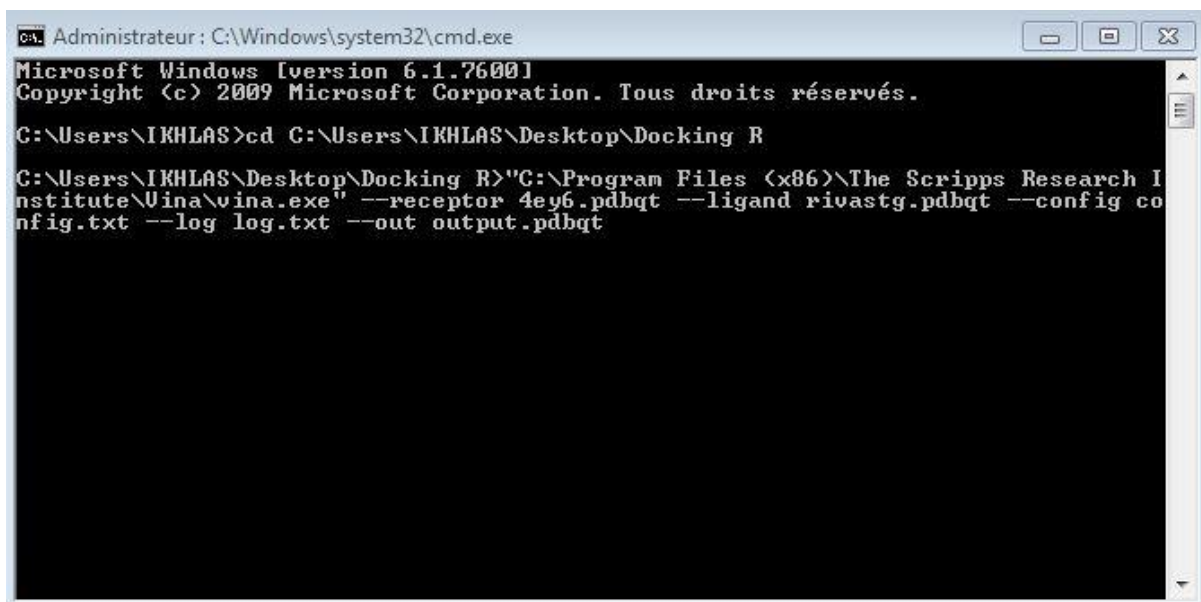
Energy_range : C'est la différence d'énergie (Score de docking) maximale entre la première (la meilleur) et la dernière pose ou conformère (ou mode de fixation) établie lors du docking. Ici définit par défaut par le logiciel à 4Kcal/mol car habituellement la différence n'excède pas cette limite pour un nombre de 10-15 poses.



```
CA: Administrateur : Invite de commandes
Microsoft Windows [version 6.1.7600]
Copyright (c) 2009 Microsoft Corporation. Tous droits réservés.

C:\Users\IKHLAS>cd C:\Users\IKHLAS\Desktop\Docking R
C:\Users\IKHLAS\Desktop\Docking R>"C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe"
```

Figure 53: Ouverture de la commande d'introduction des liens des dossiers nécessaires au docking.



```
CA: Administrateur : C:\Windows\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [version 6.1.7600]
Copyright (c) 2009 Microsoft Corporation. Tous droits réservés.

C:\Users\IKHLAS>cd C:\Users\IKHLAS\Desktop\Docking R
C:\Users\IKHLAS\Desktop\Docking R>"C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe" --receptor 4ey6.pdbqt --ligand rivastg.pdbqt --config config.txt --log log.txt --out output.pdbqt
```

Figure 54: Spécification des fichiers nécessaires au docking des fichiers.

Le fichier « log.txt » contiendra les résultats du docking.

Le fichier « output.pdbqt » contiendra les différentes conformations ou poses.

```

Administrateur : Invite de commandes - "C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina...
nfig.txt --log log.txt --out output.pdbqt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1257292096
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****

```

Figure 55: Exécution des calculs du docking moléculaire.

```

Administrateur : C:\Windows\system32\cmd.exe
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1555193940
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
done.
Refining results ... done.
mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
1 | -7.3 | 0.000 | 0.000
2 | -7.2 | 2.690 | 6.133
3 | -6.9 | 4.733 | 6.145
4 | -6.6 | 6.660 | 8.603
5 | -6.3 | 21.254 | 24.951
6 | -6.3 | 9.454 | 11.422
7 | -6.2 | 21.987 | 25.638
8 | -6.1 | 9.123 | 12.050
9 | -6.1 | 7.861 | 9.517
Writing output ... done.

```

Figure 56: Résultats du docking moléculaire.

Les différentes poses sont classées par affinité décroissante (de la meilleure qui possède la plus grande affinité jusqu'à la plus faible).

A la fin du docking nous aurons neuf fichiers pdbqt pour chacune des neuf conformations et un fichier texte « log.txt » qui contient les scores correspondants.

Tableau II: Scores du docking

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-7.3	0.000	0.000
2	-7.2	2.690	6.133
3	-6.9	4.733	6.145
4	-6.6	6.660	8.603
5	-6.3	21.254	24.951
6	-6.3	9.454	11.422
7	-6.2	21.987	25.638
8	-6.1	9.123	12.050
9	-6.1	7.861	9.517

Trois valeurs sont attribuées pour chaque pose :

- Affinité : pour la cible en Kcal/mol;
- Valeurs du RMSD (l'écart quadratique moyen) qui sont calculées par rapport à la meilleure pose (le premier modèle) et n'utilisent que des atomes lourds mobiles (c.-à-d. seulement des atomes du ligand sans les hydrogènes). RMSD u.b (upper bound=limite supérieure) fait correspondre chaque atome dans une conformation à lui-même dans la première conformation, ignorant toute symétrie. RMSD l.b (lower bound=limite inférieure) fait correspondre chaque atome d'une conformation au plus près atome de même type élémentaire dans la première conformation.

1.1.2.3 Visualisation des résultats

Nous avons utilisé le programme « BIOVIA Discovery Studio » pour visualiser en 3D les différentes interactions formées entre les différents ligands et le site actif de la cible.

Les étapes de visualisation des différentes interactions entre la Rivastigmine et AChE sont représentées dans les figures ci-dessous.

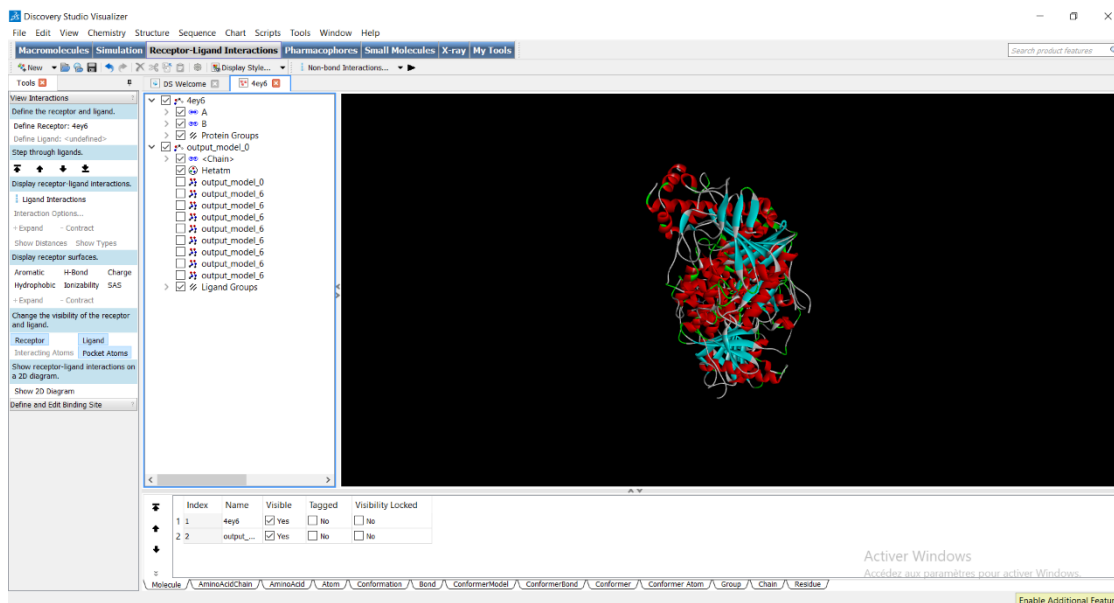


Figure 57 : Macromolécule (4EY6) et le fichier output du ligand sur le programme.

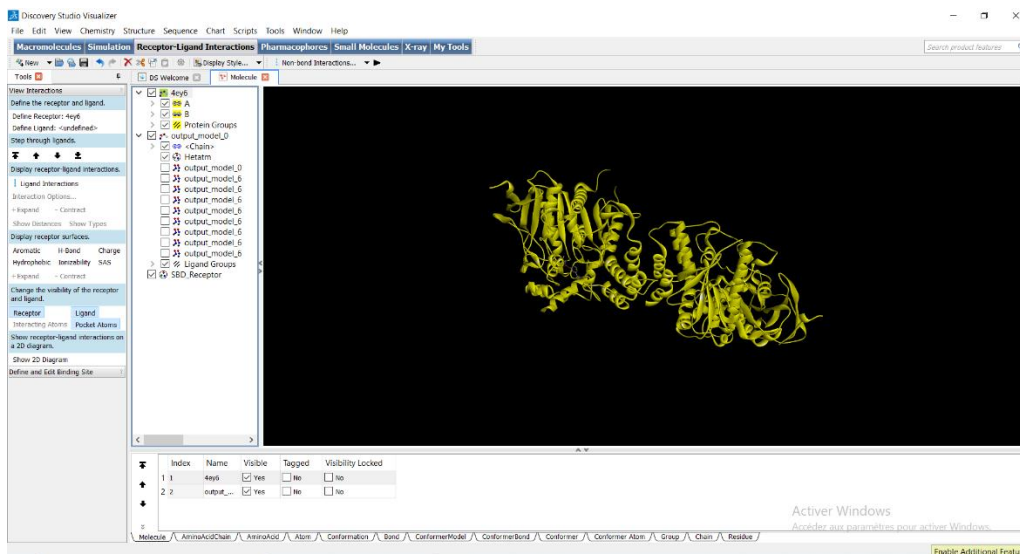


Figure 58: Définition de la macromolécule comme récepteur

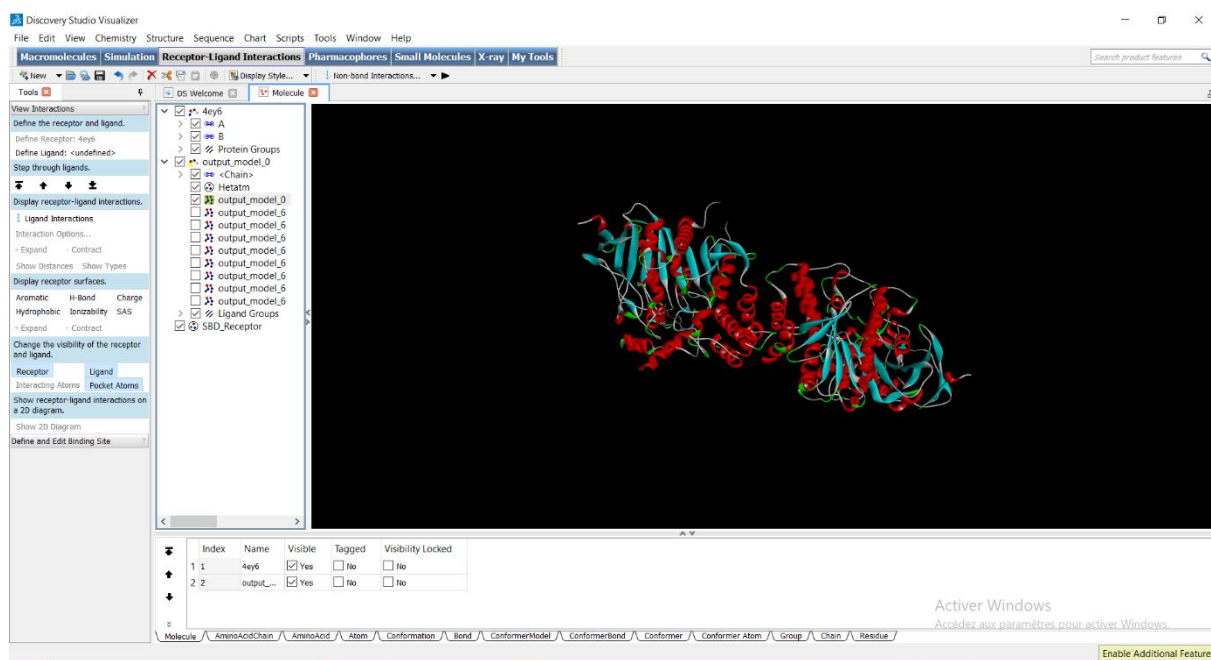


Figure 59: Définition du modèle 0 (meilleure pose) comme ligand.

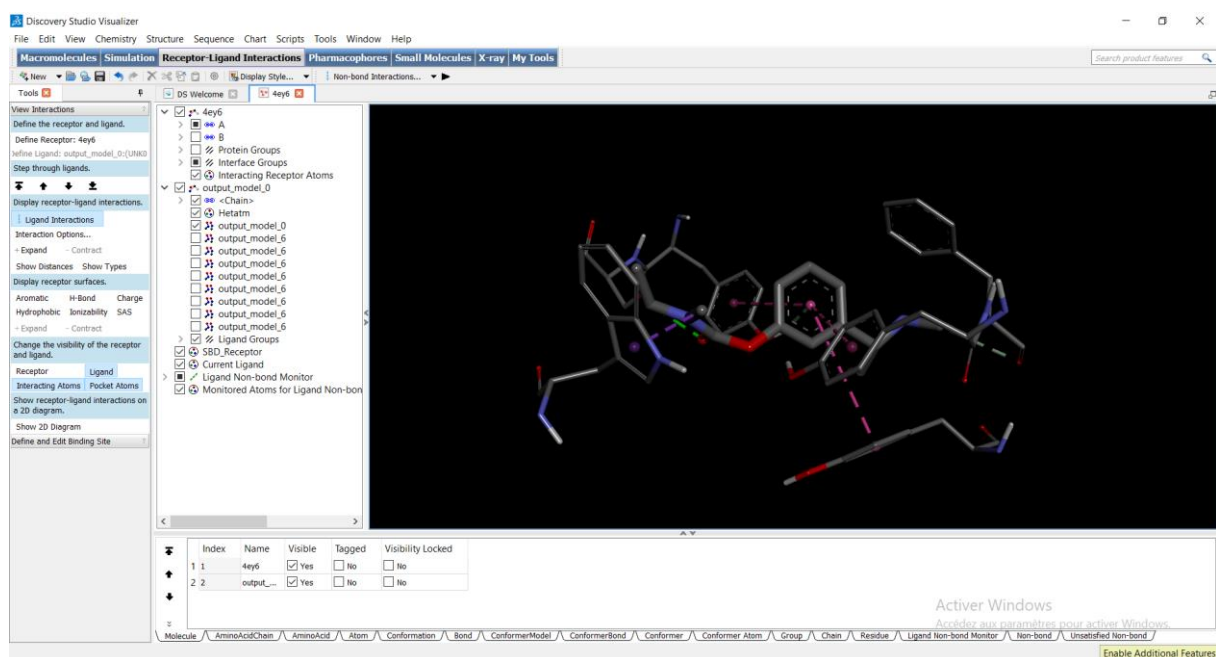


Figure 60: Visualisation de l'interaction du ligand avec le récepteur.

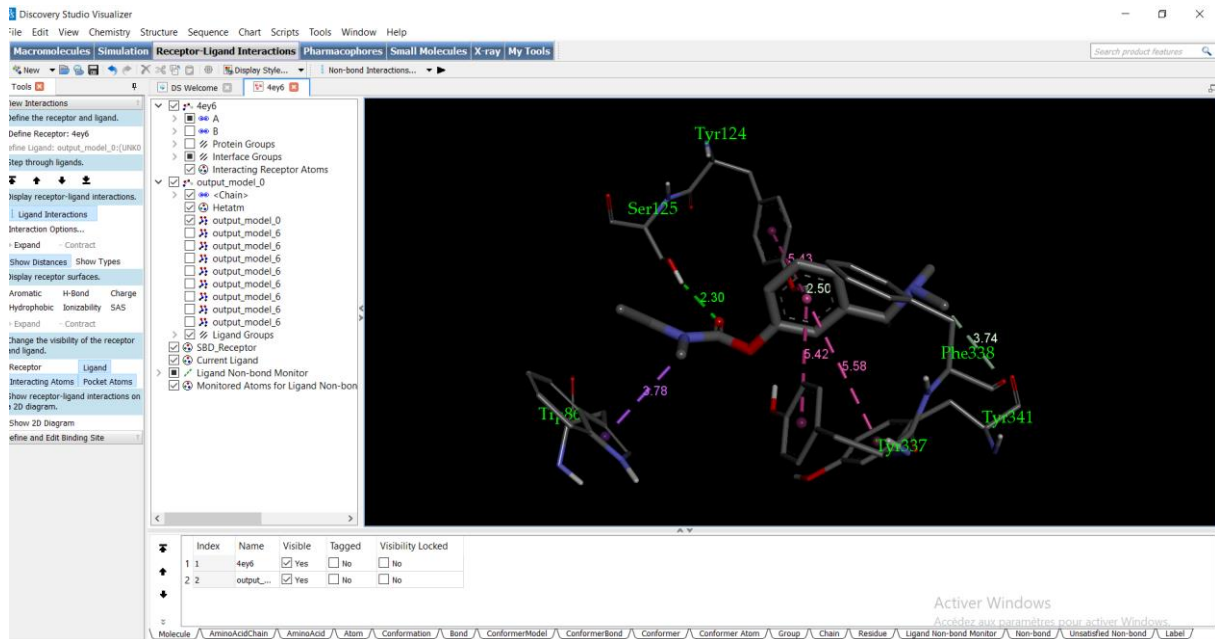


Figure 61: Visualisation des distances et les acides aminés en interaction en 3D.

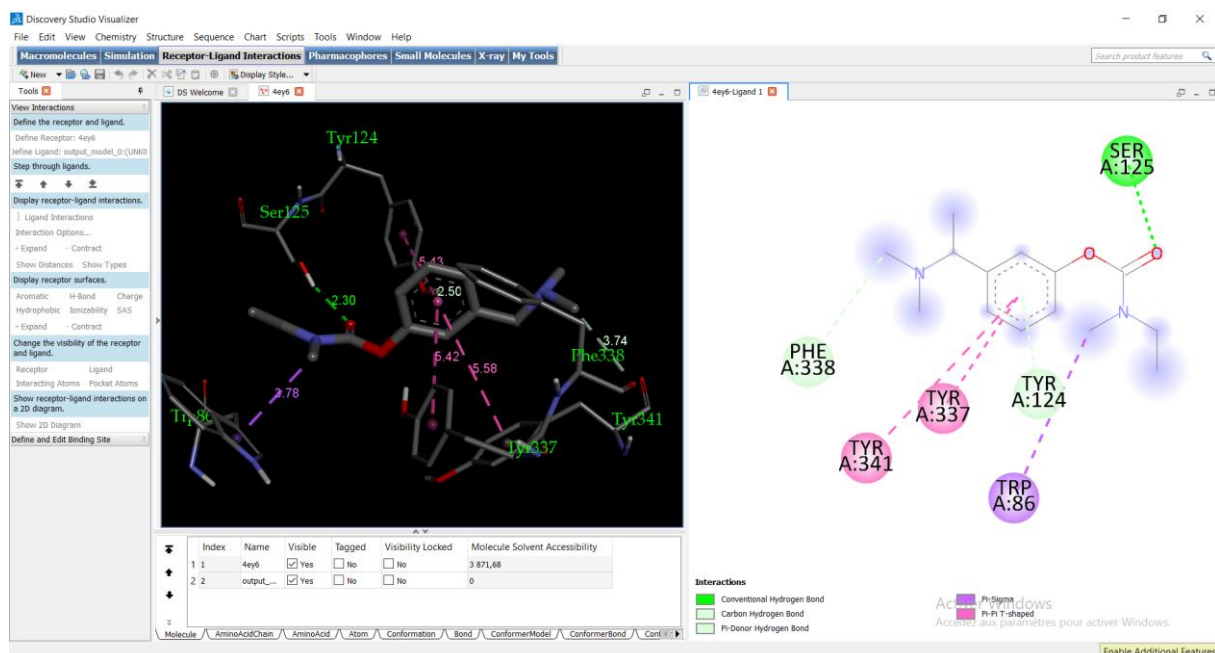


Figure 62: Visualisation du diagramme en 2D des acides aminés en interaction.

1.1.2.4 Validation du protocole de docking

Avant de procéder au docking des ligands proposés, le protocole doit être validé et la fiabilité des logiciels utilisés doit être vérifiée.

La validation du protocole de docking passe par deux étapes : le re-docking et la classification de précision du positionnement basée sur les interactions (ligand/cible).

a. Redocking

Le RMSD entre deux poses est une mesure géométrique de la distance entre les positions atomiques de la structure expérimentale et celles de la structure prédite du complexe ligand / site de liaison [110].

Pour réaliser un calcul de RMSD, le ligand co-cristallisé d'une cible donnée est extrait et repositionné par docking dans le site actif. C'est ce qu'on appelle en anglais le « cognate redocking » ou encore « self docking ». Il a pour but la détermination de la capacité du protocole de docking à générer une pose avec un positionnement dans le site d'interaction identique ou très proche à celui de la structure cristallographique originale [110, 111].

Les meilleurs protocoles du docking génèrent des valeurs RMSD inférieures à 2 Å, cette valeur est un seuil au-dessus duquel la précision du positionnement est considérée mauvaise, et le protocole de docking non validé.

Pour notre étude, le calcul de la valeur RMSD est effectué avec AutoDock Vina (ADV) en appliquant le protocole du docking décrit précédemment avec définition du galantamine co-cristallisé comme ligand de référence.

a.1 Identification du site de liaison

Pour définir l'espace de recherche (taille et position du centre de la grille) il y a plusieurs méthodes.

- L'élimination des ligands co-cristallisés à l'exception de la galantamine est une étape commune pour toutes les méthodes. Nous avons utilisé le logiciel pymol dans cette étape.

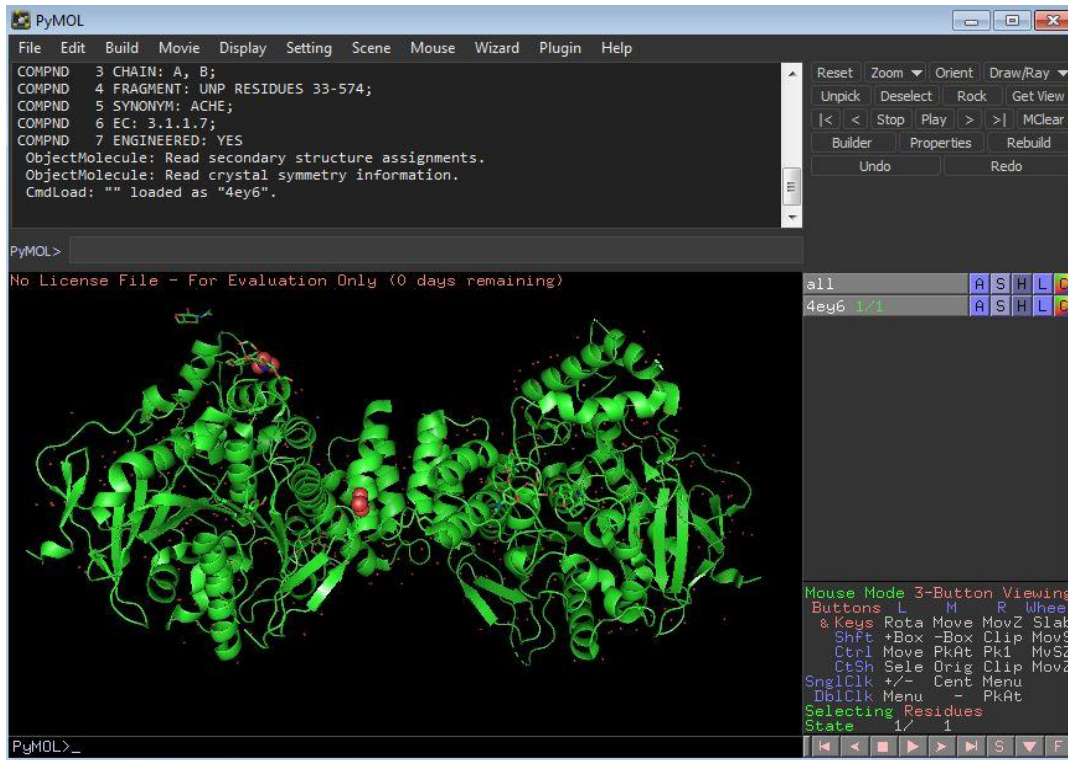


Figure 63: Structure cristalline de l'acétylcholinestérase sur pymol.

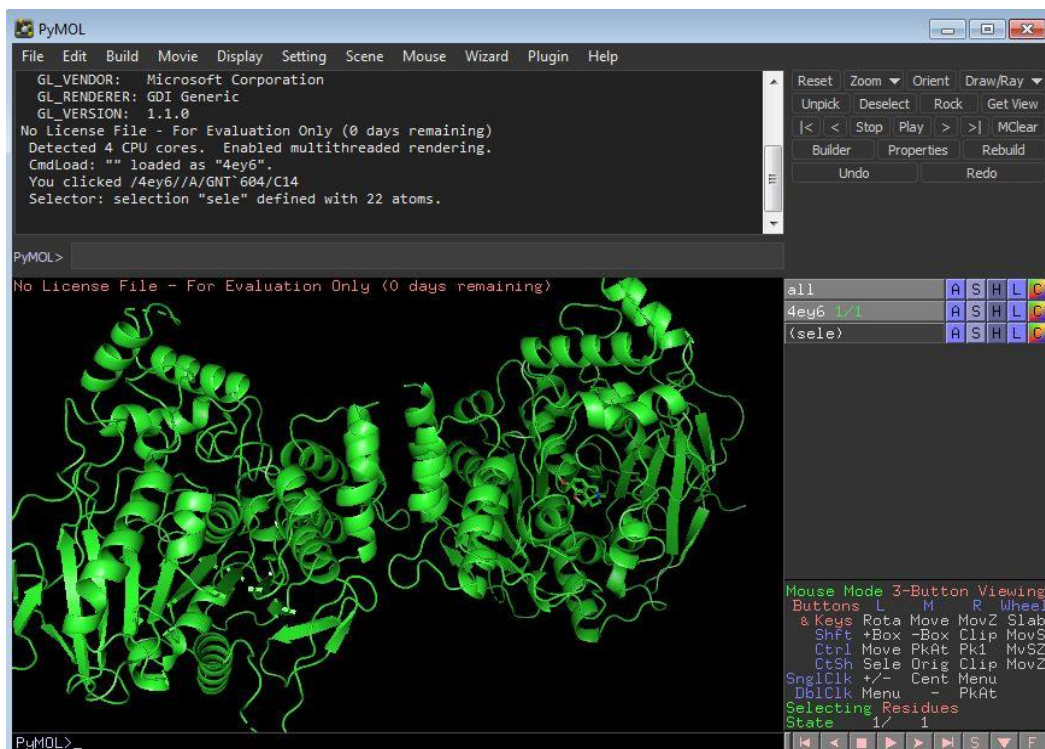


Figure 64: Elimination de tous les ligands co-cristallisés à l'exception de la galantamine.

- Première méthode : Utilisation du programme AutoDock Tools.

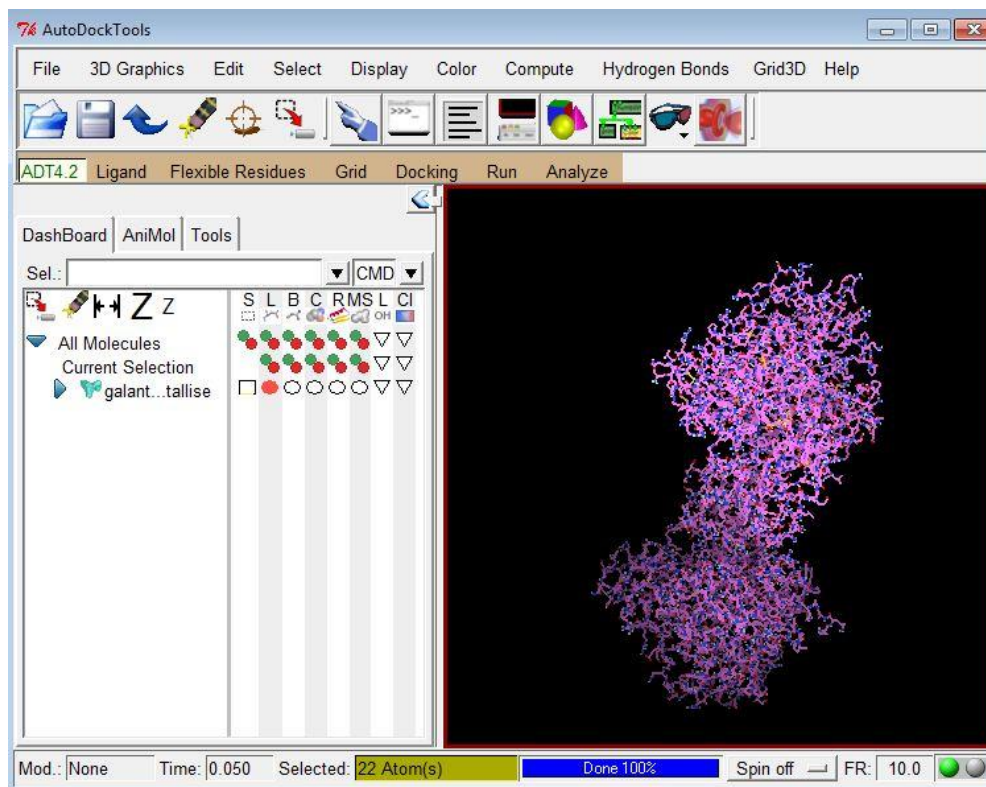


Figure 65: Ouverture du complexe sur AutoDock Tools.

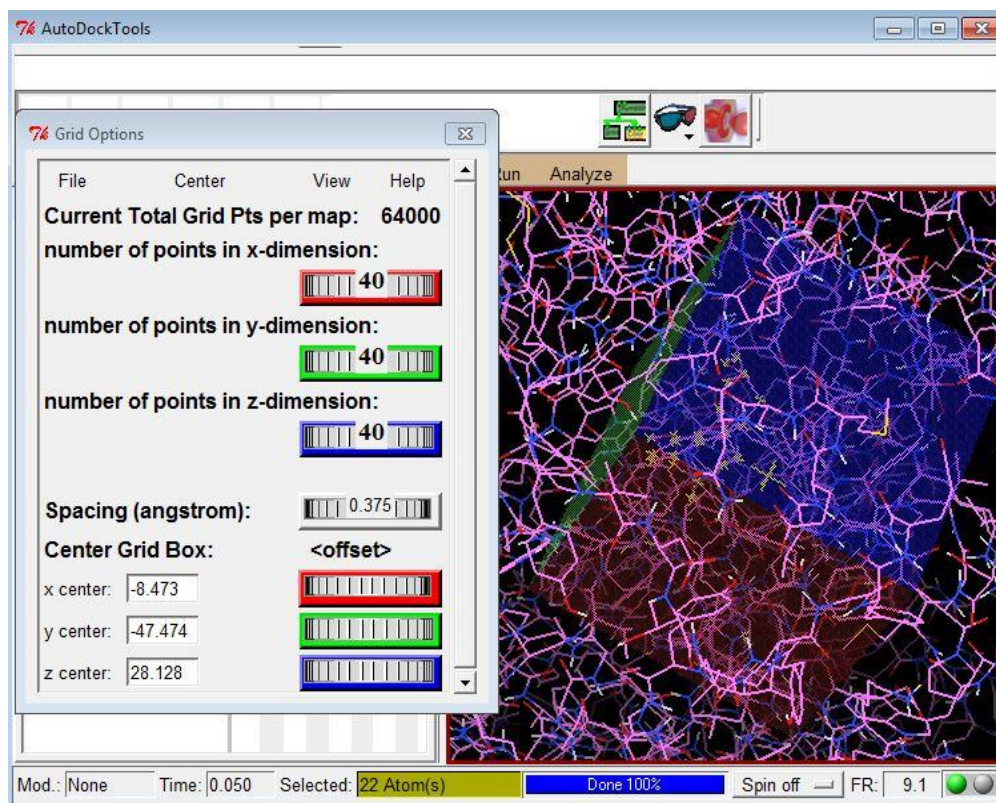


Figure 66: Identification du site de liaison par AutoDock Tools (méthode 1).

- Deuxième méthode : Utilisation de deux logiciels BIOVIA Discovery Studio et AutoDock Tools.

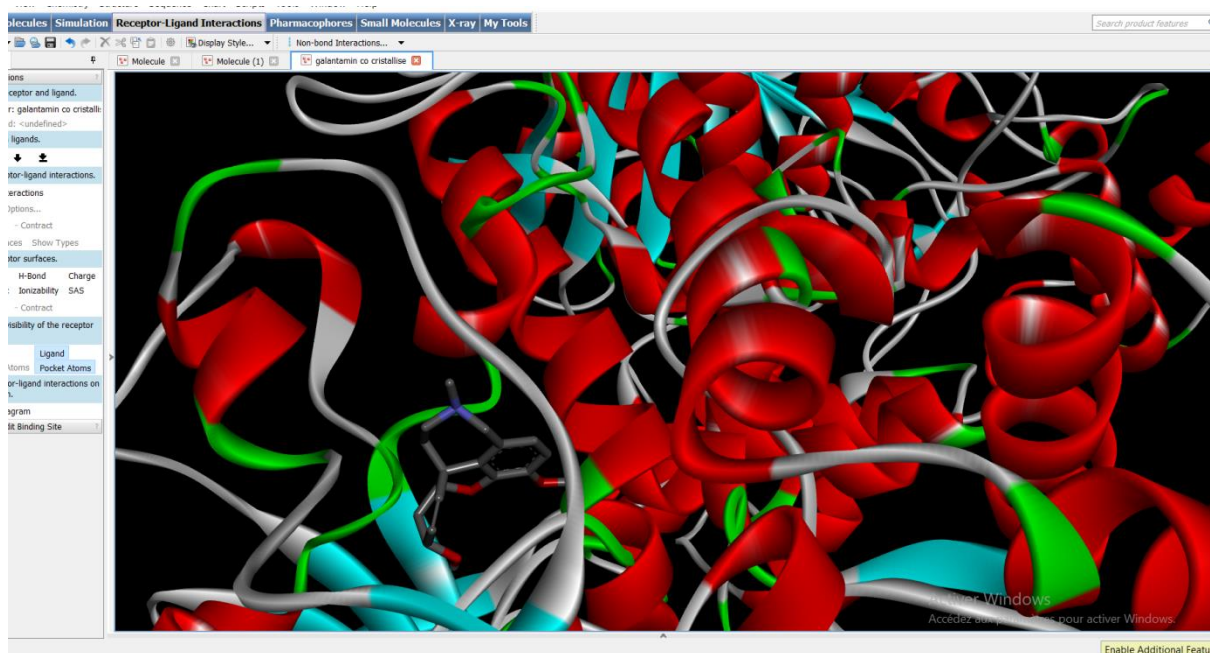


Figure 67: Ouverture du complexe sur BIOVIA Discovery Studio.

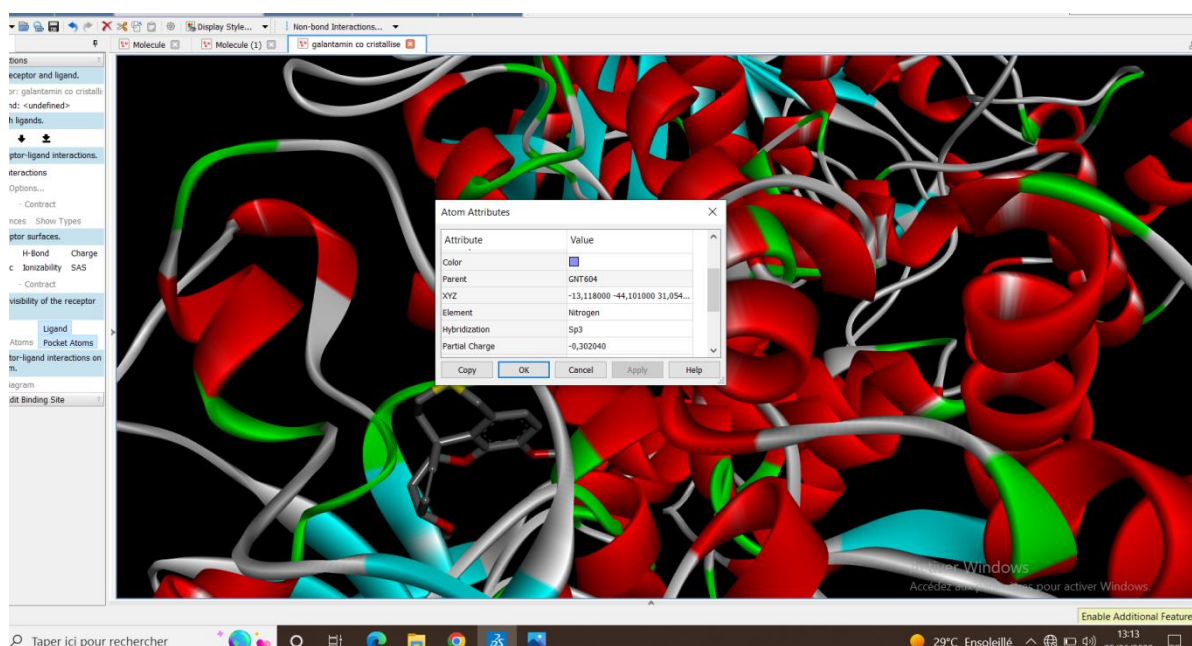


Figure 68: Identification des coordonnées X, Y et Z du centre de grid box par l'utilisation de BIOVIA Discovery Studio.

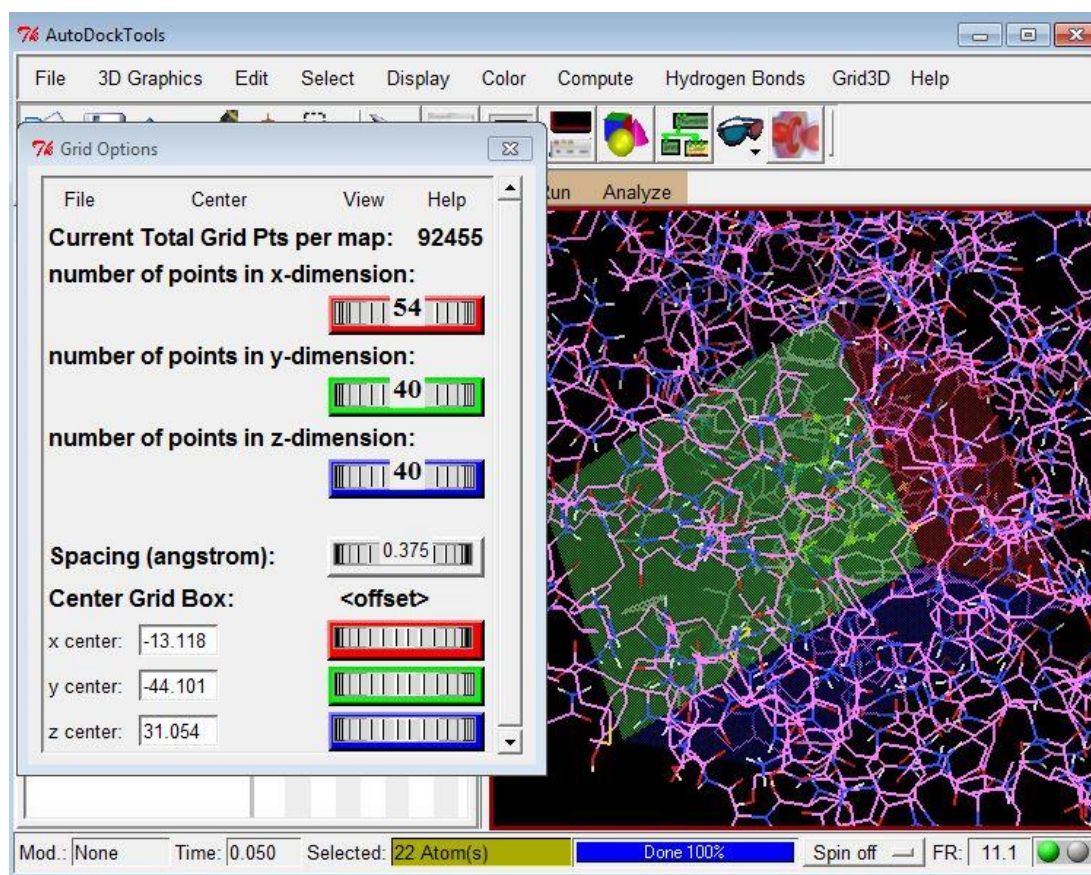


Figure 69: Identification du site d'interaction par AutoDock Tools (méthode 2).

a.2 Calcul du RMSD (Redocking)

Nous avons réalisé le redocking en utilisant la galantamine optimisée par ChamDraw.

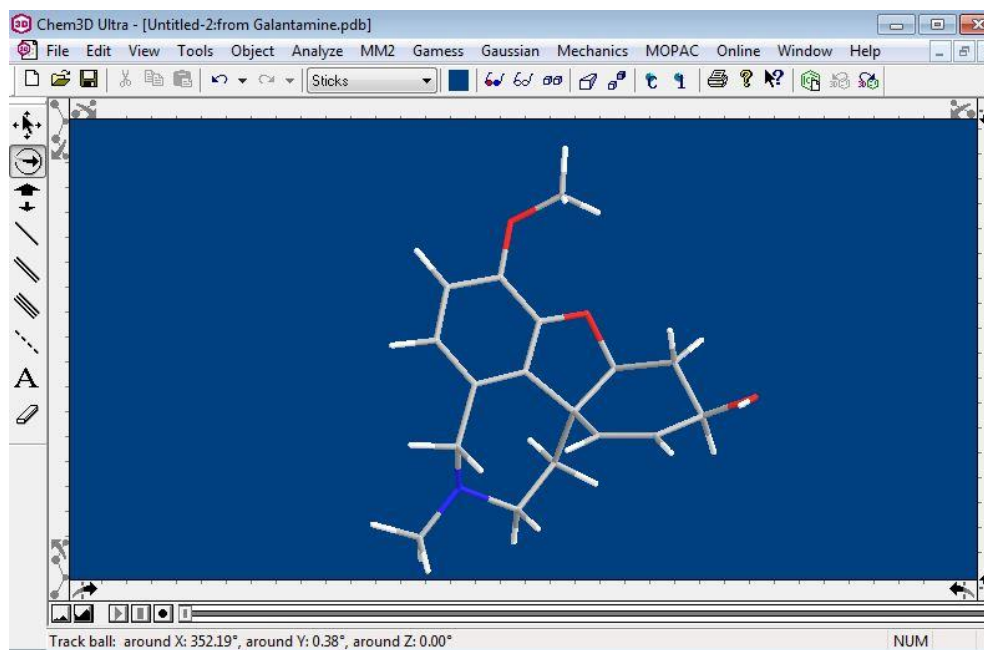


Figure 70: Format pdb de la galantamine optimisée par ChamDraw.

- Redocking selon les résultats de la méthode 1

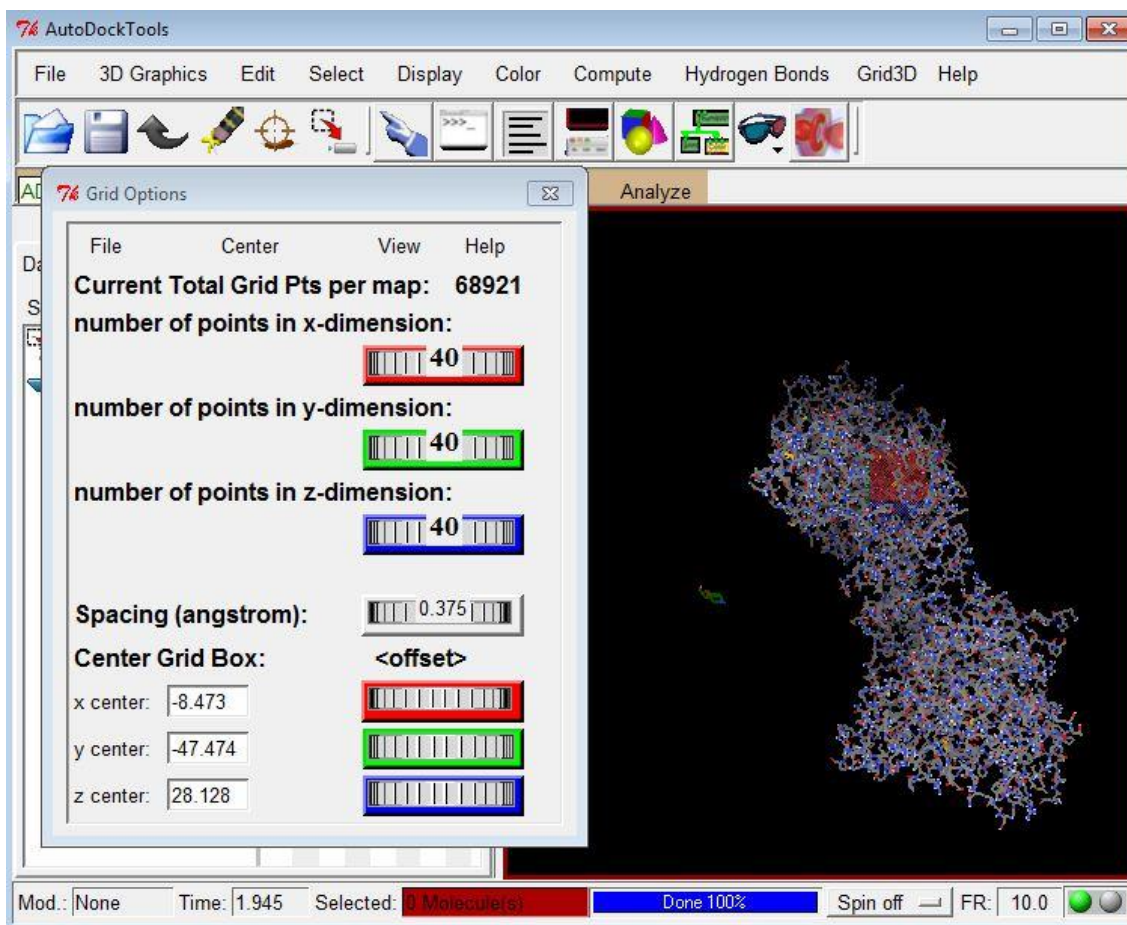


Figure 71: Position de la boîte de docking (Grid box) dans le site actif de l'AChe (méthode 1).

```

C:\Users\IKHLAS>cd C:\Users\IKHLAS\Desktop\Re-docking 1
C:\Users\IKHLAS\Desktop\Re-docking 1>"C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe" --receptor 4ey6.pdbqt --ligand Galantamine.pdbqt --config config.txt --log log.txt --out output.pdbqt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ...

```

Figure 72: Lancement du redocking (méthode 1).

Tableau III: Résultats du redocking (méthode 1).

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-9.8	0.000	0.000
2	-8.4	2.903	5.842
3	-7.9	2.657	4.687
4	-7.6	9.184	11.256
5	-7.5	20.012	21.797
6	-7.4	2.413	4.493
7	-7.4	1.956	4.910
8	-7.3	2.506	5.018
9	-7.2	3.024	5.919

- Redocking selon les résultats de la deuxième méthode

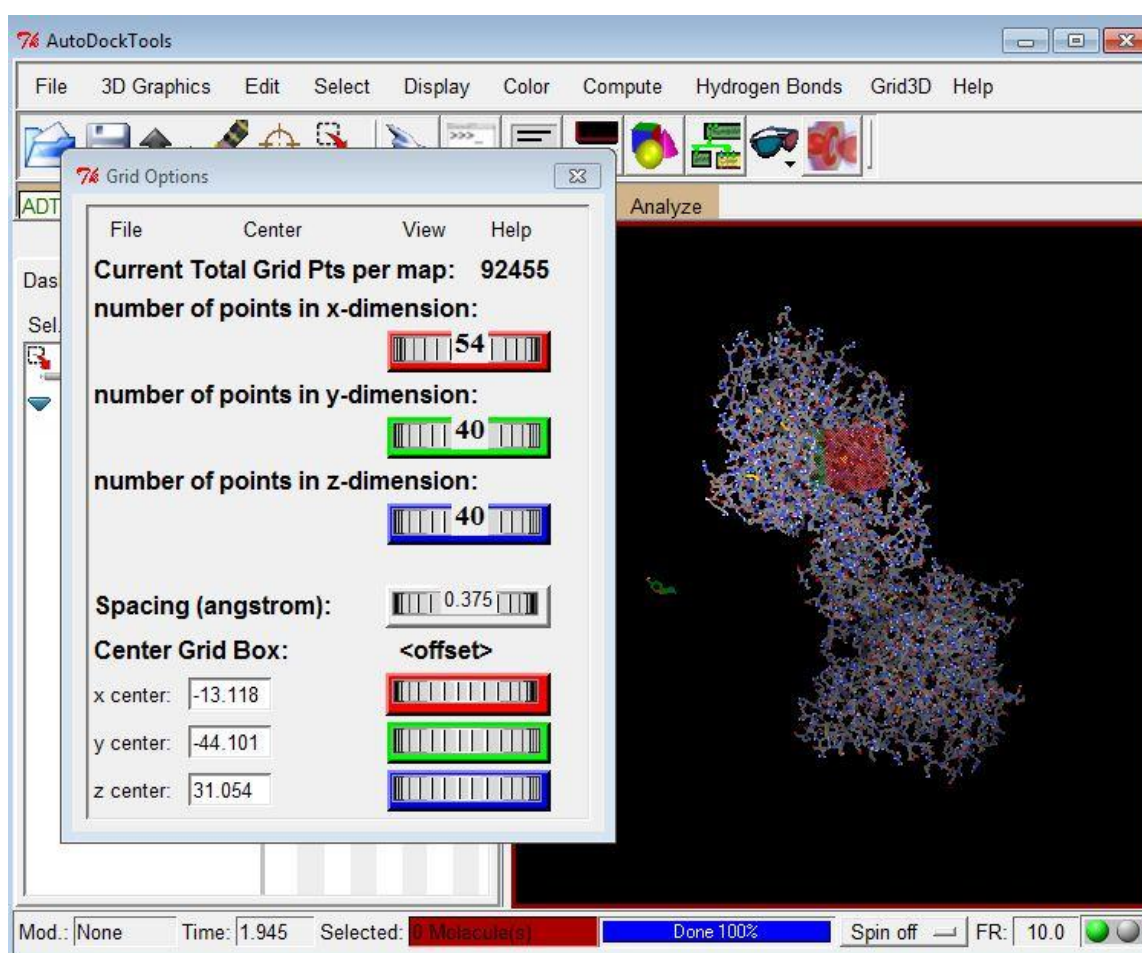


Figure 73: Position de la boîte de docking (Grid box) dans le site actif de l'ACh (méthode 2).

```

C:\Users\IKHLAS\Desktop\Re-docking 2>"C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe" --receptor 4ey6.pdbqt --ligand Galantamine.pdbqt --config config.txt --log log.txt --out output.pdbqt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ...

```

Figure 74: Lancement du redocking(méthode 2).

Tableau IV: Résultats du redocking (méthode 2).

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-9.8	0.000	0.000
2	-7.9	2.658	4.687
3	-7.6	9.154	11.223
4	-7.5	20.027	21.792
5	-7.5	9.552	11.911
6	-7.5	20.539	22.147
7	-7.0	21.273	22.818
8	-6.8	21.591	23.445
9	-6.8	16.483	19.013

a.3 Analyse visuelle des résultats du redocking

L'analyse visuelle est une étape complémentaire pour le test RMSD. Elle permet une meilleure appréciation des résultats obtenus par ce dernier et aide donc à juger la performance du programme de docking utilisé.

- Pour la première méthode

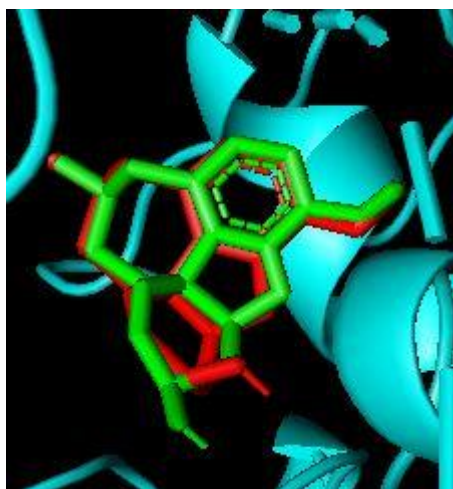


Figure 75: Résultats d'analyse visuelle par Pymol (Méthode 1)

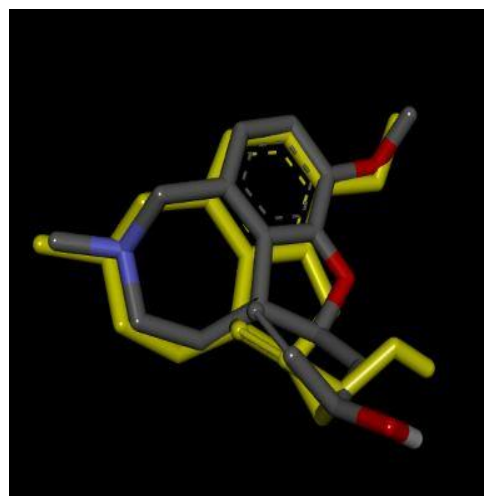


Figure 76: Résultats d'analyse visuelle par BIOVIA Discovery Studio (Méthode 1).

- Pour la deuxième méthode

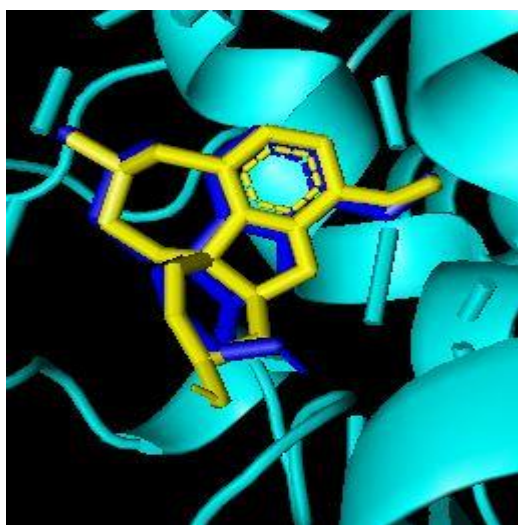


Figure 77: Résultats d'analyse visuelle par Pymol (Méthode 2).

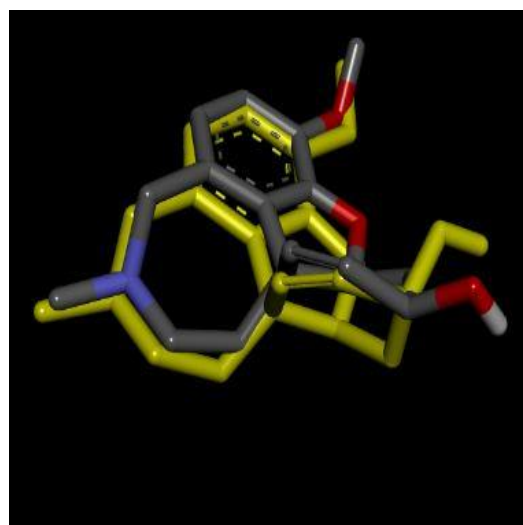


Figure 78: Résultats d'analyse visuelle Par BIOVIA Discovery Studio (Méthode 2).

Pour la suite de notre travail, nous avons utilisé les paramètres de la première méthode, qui sont le centre de la boîte déterminé par les coordonnées $X = -8.473$, $Y = -47.474$, $Z = 28.128$, les dimensions $40*40*40$, et la maille de la grille fixée par défaut à 0.375 \AA . La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés.

Nous avons retenu les résultats de la première méthode, car l'analyse visuelle nous a permis de noter que la superposition du ligand co-cristallisé et la pose générée est parfaite dans la méthode 1 comparée à la méthode 2.

Toutefois, le RMSD ne constitue pas un critère d'évaluation parfait et présente certaines faiblesses. Ainsi, le RMSD permet d'évaluer les distances entre les positions atomiques mais ne fournit aucune information sur la conservation des interactions entre la structure prédite et la structure cristallisée [112].

b. Classification de précision du positionnement basée sur les interactions «interactions-based accuracy classification (IBAC)»

Elle repose sur une inspection visuelle des structures co-cristallisées et prédites (générées). L'avantage de cette classification par rapport au RMSD est la prise en considération des interactions, elle débute par une inspection visuelle du complexe "ligand co-cristallisé-site d'interaction" pour déterminer précisément l'ensemble des interactions, suivie par celle du complexe "pose prédite-site d'interaction". Le positionnement de la pose prédite est correct si la conformation et son orientation ainsi que toutes les interactions clés sont similaires à celle de la structure du ligand co-cristallisé [113].

1.2 Etude in silico des propriétés ADMET

Étant donné que la pharmacocinétique inadéquate et la toxicité des composés candidats sont les principales raisons de l'échec du développement de médicaments, il est largement reconnu que l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité (ADMET) doivent être évalués le plus tôt possible. Les modèles d'évaluation in silico ADMET ont été développés comme un outil supplémentaire pour aider les chimistes médicaux dans la conception et l'optimisation de nouveaux composés. Dans notre travail, nous avons utilisé le serveur Web ADMETlab2.0, largement utilisé pour les prédictions de la pharmacocinétique et du profil toxicologique des produits chimiques, dont les critères d'évaluation liés à ADMET pris en charge sont environ le double du nombre de critères d'évaluation par rapport à d'autre plateforme en ligne, comprenant 17 propriétés physico-chimiques, 13 propriétés de chimie médicinale, 23 propriétés ADME, 27 paramètres de toxicité et 8 règles de toxicophore (751 sous-structures). Un cadre d'attention graphique multitâche a été utilisé pour développer les modèles robustes et précis dans ADMETlab 2.0. Le module de calcul par lots a été fourni en réponse à de nombreuses demandes d'utilisateurs, et la représentation des résultats a été

encore optimisée. Le serveur ADMETlab 2.0 est disponible gratuitement, sans inscription, sur <https://admetmesh.scbdd.com/> [114].

Dans notre étude, nous avons prédit quelques propriétés ADMET pour la rivastigmine et ses analogues proposés dans notre travail. Pour prédire les propriétés ADMET, nous avons suivi les étapes représentées dans les figures ci-dessous (Figures 79,80 et 81)

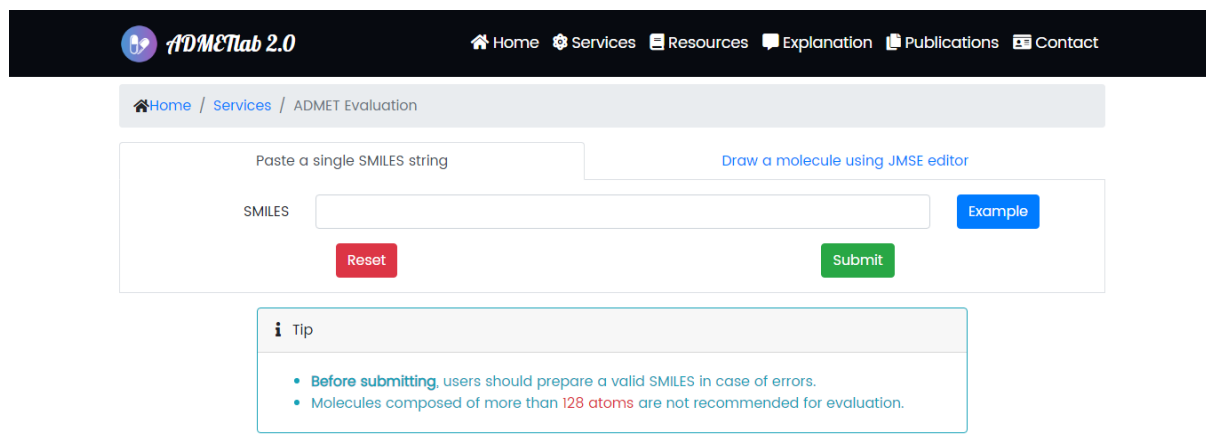


Figure 79: Ouverture de la fenêtre ADMET du serveur ADMETlab2.0.

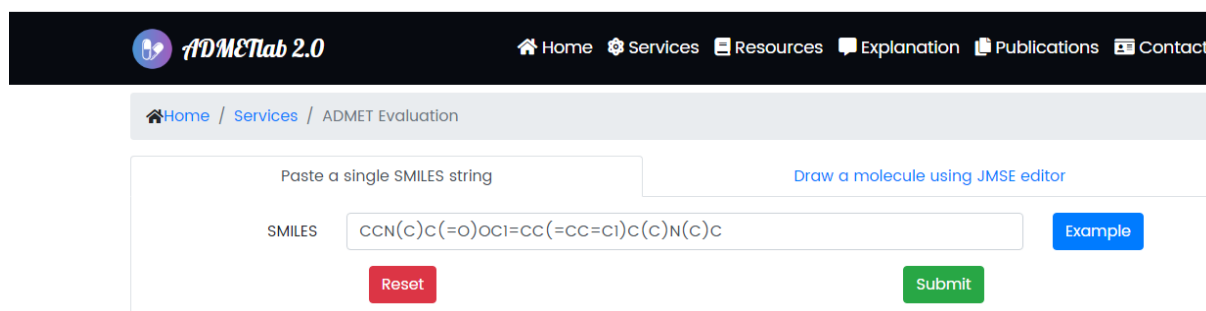


Figure 80: Importation du format smile de la molécule à partir de serveur SwissADME.

Le format SMILES (Simplified Molecular-Input Line-Entry System) permet la représentation d'une molécule comme une succession d'atomes et de liaisons.

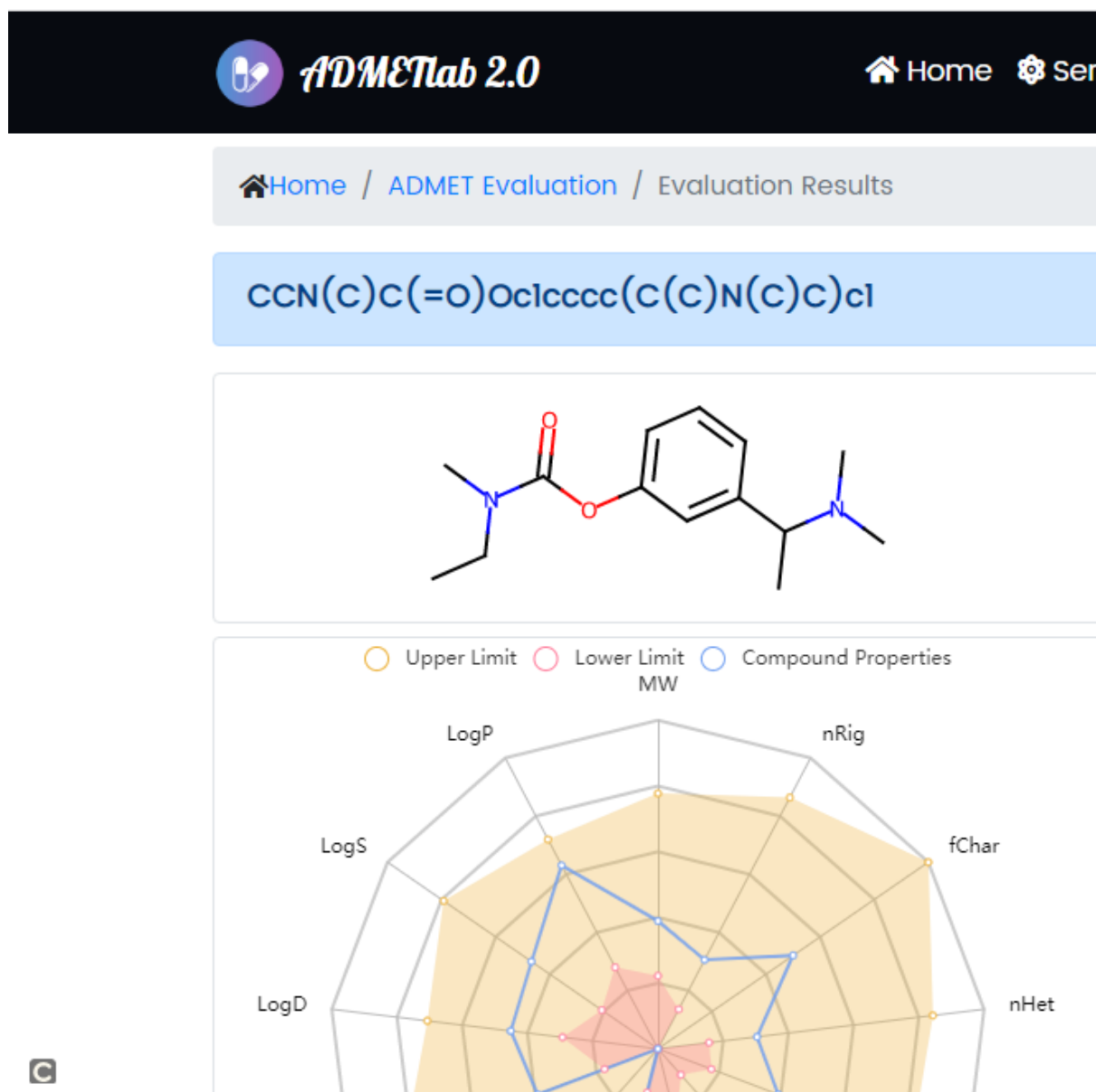


Figure 81: Soumission de la molécule pour la prédiction ADMET.

2 Résultats

2.1 Validation du protocole de docking

La validation du protocole de docking est une étape importante et indispensable. Dans notre travail, nous avons procédé initialement au calcul du RMSD par AutoDock Vina, avec définition de la galantamine co-cristallisée comme ligand de référence pour la cible « Acétylcholinestérase ».

La méthode « 1 » utilisée pour définir l'espace de recherche, détaillée dans le chapitre matériel et méthodes, a été retenue pour le reste des étapes de docking.

La simulation du re-docking a généré neuf poses, c'est la meilleure pose correspondant au meilleur score qui doit être retenue, le RMSD est largement inférieure à 2 (voir tableau V), donc notre protocole de docking avec les dimensions du GridBox retenues est validé et peut être utilisé pour évaluer l'affinité pour la cible pour les différentes molécules proposées dans notre travail.

Afin d'enrichir cette partie de validation, nous avons visualisé aussi les résultats de la 7^{ème} pose pour laquelle le RMSD est inférieure à 2 (voir tableau V) afin de faire une comparaison avec la première pose (Figures 84 et 85).

Tableau V: Valeur RMSD obtenue par ADV

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-9.8	0.000	0.000
2	-8.4	2.903	5.842
3	-7.9	2.657	4.687
4	-7.6	9.184	11.256
5	-7.5	20.012	21.797
6	-7.4	2.413	4.493
7	-7.4	1.956	4.910
8	-7.3	2.506	5.018
9	-7.2	3.024	5.919

L'analyse visuelle des résultats obtenus par « BIOVIA Discovery Studio » et « Pymol » a montre une très bonne superposition de ligand co-cristallisé (galantamine) avec la meilleure pose retenue générée par Auto Dock Vina (Figures 82 et 83).

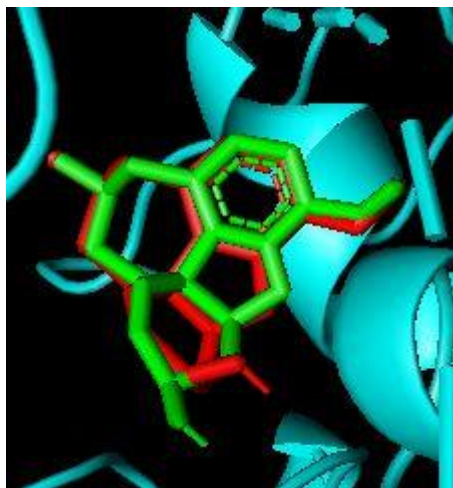


Figure 82: Superposition de galantamine co-cristallisée (coloré en rouge) et la 1^{ère} pose générée (coloré en vert) obtenue par pymol

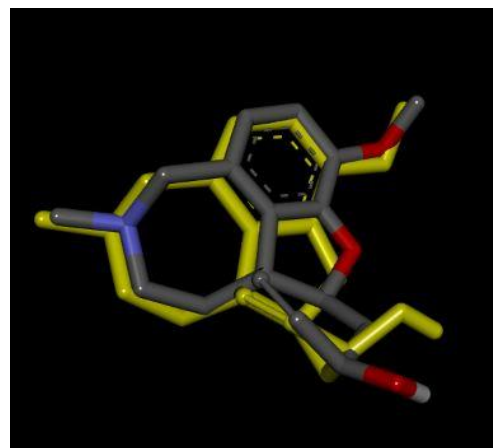


Figure 83: Superposition de galantamine co-cristallisée (coloré en jaune) et la 1^{ère} pose générée (coloré par type d'atomes) obtenue par BDS

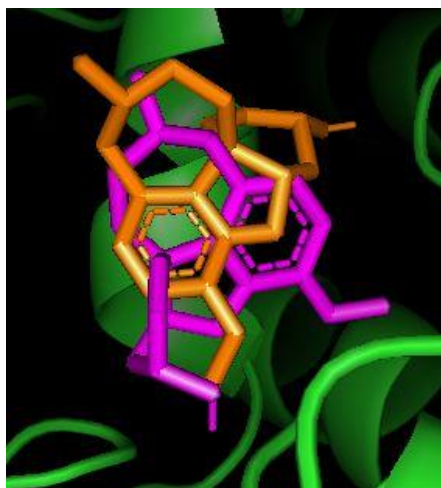


Figure 84: Superposition de galantamine co-cristallisée (coloré en magenta) et la 7^{ème} pose générée (coloré en orange) obtenue par pymol.

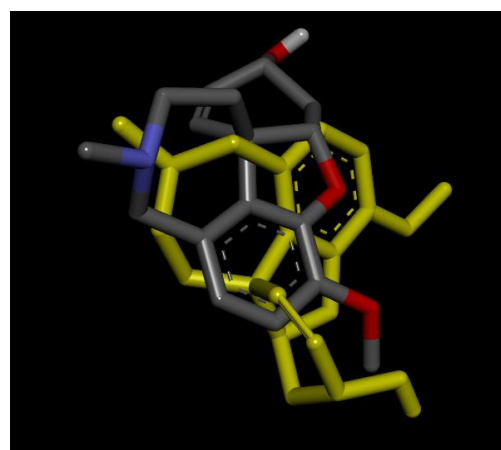


Figure 85: Superposition de galantamine co-cristallisée (coloré en jaune) et la 7^{ème} pose générée (coloré par type d'atomes) obtenue par BDS.

Ensuite, nous sommes passées à l'inspection visuelle des complexes ; ligand co-cristallisé-site d'interaction et meilleure pose générée-site d'interaction, afin de déterminer l'ensemble des interactions mises au point.

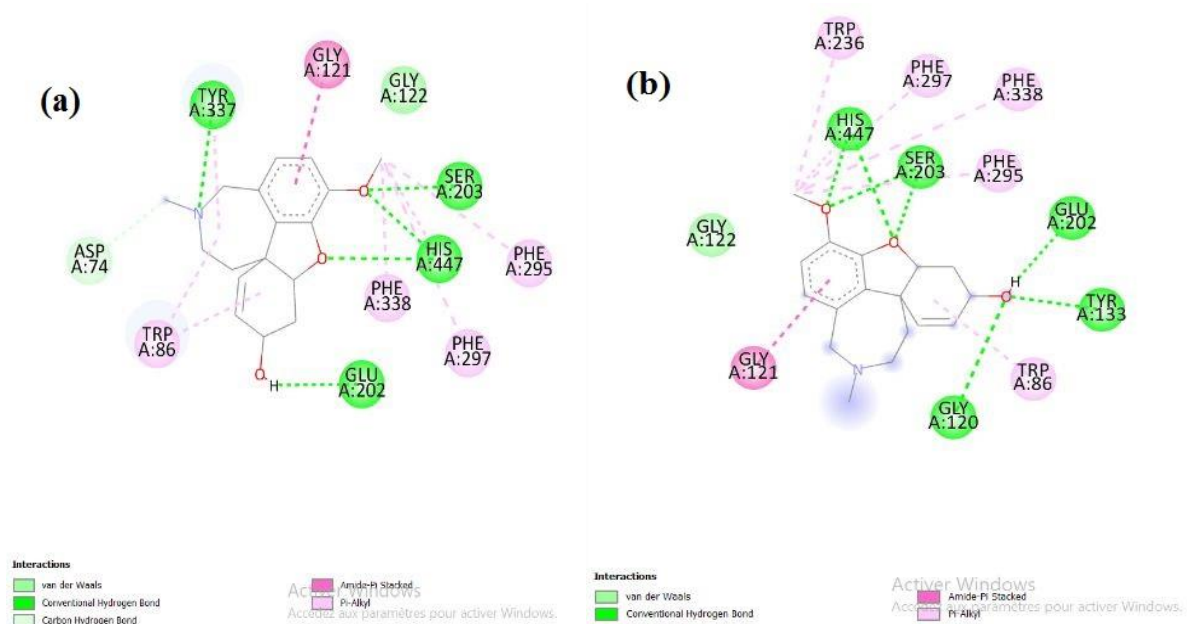


Figure 86: Visualisations des interactions de galantamine co-cristallisée (a) et celles de la meilleure pose (b) dans le site actif par BDS.

En visualisant le site d'interactions de l'acétylcholinestérase, le ligand co-cristallisé galantamine a montré une bonne affinité avec les résidus du site actif et notamment les résidus catalytiques (Ser 203, His 447 et Glu 334). Cette affinité qui est à l'origine de son potentiel inhibiteur, se traduit par la formation des liaisons hydrogène avec Glu 202, Ser 203, Tyr 337 et His 447, une seule liaison carbon hydrogen avec Asp 74. La Gly 121 forme une liaison amide π stacked avec le ligand. Adv a prédit aussi 4 liaisons de type π alkyl avec les résidus suivants : Trp 86, Phe295, Phe297 et Phe 337. Le complexe (galantamine/AChE) est stabilisé par une interaction de type Van der Waals avec le résidu Gly 122 (Voir le tableau VII).

Tableau VI: Triade catalytique de différents types de l'acétylcholinestérase.

Acides aminés \ Triade catalytique	Triade catalytique de TCACHÉ [38]	Triade catalytique d'AChE humaine [115]	Résultats obtenus de galantamine optimisé
His	A : 440	A : 447	A : 447
Ser	A : 200	A : 203	A : 203
Glu	A : 327	A : 334	A : 202

En inspectant également les résidus en interaction avec la meilleure pose générée, nous constatons qu'elle interagit de la même manière que le ligand co-cristallisé avec la formation des liaisons hydrogène avec le site actif de cible : Gly 120, Tyr 133, Glu 202, Ser 203 et His 447. Une liaison de type Van der waals avec la Gly 122 ainsi que une seule liaison amides π stacked avec la Gly 121. Et enfin des liaisons π - alkyl avec Trp 86, Phe 295, Phe 297 et Phe 338 (Voir le tableau VII).

Les caractéristiques de chaque liaison établie entre le site d'interaction de la cible et les ligands (galantamine co-cristallisée et la meilleure pose générée) sont résumées sur le tableau suivant :

Tableau VII: Caractéristiques des liaisons formées entre le site d'interaction de la cible et les ligands (galantamine co-cristallisée et la meilleure pose générée).

Molécules	Affinité	Groupement ou atome de la Galantamine	Acide aminé du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons
Galantamine optimisée par ChemDraw (meilleure pose)	-9.8		Gly A : 122		Var der waals
		-O-H	Gly A : 120	3.01	Conventional hydrogen bond
		-O-H	Tyr A : 133	2.15	
		-O-H	Glu A : 202	2.06	
		O de pentacycle	Ser A : 203	2.40	
		OCH3		2.47	
		O de pentacycle	His A : 447	2.81	
		OCH3		2.98	
		Cycle aromatique	Gly A : 121	3.82	Amides π stacked
		Cycle-O	Trp A : 86	1) 4.68 2) 5.16	π alkyl
		OCH3	Trp A : 236	4.31	
		OCH3	Phe A : 295	4.56	
OCH3	Phe A : 297	4.47			
OCH3	Phe A : 338	5.42			

Molécules	Affinité	Groupement ou atome de la Galantamine	Acide aminé du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons
Galantamine co-cristallisée			Gly A : 122		Van der Waals
		Cycle-O-H	Glu A : 202	1.76	Conventional hydrogen bond
		Cycle-O-	Ser A : 203	2.22	
		Cycle N-	Tyr A : 337	2.18	
		O de pentacycle	His A : 447	3.10	
		Cycle-OCH3		2.71	Carbon hydrogen bond
		Cycle N-	Asp A : 74	3.72	
		Cycle aromatique	Gly A : 121	4.13	Amides π stacked
		Deux cycles aromatiques	Trp A : 86	1) 4.16 2) 4.52 4.61	π alkyl
		OCH3	Phe A : 295	4.11	
		OCH3	Phe A : 297	4.42	
OCH3	Phe A : 338	4.82			

Nous pouvons conclure que la conformation de la meilleure pose générée du galantamine, son orientation ainsi que les interactions clés avec les résidus du site actif de la cible sont quasi-similaires à celles du ligand co-cristallisé ce qui confirme la fiabilité de notre protocole de docking.

2.2 Résultats du docking moléculaire

AutoDock Vina a proposé les neuf meilleures conformations d'amarrage probables avec leurs affinités correspondantes. Les résultats de la meilleure conformation sont représentés dans les tableaux suivants.

2.2.1 Etude d'interaction de la rivastigmine

Tableau VIII: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose de la rivastigmine avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.

Molécules	Affinité	Groupement ou atome de la Rivastigmine	Acides aminés du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons
Rivastigmine	-7.3	C=O	Ser 125---OH	2.30	Conventional hydrogen bond
		CH3 de la chaîne latérale	Phe A : 338	3.74	Carbon hydrogen bond
		Cycle aromatique	Tyr A : 124	2.50	π Donor hydrogen bond
		CH3 de groupement carbamate	Trp A : 86	3.78	π sigma
		Cycle aromatique	Tyr A : 337	5.42	π - π . T-shaped
		Cycle aromatique	Tyr A : 341	5.58	
		Cycle aromatique	Tyr A : 124	5.43	

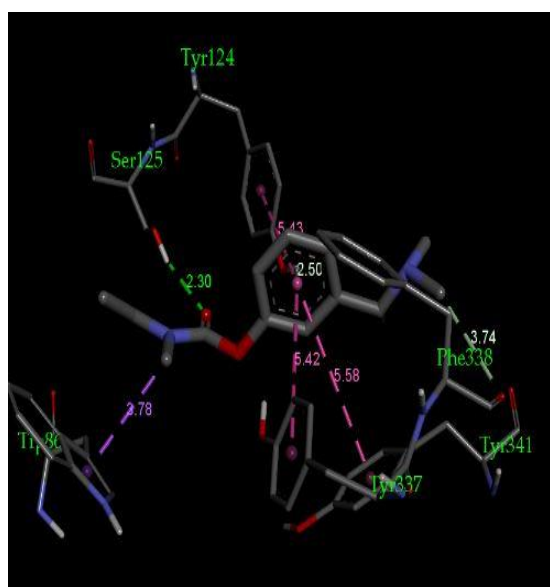


Figure 87: Interactions établies en 3D (rivastigmine)

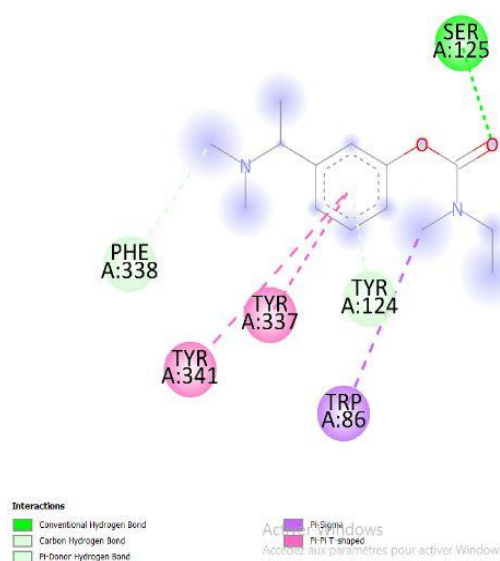


Figure 88: Interactions établies en 2D (rivastigmine)

2.2.2 Etude d'interaction des dérivés de la rivastigmine

Tableau IX: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M1 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.

Molécules	Affinité	Groupe ment ou atome de M1	Acides aminés du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons
M1	-7.6	C=O	Ser125---OH	2.02	Conventional hydrogen bond
		CH3 de groupement carbamate	Asp A:74	3.51	Carbon hydrogen bond
		CH3 de la chaîne latérale	Trp A:86	3.62	π sigma
		le cycle aromatique	Trp A:86	4.68 4.71	π - π -stacked

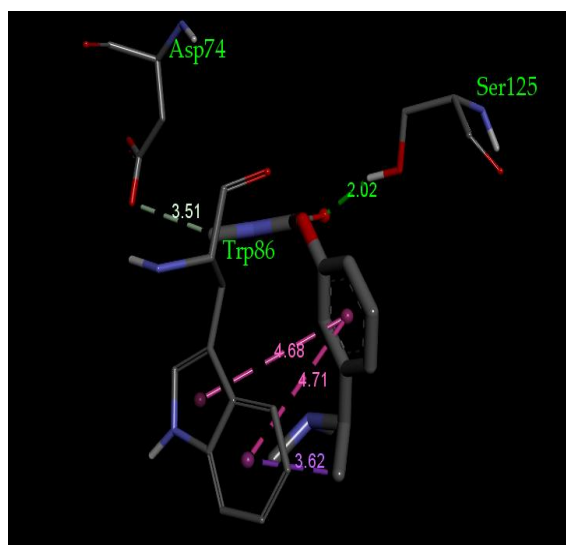


Figure 89: Interactions établies en 3D(M1)

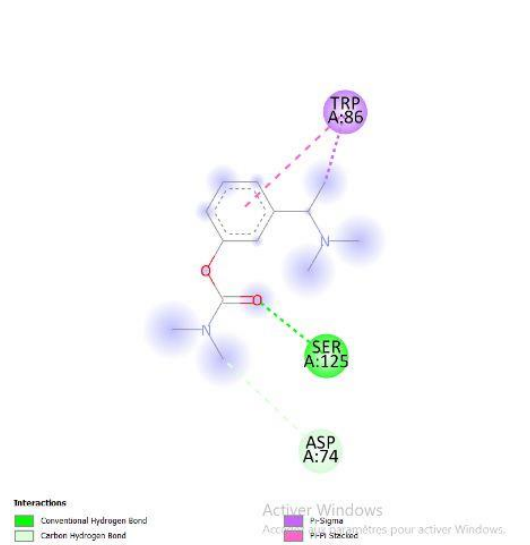


Figure 90: Interactions établies en 2D (M1)

Tableau X: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M2 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.

molécules	Affinité	Groupe ment ou atome de M2	Acides aminés du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons	
M2	-7.3	C=O	Gly121---NH2	2.45	Conventional hydrogen bond	
		C=O	Ser203---OH	2.85		
		CH3 de l'amine tertiaire de la chaîne latérale	Asn A:87	3.40 3.46	Carbon hydrogen bond	
		N-(C2H5)	Tyr A:337	3.99	π sigma	
		Le cycle aromatique	Trp A:86		4.74	π - π -stacked
					4.76	

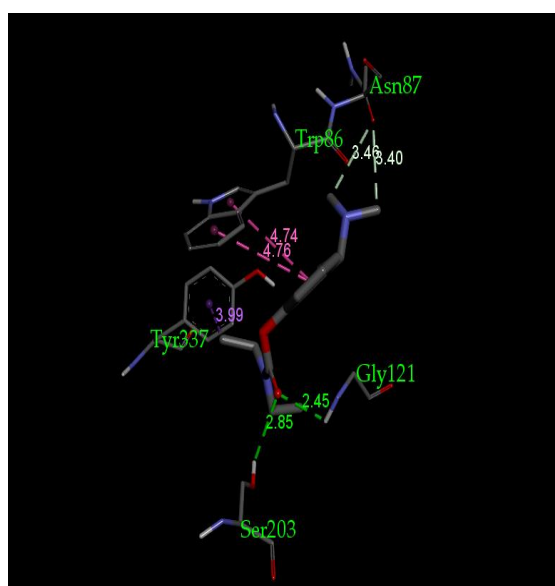


Figure 91: Interactions établies en 3D (M2)

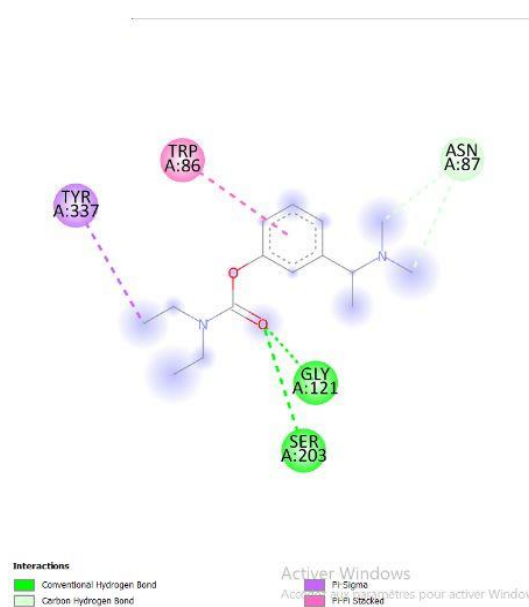


Figure 92: Interactions établies en 2D (M2)

Tableau XI: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M3 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.

molécules	Affinité	Groupement ou atome de M3	Acides aminés du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons
M3	-7.0	N-H-H	ASN87---O	2.16	Conventional hydrogen bond
		-O-	Ser125---OH	2.03	
		CH3 de la chaîne latérale	Trp A:86	3.57	π sigma
		Cycle aromatique	Trp A:86	4.70 4.93	π - π -stacked

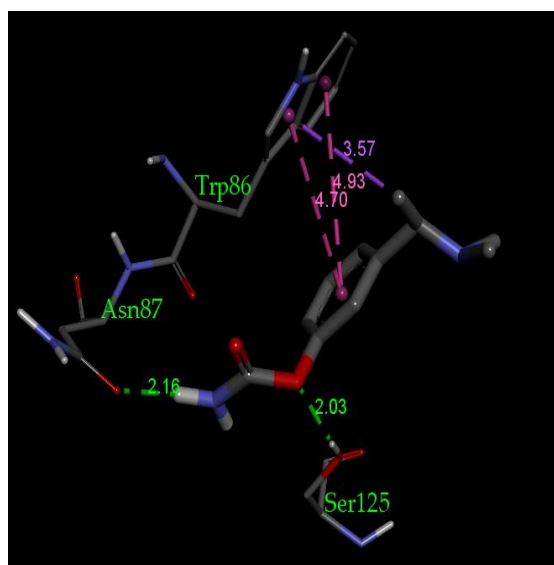


Figure 93: Interactions établies en 3D (M3)

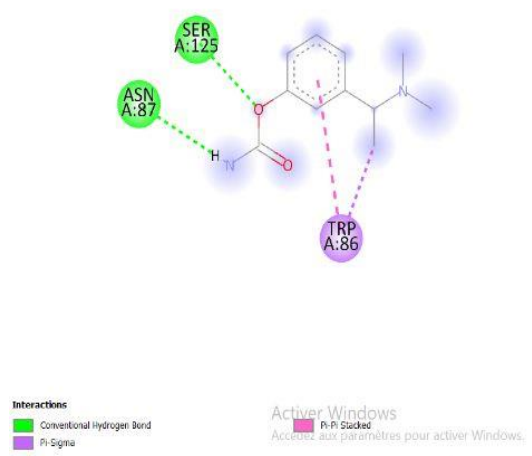


Figure 94: Interactions établies en 2D (M3)

Tableau XII: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M4 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.

molécules	Affinité	Groupe ment ou atome de la M4	Acides aminés du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons
M4	-8.5	C=O	Ser125---OH	2.72	Conventional hydrogen bond
		CH3 de l'amine tertiaire	Arg A : 296	3.34	Carbon hydrogen bond
		CH3 de l'amine tertiaire	Tyr A: 341	3.62	
		Cycle aromatique	Tyr A : 124	2.62	π Donor hydrogen bond
		Cycle aromatique	Tyr A : 341	4.91	π - π .T-shaped
		Cycle aromatique	Phe A : 338	5.14	
		Hétérocycle	Tyr A:337	5.18	π -alkyl

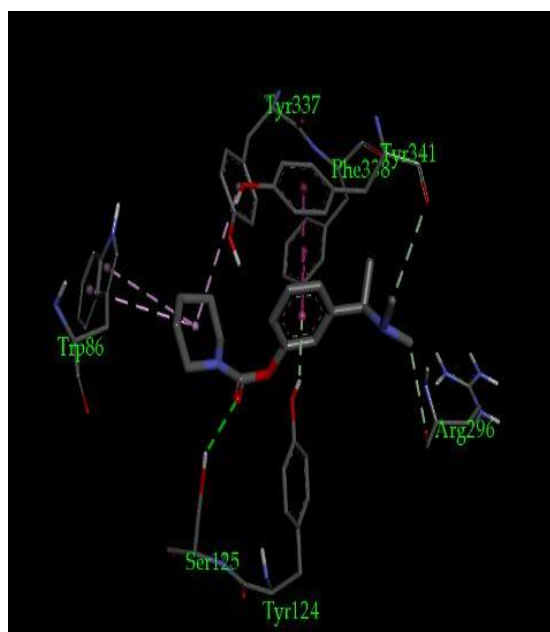


Figure 95: Interactions établies en 3D (M4)

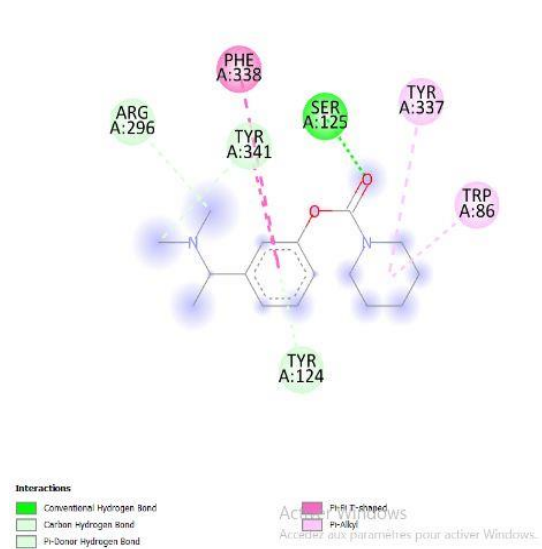


Figure 96: Interactions établies en 2D (M4)

Tableau XIII; Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose de M5 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.

Molécules	Affinité	Groupement ou atome de la M5	Acides aminés du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons
M5	-7.9	C=O	Ser 125---OH	2.26	Conventional hydrogen bond
		NH de cycle Pipérazine	Trp A : 86	2.61	Carbon hydrogen bond
		N-CH3	Phe A:338	3.79	
		Cycle aromatique	Tyr A : 124	2.60	
		Cycle aromatique	Tyr A:124	5.44	π - π .T-shaped
		Cycle aromatique	Tyr A:337	5.42	
		Cycle aromatique	Tyr A:341	5.76	
		C de Cyle pipérazine	Trp A:86	3.60	

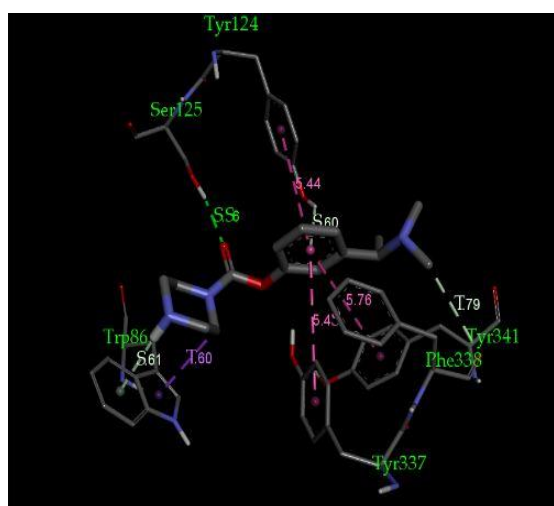


Figure 97: Interactions établies en 3D (M5)

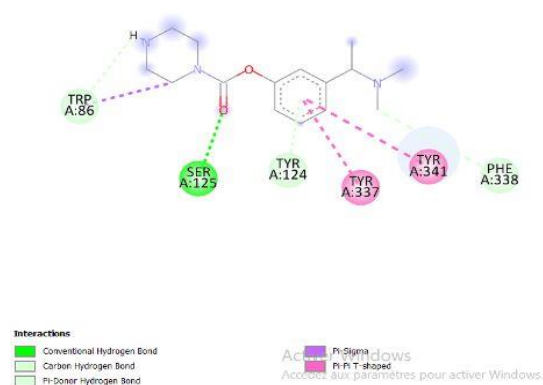


Figure 98: Interactions établies en 2D (M5)

Tableau XIV: Résultats du docking moléculaire exprimés en l'affinité de la meilleure pose du M6 avec les distances et les groupements interagissant dans chaque liaison établie.

molécules	Affinité	Groupe ment ou atome de M6	Acides aminés du récepteur	Distances (Å)	Types de liaisons
M6	-7.9	N-CH3	Phe A : 338	3.75	Carbon hydrogen bond
		Liaison avec l'hétérocycle	Tyr A : 124	2.41	π Donor hydrogen bond
		Liaison avec l'hétérocycle	Ser A : 125	2.31	
		Liaison avec le cycle aromatique	Tyr A : 337	2.91	
		Liaison avec l'hétérocycle	Tyr A : 124	5.74	π - π T-shaped
		Liaison avec le cycle aromatique	Tyr A : 341	4.97	

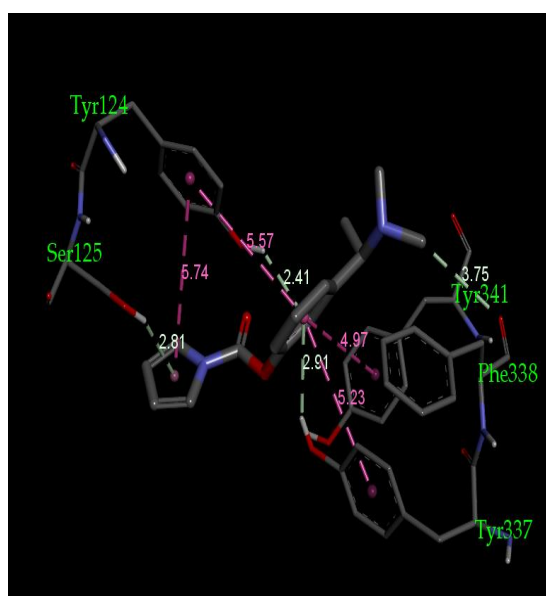


Figure 99: Interactions établies en 3D (M6)

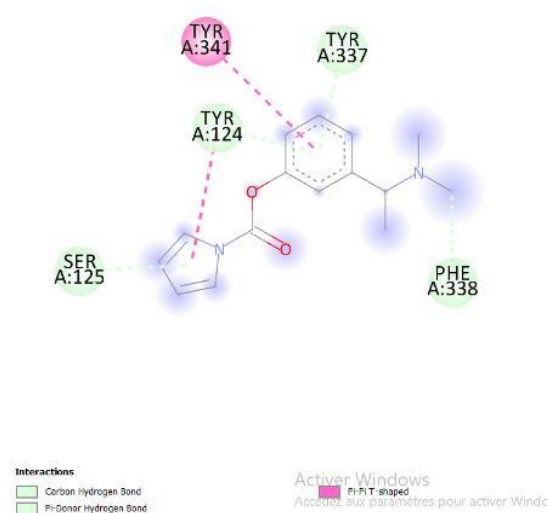


Figure 100: Interactions établies en 2D (M6)

2.3 Prédiction des propriétés ADMET et de Druglikeness de la rivastigmine et ses dérivés

Il était indispensable de compléter notre travail par la prédiction *in silico* des propriétés ADMET des différentes molécules que nous avons proposé dans notre étude, car une bonne affinité pour la cible ne reflète pas une utilisation systématique en thérapeutique car une toxicité élevée ou des paramètres pharmacocinétiques inadéquats limitent l'utilisation des molécules chez l'homme. Pour cela nous avons utilisé le serveur en ligne ADMETlab 2.0. Les résultats ont été comparés à ceux du rivastigmine, médicament mis sur le marché pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer. Il a été utilisé comme molécule de référence.

2.3.1 Propriétés physicochimiques

Tableau XV: Propriétés physico-chimiques prédites de la rivastigmine et ses dérivés.

Molécules	Rivastigmine	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Paramètres							
MW	250.17	236.15	264.18	208.12	276.18	227.18	262.17
nHA	4	4	4	4	4	5	4
nHD	0	0	0	2	0	1	0
nRot	6	5	7	4	5	5	5
TPSA	32.78	32.78	32.78	55.56	32.78	44.81	32.78
LogS	-1.999	-1.052	-2.551	-0.593	-3.04	-0.464	-2.574
LogP	2.393	0.772	2.98	0.993	3.234	1.251	2.701
LogD	1.765	1.374	2.195	0.981	2.19	1.079	1.798

MW : Masse moléculaire,

nHA : Nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène,

nHD : Nombre de donneurs de liaisons hydrogène,

nRot : Nombre de liaisons de rotation,

TPSA : Surface polaire topologique, LogS : logarithme de la solubilité aqueuse,

LogP : logarithme du coefficient de partition entre les phases H₂O/Octanol,

LogD : LogP à pH physiologique (pH=7.4).

2.3.2 Chimie médicale

- Les règles druglikeness sont basées sur l'observation des propriétés physicochimiques. Ces règles sont largement utilisées comme filtres pour prioriser les composés les plus susceptibles d'être des médicaments candidats [116]. Selon leur définition, ces filtres incorporent des recherches de sous-structures pour des groupes toxiques ou réactifs et / ou comprennent des limites sur les propriétés moléculaires qui peuvent être généralement utiles dans la conception de médicaments, c'est-à-dire non spécifiques pour les types de maladies [117]. La première règle qui a été découverte était celle de Lipinski qui a connue ensuite plusieurs transformations pour donner naissance aux autres règles variantes.

Tableau XVI: Chimie médicale prédite de la rivastigmine et ses dérivés.

Molécules \ Paramètres	Rivastigmine	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Lipinski Rule	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée
Pfizer Rule	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Rejetée	Acceptée	Acceptée
Gsk Rule	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée
Golden Triangle	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée
SAscore	2.762	2.574	2.616	2.56	2.483	2.7	2.876

SAscore : score d'accessibilité synthétique

2.3.2.1 Vérification de la règle de Lipinski

Pour vérifier la règle de lipinski il faut que :

$MW \leq 500$, $nHA \leq 10$,

$Log P \leq 05$, $nHD \leq 05$

Tableau XVII: Paramètres de la règle de Lipinski

Paramètres Molécules	MW	logP	nHA	nHD	Commentaire
Rivastigmine	250.17	2.393	4	0	Respecte
M1	236.15	0.772	4	0	Respecte
M2	264.18	2.98	4	0	Respecte
M3	208.12	0.993	4	2	Respecte
M4	276.18	3.234	4	0	Respecte
M5	227.18	1.251	5	1	Respecte
M6	262.17	2.701	4	0	Respecte

2.3.2.2 Vérification de la règle de Veber

Pour vérifier la règle de Veber il faut que :

$$nROT \leq 10, \text{TPSA} \leq 140 \text{ \AA}^2$$

Tableau XVIII: Paramètres de la règle de Veber

Paramètres Molécules	nROT	TPSA	Commentaire
rivastigmine	6	32,78	Respecte
M1	5	32,78	Respecte
M2	7	32,78	Respecte
M3	4	55,56	Respecte
M4	5	32,78	Respecte
M5	5	44,81	Respecte
M6	5	32,78	Respecte

2.3.2.3 Vérification de règle de GSK

Pour vérifier la règle de GSK il faut que :

$$MW \leq 400, \text{Log P} \leq 04$$

Tableau XIX: Paramètres de la règle de GSK

Paramètres Molécules	MW	Log P	Commentaire
Rivastigmine	250.17	2.393	Respecte
M1	236.15	0.772	Respecte
M2	264.18	2.98	Respecte
M3	208.12	0.993	Respecte
M4	276.18	3.234	Respecte
M5	227.18	1.251	Respecte
M6	262.17	2.701	Respecte

2.3.2.4 Vérification de règle de triangle d'or

Pour vérifier la règle de triangle d'or il faut que :

$$200 \leq MW \leq 500, \quad -2 \leq \text{Log} \leq 5$$

Tableau XX: Paramètres de la règle de triangle d'or

Paramètres Molécules	MW	Log D	Commentaire
Rivastgmine	250.17	1.765	Respecte
M1	236.15	1.374	Respecte
M2	264.18	2.195	Respecte
M3	208.12	0.981	Respecte
M4	276.18	2.19	Respecte
M5	227.18	1.079	Respecte
M6	262.17	1.798	Respecte

2.3.3 Propriétés pharmacocinétiques

Tableau XXI: Profil d'absorption prédit de la rivastigmine et ses dérivés.

Molécules Paramètres	Rivastigmine	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Caco-2 Permeability	-4.887	-5.006	-4.626	-5.208	-4.723	-5.33	-4.777
Pgp-inibitor	0.029	0.012	0.403	0.0	0.673	0.018	0.474
Pgp- substrate	0.131	0.248	0.124	0.076	0.039	0.994	0.043
HIA	0.035	0.32	0.012	0.006	0.006	0.076	0.007
F20%	0.009	0.138	0.005	0.007	0.014	0.017	0.01

Caco-2 : Les lignées cellulaires d'adénocarcinome du côlon humain (Caco-2),

Pgp: glycoprotéine P,

HIA : Absorption intestinale humaine,

F20% : biodisponibilité orale humaine 20%.

Tableau XXII: Profil de distribution prédit de la rivastigmine et ses dérivés.

Molécules Paramètres	Rivastigmine	M1	M2	M3	M4	M5	M6
PPB	25.58%	27.35%	30.27%	14.19%	51.83%	24.40%	41.10 %
VD	1.166	1.329	1.099	1.277	1.176	1.743	1.225
BBB Pénétration	0.95	0.962	0.956	0.676	0.97	0.814	0.959
Fu	73.81%	77.01%	64.68%	80.30%	52.38%	77.67%	64.66 %

PPB : Liaison aux protéines plasmatique,

VD : Volume de distribution,

BBB : barrière hémato-encéphalique (BHE),

Fu : fraction non liée dans les plasmas.

Tableau XXIII: Profil du métabolisme prédit de la rivastigmine et ses dérivés.

Molécules Paramètres	Rivastigmine	M1	M2	M3	M4	M5	M6
CYP1A2 inhibitor	0.258 (--)	0.198 (--)	0.38 (-)	0.274 (--)	0.372 (-)	0.048 (---)	0.356 (-)
CYP1A2 Substrate	0.851 (++)	0.737 (++)	0.698 (+)	0.64 (+)	0.897 (++)	0.093 (---)	0.85 (++)
CYP2C19 Inhibitor	0.074 (---)	0.061 (---)	0.099 (---)	0.032 (---)	0.337 (-)	-	0.206 (--)
CYP2C19 Substrate	0.966 (+++)	0.975 (+++)	0.948 (+++)	0.931 (+++)	0.968 (+++)	0.962 (+++)	0.967 (+++)
CYP2C9 inhibitor	0.014 (---)	0.009 (---)	0.026 (---)	0.01 (---)	0.168 (---)	0.014 (---)	0.125 (---)
CYP2C9 Substrate	0.477 (-)	0.443 (-)	0.47 (-)	0.493 (-)	0.402 (-)	0.234 (--)	0.375 (-)
CYP2D6 inhibitor	0.447 (-)	0.248 (--)	0.588 (+)	0.446 (-)	0.732 (++)	0.737 (++)	0.69 (+)
CYP2D6 Substrate	0.887 (++)	0.91 (+++)	0.856 (++)	0.883 (++)	0.89 (++)	0.891 (++)	0.889 (++)
CYP3A4 inhibitor	0.059 (---)	0.036 (---)	0.122 (---)	0.023 (---)	0.501 (+)	0.147 (--)	0.296 (--)
CYP3A4 Substrate	0.857 (++)	0.827 (++)	0.823 (++)	0.597 (+)	0.836 (++)	0.904 (+++)	0.84 (++)

Inhibitor : Inhibiteur

Substrate : substrat.

Tableau XXIV: Profil d'élimination prédit de la rivastigmine et ses dérivés.

Molécules Paramètres	Rivastigmine	M1	M2	M3	M4	M5	M6
CL	13.544	12.438	13.584	12.847	9.868	8.152	10.616
T1/2	0.794	0.8	0.721	0.456	0.614	0.553	0.698

CL: Clairance.

T1/2 : La demi- vie.

2.3.4 Profil de toxicité

Tableau XXV: Profile de toxicité prédit de la rivastigmine et ses dérivés.

Molécules Paramètres	Rivastigmine	M1	M2	M3	M4	M5	M6
hERG Blockers	0.077 (---)	0.054 (---)	0.074 (---)	0.122 (---)	0.134 (---)	0.121 (---)	0.107 (---)
H-HT	0.031 (---)	0.031 (---)	0.031 (---)	0.258 (--)	0.232 (--)	0.815 (++)	0.256 (--)
DILI	0.102 (--)	0.093 (---)	0.225 (--)	0.074 (---)	0.278 (--)	0.205 (--)	0.278 (--)
AMES Toxicity	0.099 (---)	0.087 (---)	0.045 (---)	0.504 (+)	0.062 (---)	0.031 (---)	0.071 (---)
Rat Oral Acute Toxicity	0.96 (+++)	0.964 (+++)	0.956 (+++)	0.945 (+++)	0.943 (+++)	0.9 (+++)	0.943 (+++)
FDAMDD	0.798 (++)	0.694 (+)	0.745 (++)	0.903 (+++)	0.753 (++)	0.535 (+)	0.757 (++)
Skin Sensitization	0.361 (-)	0.293 (--)	0.389 (-)	0.302 (-)	0.82 (++)	0.826 (++)	0.768 (++)
Carcinogenicity	0.116 (--)	0.393 (-)	0.065 (---)	0.844 (++)	0.15 (--)	0.059 (---)	0.205 (--)
Eye corrosion	0.005 (---)	0.005 (---)	0.007 (---)	0.004 (---)	0.006 (---)	0.004 (---)	0.006 (---)
Eye irritation	0.026 (---)	0.025 (---)	0.04 (---)	0.025 (---)	0.029 (---)	0.02 (---)	0.03 (---)
Respiratory toxicity	0.95 (+++)	0.95 (+++)	0.949 (+++)	0.691 (+)	0.945 (+++)	0.948 (+++)	0.941 (+++)

hERG Blockers : Bloqueurs de gène hERG,

H-HT: Hépatotoxicité humaine, DILI : Lésions hépatiques induites par les médicaments,

AMES Toxicity : Toxicité AMES,

Rat Oral Acute Toxicity : Toxicité aiguë par voie orale chez le rat,

FDAMDD : Dose quotidienne maximale recommandée,

Skin sensitization : Sensibilisation cutanée,

Carcinogenicity : Carcinogénicité, Eye corrosion / irritation : Corrosion / Irritation des yeux,

Respiratory toxicity : Toxicité respiratoire.

Selon le guide : les paramètres de classification, les valeurs de probabilité de prédiction sont transformées en six symboles : 0-0,1(---), 0,1-0,3(--), 0,3-0,5(-), 0,5-0,7(+), 0,7- 0,9(++), et 0,9-1,0(+++).

3 Discussion

3.1 Validation du protocole de docking

Afin d'étudier l'affinité de nos molécules pour la cible AChE qui est disponible sur PDB « 4ey6 » avec la galantamine comme ligand co-cristallisé, nous avons utilisé le docking moléculaire.

Pour confirmer la fiabilité du modèle de docking utilisé, la conformation de la galantamine optimisée par ChemDraw a été superposée au ligand co-cristallisé (conformation expérimentale) avec l'AChE (4ey6). La valeur prédite du RMSD était largement inférieure à 2Å. La conformation insérée était parfaitement superposable au ligand co-cristallisé, comme c'est illustré dans les figures 82 et 83. Nous avons noté aussi qu'il y avait une quasi-similarité des interactions générées par la meilleure pose et celle du ligand de référence. Par conséquent, le modèle développé peut être utilisé pour prédire correctement l'affinité des composés pour la cible ainsi que le mode de liaison au niveau du site actif.

3.2 Discussion des résultats du docking moléculaire

Dans cette première partie, nous discutons les résultats du docking moléculaire semi flexible, obtenus avec le logiciel ADV, pour les six ligands proposés et la rivastigmine utilisée comme référence.

Selon les résultats obtenus, la meilleure pose générée du rivastigmine a montré une énergie équivalente à -7,3Kcal/mol, une énergie qui a été améliorée avec les analogues M1, M4, M5 et M6 (-7.6, -8.5,-7.9et -7.9 Kcal/mol respectivement), ce qui montre qu'elles sont susceptibles de former de complexes assez stables avec la cible « Acétylcholinestérase».

Nous avons obtenu des valeurs négatives ce qui confirme que la liaison à la cible peut se faire spontanément [118].

Nous avons trouvé un seul dérivé (M2) avec le même score de docking que la rivastigmine : (-7.3 Kcal/mol), ainsi que le dérivé M3 a un score légèrement faible (-7.0 Kcal/mol) comparé à la référence.

Sachant qu'une faible énergie de liaison reflète la stabilité du complexe formé, ces résultats témoignent la bonne simulation des conditions réelles du processus thérapeutique.

D'après Imberty, les interactions peuvent être classées selon la distance entre les résidus de la cible et le groupement fonctionnel du ligand formant cette liaison. Celles comprises entre

2.5Å° et 3.1Å° sont des interactions fortes, entre 3.1Å° et 3.55Å° sont des interactions moyennes par contre si la distance dépasse 3.55Å° l'interaction est faible [119].

La rivastigmine a donné lieu, grâce à son groupement carbonyle, à une seule liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle de Ser125 avec une distance de liaison égale à 2,3 Å qui est une liaison forte. Le complexe ainsi formé (rivastigmine/AChE) est stabilisé davantage par d'autres types d'interactions: des interactions de type π - π . T-shaped avec les résidus : Tyr337, Tyr341 et Tyr124. Une seule liaison π -sigma établie entre le CH3 du groupement carbamate et Trp86. Il existe en plus de toutes ces liaisons, une liaison carbone hydrogène entre le CH3 de la chaîne latérale et Phe338, et une liaison π -donneur hydrogène entre le cycle aromatique et Tyr124.

La molécule M1 a donné lieu, grâce à son groupement carbonyle, à une seule liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle de Ser125 avec une distance égale à 2.02 Å qui est une liaison forte. Le complexe ainsi formé (M1/AChE) est stabilisé davantage par d'autres types d'interactions: une interaction hydrophobique de type π - π stacked entre le cycle aromatique et Trp86. Une liaison π -sigma a été observée entre CH3 de la chaîne latérale et Trp86, et une liaison carbone hydrogène entre CH3 du groupement carbamate et Asp74.

La molécule M2 a donné lieu, grâce à son groupement carbonyle, à deux liaisons hydrogènes fortes avec le groupement hydroxyle de Ser125 avec une distance égale à 2.85 Å et la fonction amine NH2 de Gly121 avec une distance égale à 2.45 Å. Le complexe ainsi formé (M2/AChE) est stabilisé davantage par d'autres types d'interactions : deux liaisons carbone hydrogène entre CH3 de l'amine tertiaire de Asn87, et une seule interaction π - π stacked entre le cycle aromatique et Trp86. Enfin, une liaison π -sigma entre C2H5 du groupement carbamate et Tyr337.

Le composé M3 forme deux liaisons hydrogènes fortes, l'une par l'azote de groupement carbamate avec l'oxygène de Asn87 à une distance égale à 2.16Å, l'autre entre l'oxygène du groupement carbamate et le groupement hydroxyle de Ser125 à une distance égale à 2.03 Å. Le complexe ainsi formé (M3/AChE) est stabilisé davantage par d'autres types d'interactions: une seule interaction π - π stacked entre le cycle aromatique et Trp86, et une seule liaison π -sigma entre CH3 de la chaîne latérale et Trp86.

Nous avons noté, d'après les résultats du docking moléculaire, que la molécule M4 a montré le score le plus élevé avec l'énergie la plus faible, ceci reflète une meilleure affinité de la

molécule synthétisée pour la cible comparée aux autres molécules, elle a donné une seule liaison hydrogène forte entre le groupement carbonyle et le groupement hydroxyle de Ser125 à une distance égale à 2.72 Å. Le complexe ainsi formé (M4/AChE) est stabilisé davantage par d'autres types d'interactions: deux liaisons carbone hydrogène entre les méthyles de l'amine tertiaire et les résidus Arg296 et Tyr341. Ainsi que deux liaisons hydrophobiques de type π - π T-shaped entre le cycle aromatique et les acides aminés Tyr341 et Phe338. Une liaison π donneur hydrogène avec Tyr124 via le cycle aromatique, de plus une liaison π -alkyl avec Tyr 337 via l'hétérocycle.

La molécule M5 a donné lieu, grâce à son groupement carbonyle, à une seule liaison hydrogène forte avec le groupement hydroxyle de Ser125 avec une distance égale à 2.26 Å. Le complexe ainsi formé (M5/AChE) est stabilisé davantage par d'autres types d'interactions: deux liaisons carbone hydrogène, l'une entre l'hétérocycle et Trp86, l'autre entre CH3 de l'amine tertiaire et le résidu Phe338, trois interactions π - π T shaped avec Tyr124, Tyr337, et Tyr341 via le cycle aromatique, une seule liaison π donneur hydrogène entre Tyr124 et le cycle aromatique et enfin, une seule liaison π -sigma a été observée entre Trp86 et l'hétérocycle.

Le complexe formé (M6/AChE) est stabilisé davantage par différents types d'interactions : trois liaisons π donneur hydrogène formées avec les résidus Tyr124 et Ser 125 via l'hétérocycle et Tyr337 via le cycle aromatique de la cible. Une interaction de type carbone hydrogène avec le résidu Phe338 via CH3 de l'amine tertiaire. Il existe en plus deux interactions de type π - π T shaped entre le résidu Tyr124 et l'hétérocycle, également le résidu Tyr341 et le cycle aromatique.

3.3 Etude in silico ADMET des molécules

Plusieurs études soutiennent le fait qu'un bon candidat médicament doit posséder, en plus d'une affinité élevée envers le site actif, des propriétés ADMET compatibles avec une application biologique. Dans ce contexte, il était indispensable de conforter notre étude par une évaluation de certaines propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques régissant les critères ADMET des composés issus de la rivastigmine. Comme c'est illustré dans les tableaux XV, XVI, XXI, XXII, XXIII, XXIV et XXV.

3.3.1 Propriétés physico-chimiques

D'après les résultats de la prédiction *in silico* des propriétés physico-chimiques et de Druglikeness, nous avons observé que les dérivés du rivastigmine respectent la règle de Lipinski et la règle de Veber, ceci reflète une prédiction d'une bonne absorption par voie orale.

Cependant, nous avons noté une forte solubilité de ces composés dans l'eau $-4 < \log S < 0.5$, $\log \text{mol/L}$ ainsi qu'un $\text{LogP} < 3$, ceci démontre le caractère hydrophile des composés proposés rendant leur solubilité dans les milieux aqueux facile, mis à part le produit M4 qui a un caractère lipophile ($\text{LogP}=3.234$), nous constatons que le poids moléculaire des différents produits est inférieur à 400g/mol exigé par la règle de GSK pour avoir un bon profil ADMET. Toutes ces molécules sont polaires avec des valeurs de TPSA comprises entre 0 et 140 Å², et le nombre de liaisons rotatives est inférieur à onze indiquant une bonne flexibilité des molécules. Quant à l'obtention de ces molécules par synthèse chimique prédite par le même serveur, nous pouvons dire que nos molécules peuvent être obtenues par synthèse chimique (2.483-2.876), car une synthèse est difficile à réaliser pour une valeur ≥ 6 .

3.3.2 Propriétés pharmacocinétiques (ADME)

Les résultats de la prédiction ADMET obtenus pour nos produits ont été comparés à ceux de la rivastigmine. Les paramètres pharmacocinétiques ADMET expérimentales du rivastigmine sont donnés dans la partie des résultats.

3.3.2.1 Absorption (A)

Un bon candidat médicament doit être rapidement et complètement absorbé dans la circulation systémique (sanguine). Dans notre travail, le serveur ADMETlab2.0 a prédit cinq paramètres pharmacocinétique correspondant à l'absorption, à savoir : la perméabilité à travers les cellules Caco-2 (colon adenocarcinoma), absorption intestinale humaine (HIA), inhibiteur de la P-gp, substrat de la P-gp et la biodisponibilité par voie orale (F%). Les résultats sont regroupés dans le Tableau XXI.

L'analyse de ces résultats a montré que :

- Tous les composés présentent une biodisponibilité orale supérieure ou égale à 20% (décision empirique : 0-0.3). Cela nous mène à dire que ces pharmacophores peuvent être administrés par voie orale et par la suite une dose du médicament peut atteindre finalement

le site d'action. La rivastigmine a une biodisponibilité de 40% [120] et le logiciel a prédit une biodisponibilité > 20% pour nos produits.

- Tous les produits présentent une bonne absorption au niveau intestinale (décision empirique: 0-0.3) avec des valeurs comprises entre 0.009 et 0.138 à l'exception de M1. Cela veut dire que nos produits peuvent être absorbés du système gastro-intestinal vers la circulation sanguine.
- Les composés M1, M2, M4 et M6 possèdent des valeurs de Caco-2 supérieures à -5.15 (> -5.15 cm/s). Ceci montre que ces composés possèdent une bonne perméabilité à travers les cellules Caco-2, ceci prédit une bonne absorption après une administration par voie orale.
- Concernant l'inhibition de la glycoprotéine P, les composés M1, M2, M3 et M5 ont montré une forte activité inhibitrice envers ce transporteur, parallèlement à la rivastigmine. Tans dis que les molécules M4 et M6 possèdent une faible activité inhibitrice de la glycoprotéine P.
- Tous ces produits sont des substrats de la glycoprotéine P donc, ils sont soumis au phénomène d'efflux.

3.3.2.2 Distribution (D)

Un bon candidat médicament doit être distribué spécifiquement vers son site d'action dans le corps. Dans notre travail, nous avons prédit quatre paramètres pharmacocinétiques correspondant à la distribution, à savoir : la liaison aux protéines plasmatiques (PPB), volume de distribution (VD), passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB) et la fraction libre F_u à l'aide du serveur ADMETlab2.0. Les résultats sont regroupés dans le Tableau XXII L'analyse de ces résultats a révélé que :

- Tous les composés présentent une bonne perméabilité à travers la barrière hémato-encéphalique, donc ces molécules peuvent atteindre leur site d'action au niveau centrale.
- Les six composés possèdent des pourcentages de liaisons aux protéines plasmatiques inférieurs à 90% (selon le guide), idem à la rivastigmine. Ceci montre que les candidats possèdent une faible liaison aux protéines plasmatiques. Des études ont montré que la rivastigmine à une faible liaison aux protéines plasmatiques, environ 40% [121].

3.3.2.3 Métabolisme (M)

Le médicament est éliminé définitivement de l'organisme soit sous forme inchangée, soit sous forme de métabolites (inactif, actif ou toxique) après biotransformation. Pour nos produits, le serveur ADMETlab2.0 a prédit deux paramètres pharmacocinétiques correspondant au

métabolisme, à savoir : CYP450 Substrat (P450 CYP Substrat) et CYP450 Inhibiteur (P450 CYP Inhibitor) à l'aide du serveur ADMETlab2.0. Les résultats sont regroupés dans le Tableau XXIII.

- Tous les produits ont été prédits comme étant non inhibiteurs des CYP1A2, CYP2C19 et CYP2C9 ainsi qu'ils ont été prédits comme étant des substrats des CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4 et non substrats de CYP2C9, c'est-à-dire ils peuvent être métabolisés par CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4. Donc nos composés constituent une source des interactions médicamenteuses au niveau des CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4.
- Tous les composés ont été prédits comme étant non inhibiteurs de CYP3A4 mais à part la molécule M4. Donc, cette dernière donne lieu à des interactions médicamenteuses au niveau de CYP3A4.
- Toutes les molécules ont été prédites comme étant des substrats de CYP1A2 à l'exception de M5, c'est-à-dire M1, M2, M3, M4 et M6 peuvent être métabolisées par CYP1A2 donc, sont source à des interactions médicamenteuses à ce niveau.
- Tous les produits ont été prédits comme étant des inhibiteurs de CYP2D6 à l'exception de M1 et M3, donc M2, M4, M5 et M6 sont source à des interactions médicamenteuses à ce niveau.

3.3.2.4 Excrétion (E)

Un bon candidat médicament doit être correctement éliminé : élimination rénale ou biliaire. Dans notre travail, nous avons prédit deux paramètres pharmacocinétiques correspondant à l'excrétion, à savoir : le temps de demi-vie ($T_{1/2}$) exprimé en heure (h) et la Clairance (CL) exprimée en (mL/min/kg) à l'aide du serveur ADMETlab 2.0. Les résultats sont regroupés dans le Tableau XXIV.

Nous rappelons que :

Le temps de demi-vie $T_{1/2}$ (temps nécessaire à la concentration d'un composé dans la circulation systémique pour réduire de moitié), est un paramètre important pour estimer la fréquence de prise par 24h ainsi que le calcul de temps d'équilibre qui est utile pour le suivi des médicaments toxiques à index thérapeutique étroit.

- Pour la rivastigmine, des études ont montré que le temps de demi-vie $T_{1/2}$ est de 1.5 h [121] tandis que le serveur a prédit un temps de demi-vie $T_{1/2} < 3$ h comparable à nos produits.
- Pour les molécules M3, M4, M5 et M6 nous avons noté une légère augmentation des valeurs de $T_{1/2}$ (0.456, 0.614, 0.553, 0.698) comparés à la rivastigmine.

La clairance CL d'une substance est le volume de solution totalement épuré (à concentration constante) de cette substance par unité de temps.

Selon le guide ADMETlab 2.0 :

Si la clairance est inférieure à 5 mL/min/kg : Mauvaise Excrétion

Si la clairance est comprise entre 5 et 15 mL/min/kg : Excrétion Moyenne

Si la clairance est supérieure à 15 mL/min/kg : Bonne Excrétion

L'analyse du Tableau XXIV a montré que :

- Tous les produits présentent une excrétion moyenne avec des valeurs prédites par les serveurs ADMETlab2.0 comprises entre 8.152 – 13.584 mL/min/kg idem à la rivastigmine.
- Pour la rivastigmine, des études ont montré que la valeur de la clairance est comprise entre 2.1-2.8 l/h [121] et le serveur a prédit une clairance égale à 13.544 ml/min/kg comparable à nos produits.

3.3.3 Chimie médicale

Pour conclure à propos des propriétés pharmacocinétiques des nouveaux ligands de l'acétylcholinestérase, nous pouvons dire que la règle de Veber et la règle de Lipinski sont respectées ainsi que les règles de GSK et Golden triangle vérifiés donc, l'ensemble de molécules proposées sont prédites comme étant des molécules pouvant être administrées par voie orale et prédites comme ayant un bon profil ADMET.

Donc, Il faut compléter par l'étude du profil toxicologique.

3.3.4 Profil toxicologique

Nous avons prédit, *in silico*, la toxicité des nouveaux dérivés de la rivastigmine à l'aide du serveur ADMETlab 2.0.

✓ Cardiotoxicité

Les médicaments bloqueurs des canaux potassiques hERG (gène humain apparenté à l'éther-a-go-go) provoquent des arythmies cardiaques, tous les produits étudiés ont été prédits comme étant non inhibiteurs des hERG, donc ils ne tendent pas à développer une cardiotoxicité.

Pour la rivastigmine utilisée comme référence, des cas rares d'allongement de l'intervalle QT corrigé en fréquence (QT_c) ont été notés chez des patients traités par cette dernière [122].

✓ Hépatotoxicité

La rivastigmine n'est pas hépatotoxique. Selon des études cliniques, le traitement par la rivastigmine n'a pas été associé à une élévation des taux sériques en transaminases comparée à la population traitée par le placebo, et aucun cas de lésion hépatique cliniquement apparente avec ictère n'a été signalé [123], il en est de même pour nos molécules, elles ont été prédites comme non hépatotoxiques car les valeurs des paramètres H-HT et DILI sont inférieures à 0,3 (décision empirique : 0-0,3 : excellent) sauf la molécule M5 qui a une valeur de H-HT supérieure à 0,7 (décision empirique : 0,7-1 (++) : faible).

✓ Sensibilisation cutanée

Des réactions cutanées d'hypersensibilité, notamment la formation étendue de cloques, une dermatite allergique disséminée et un syndrome de Stevens-Johnson, ont également été signalées chez des patients traités par la rivastigmine par voie orale ou transdermique [124], quant aux molécules proposées dans notre étude, les molécules M4, M5 et M6 ont été prédites comme étant des sensibilisants cutanés, ainsi que les molécules M2 et M3 ont été prédites comme étant des faibles sensibilisants cutanés. La molécule M1 est la seule molécule prédite, *in silico*, avec un effet de sensibilisation cutanée négatif.

✓ Toxicité respiratoire

Comme avec tous les agents cholinomimétiques, il faut faire preuve de prudence lors de l'utilisation de la rivastigmine chez les patients ayant des antécédents d'asthme ou de syndrome respiratoire obstructif [124]. Tous les composés ont été prédits comme ayant une toxicité respiratoire positive (décision empirique : 0,7-1,0 (++) : faible) à l'exception de la molécule M3 qui a une faible toxicité respiratoire (décision empirique : 0,3-0,7 : moyen).

✓ Cancérogénicité

Pour la rivastigmine, les études portant sur l'administration orale et topique chez la souris et sur l'administration orale chez le rat n'ont démontré aucun effet carcinogène à la dose maximale tolérée [124]. Selon la prédiction *in silico* réalisée dans notre travail, toutes les molécules ont été prédites comme étant dépourvues de tout effet cancérigène sauf la molécule M1, pour laquelle, un faible effet carcinogène a été prédit et la M3 qui est cancérigène.

✓ Mutagénicité

L'effet mutagène a une relation étroite avec la cancérogénicité, la rivastigmine ne s'est pas révélée mutagène lors du test d'Ames selon Sandoz [124]. La M3 est la seule molécule prédite, in silico, avec un effet mutagène positif, pouvant induire des modifications au niveau de l'ADN.

✓ Irritation oculaire

Toutes les molécules ont été prédites comme étant non corrosives / non irritantes car les valeurs des paramètres Corrosion/Irritation des yeux qui sont inférieures à 0.3 (décision empirique : 0-0,3 : excellent)

Pour la rivastigmine, des études ont montré qu'un liquide à forte teneur en rivastigmine a provoqué une irritation légère et réversible, aux yeux de lapins, ce qui porte à croire que cette substance pourrait irriter les yeux des patients si elle va être en contact avec ces derniers [124].

Conclusion

Notre travail avait pour but essentiel d'étudier par docking moléculaire l'affinité de nouveaux dérivés de la rivastigmine pour l'AChE et prédiction, *in silico*, de son efficacité pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Dans un premier temps, nous avons testé la performance du programme Auto Dock Vina utilisé dans cette étude par le test RMSD, permettant de comparer la déviation de la géométrie du ligand simulée par ADV avec celle déterminée expérimentalement par des méthodes cristallographiques ou RMN, disponible dans la Data Bank protéine (pdb).

Nous avons étudié six nouveaux composés proposés dans notre travail en apportant des modifications structurelles sur la rivastigmine en considérant cette dernière comme référence afin de conclure sur l'affinité pour la cible choisie.

Nous avons complété cette validation par une analyse visuelle de la meilleure pose obtenue avec le ligand optimisé par ChemDraw et le ligand co-cristallisé avec la cible.

Ce test nous a permis de conclure qu'ADV est un programme de docking moléculaire fiable qu'on peut utiliser en toute confiance dans notre travail.

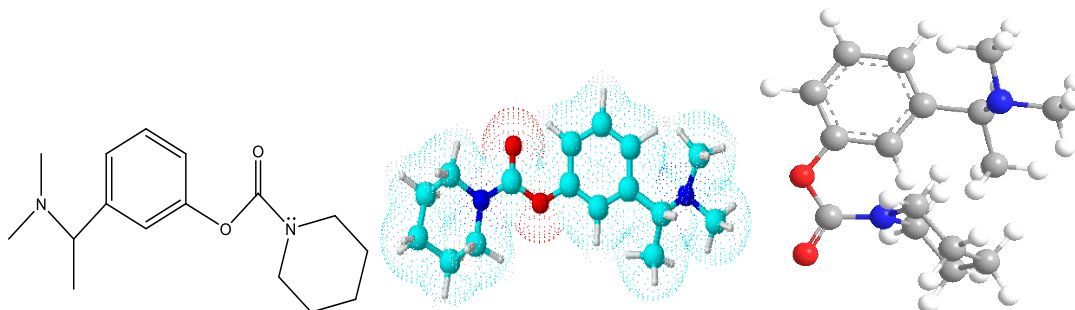
Nous avons élucidé les mécanismes d'interaction entre la rivastigmine et le site d'action de l'acétylcholinestérase par visualisation des différents types d'interactions mis en jeu lors du docking moléculaire, ainsi que les mécanismes d'interaction entre les dérivés de la rivastigmine proposés et le site d'action d'AChE.

La prédiction de l'affinité pour la cible a été complétée par une prédiction, *in silico*, des paramètres pharmacocinétique et toxicité, le composé ayant montré les meilleures propriétés ADMET est M4, ce dernier a donné aussi la meilleure affinité pour la cible.

Enfin nous pouvons dire que cette étude peut être approfondie, en faisant appel à d'autres programmes d'étude de docking et de simulation *in silico*, donc, nous proposons de poursuivre les études sur la molécule : 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényl piperidine-1-carboxylate (M4) .

A l'issue de notre travail, nous pouvons dire que le résultat de la présente étude ne sont que préliminaires, il serait donc intéressant de synthétiser la molécule M4 et de compléter ce travail par des études expérimentales.

Nous présentons ci-dessous le mécanisme réactionnel proposé pour la synthèse de la M4, ainsi que les spectres $^1\text{HRMN}$ et $^{13}\text{CRMN}$ prédits, *in silico*, et un résumé graphique de sa structure chimique ainsi que les résultats du docking.



Structure chimique et vue tridimensionnelle du 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényl piperidine-1-carboxylate (M4)

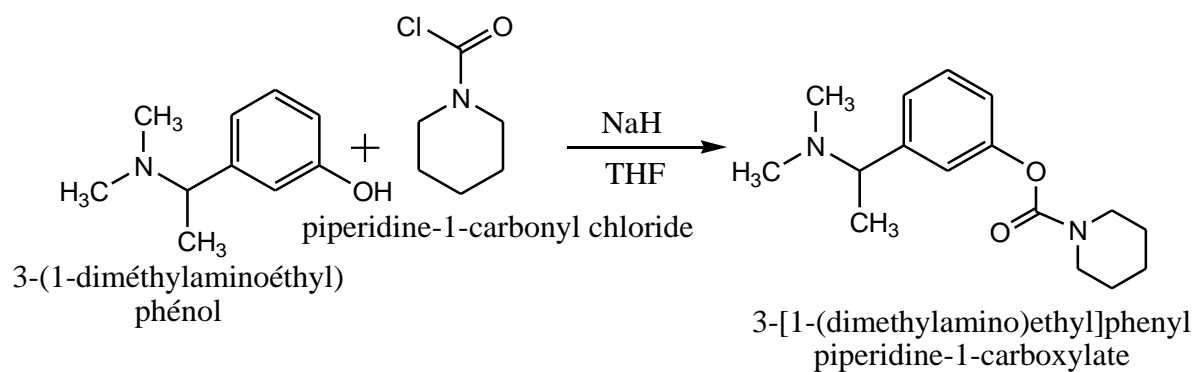
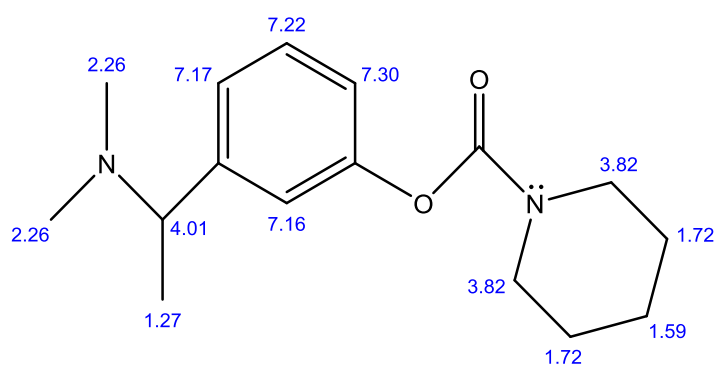
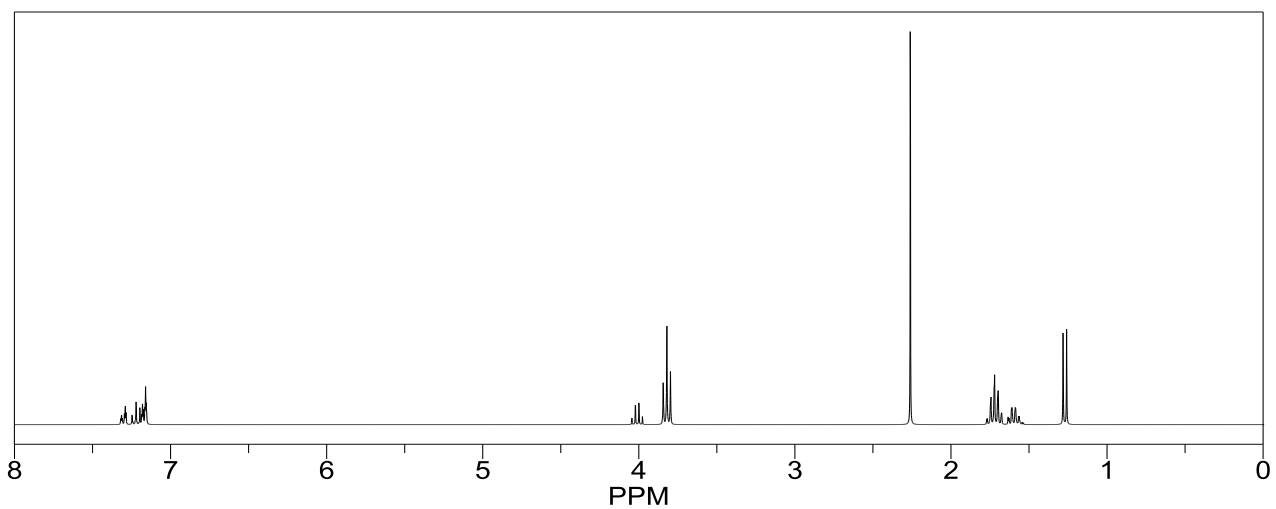
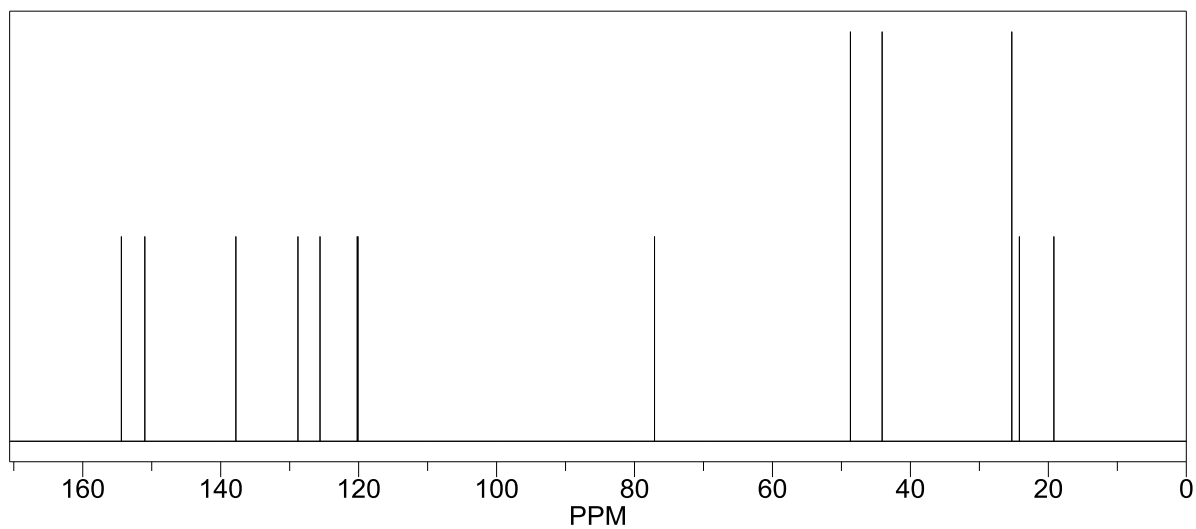
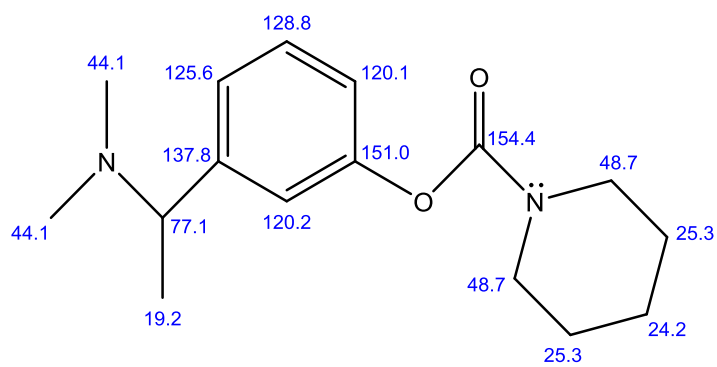


Schéma proposé pour la synthèse du 3-[1-(diméthylamino)éthyl]phényl piperidine-1-carboxylate (M4)





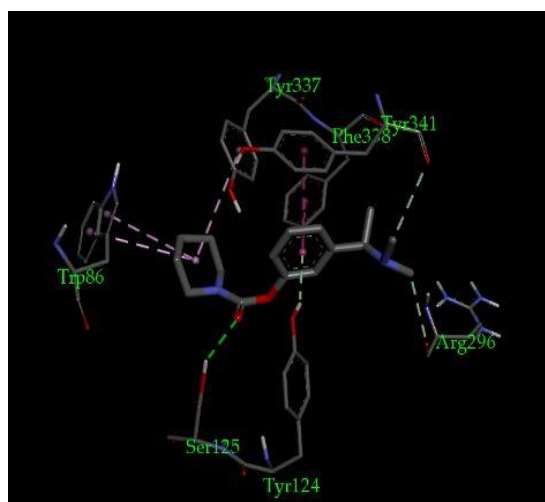
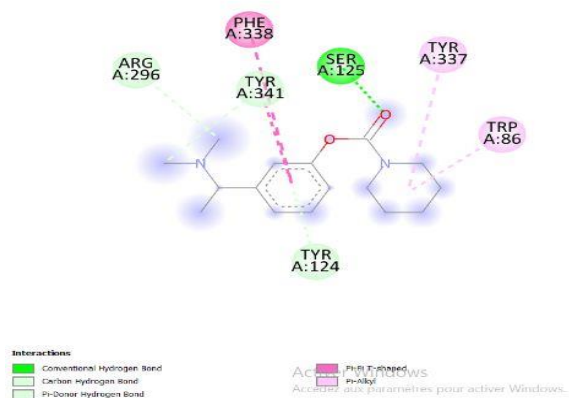
Spectre ^1H RMN de M4 (3-(diméthylamino)éthyl)phényl piperidine-1-carboxylate)



Spectre ^{13}C RMN de M4 (3-(diméthylamino)éthyl)phényl piperidine-1-carboxylate)

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
		rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-8.5	0.000	0.000
2	-7.6	1.786	7.187
3	-7.4	5.651	10.361
4	-7.3	4.700	7.581
5	-7.3	22.560	23.987
6	-7.2	2.233	7.245
7	-7.2	23.123	24.561
8	-7.0	4.700	8.100
9	-7.0	22.825	24.750

Writing output ... done.



Résultats du docking moléculaire du 3-(1-(diméthylamino)éthyl)phényl piperidine-1-carboxylate (M4)

Références bibliographiques

- [1] Commings JL, Cole G. Alzheimer disease. *Journal of the American Medical Associations*. juin, 2002;18(287): 2335-2338. [Consulté le 27/05/2022]. Disponible sur: <https://psycnet.apa.org/record/2002-010889-001>.
- [2] Hauw JJ, Dubois B, Verny M, Duyckaerts C. *La maladie d'Alzheimer Base santéPsy*. Paris : John Libbey Eurotext. 1997;162p. [Consulté le 26/05/2022]. Disponible sur: https://santepsy.ascodocpsy.org/index.php?lvl=notice_display&id=60379.
- [3] Gustafon L. Physostigmine and tetrahydroaminoacridine treatment of Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1993; 88 (149): 39-41. [Consulté le 27/05/2022]. Disponible sur : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0404.1993.tb04253.x>.
- [4] Merzoug A, Chikhi A . Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de peptide déformylase [thèse]. Université des frères Mentouri - Constantine 1; 2018.
- [5] Howard R et al. « Nursing home placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) trial: secondary and post-hoc analyses ». *Lancet Neurol*. 2015 Dec; 14(12):1171-81.
- [6] Calabrò M, Rinaldi C, Santoro G and Crisafulli C. The biological pathways of Alzheimer disease: areview. *AIMS Neuroscience*. 2021;8 (1):86-132.
- [7] Fondation pour la Recherche sur Alzheimer, Définition et chiffres de la maladie d'Alzheimer [En ligne]. 2021 [consulté le 18/01/2022]. Disponible sur : <https://alzheimer-recherche.org/la-maladie-alzheimer/quest-maladie-dalzheimer/definition-et-chiffres/>.
- [8] Amalou S et Arezki M. Données épidémiologiques de la maladie d'Alzheimer dans la région de Blida difficultés diagnostiques et propositions pour améliorer la qualité de la prise en charge [Thèse]. Université Saad Dahlab de Blida; 2018.
- [9] Laraba A, Chellali R. Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la Glycogen synthase kinase 3 β pour le traitement de la maladie d'Alzheimer [Mémoire]. Université Frères Mentouri Constantine 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie; 2021.

[10] Girard F, Conseiller d'Etat. Canestri A, Interne de santé publique. La maladie d'Alzheimer [Rapport publique]; Sep 2000 [consulté le 02/02/2022]. Disponible sur : <https://www.vie-publique.fr/rapport/24489-la-maladie-dalzheimer>.

[11] Jourdan PJ. Conception, synthèse et évaluation biologiques de nouveaux analogues de la curcumine : potentiels agents pléiotropies d'intérêt thérapeutiques dans la maladie d'Alzheimer [thèse]; 2015. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2015CAEN4012>.

[12] Doudrich J, Odile R, Dubois B, Hauw JJ, Petitpré J. le livre vert de la maladie d'Alzheimer état des lieux et perspectives. France Alzheimer et maladies apparentées, Union nationale des Associations Alzheimer 2006.

[13] El Kadmiri N, Hamzi K, El Moutawakil B, Slassi I, Nadifi S. Les aspects génétiques de la maladie d'Alzheimer. Pathologie biologie [En ligne]. 2013 Dec [consulté le 02/01/2022];61(N°6): [13pages]. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0369811413000825>.

[14] Kopp N et Krolak-salmon P (dir). Forme familiale de la maladie d'Alzheimer et vulnérabilité, in maladie d'Alzheimer et vulnérabilité, Chronique sociale, 2012 :141-150.

[15] Jourdan JP. Curcuma et curcumine: de l'histoire aux intérêts thérapeutiques [thèse]. Caen: Université de Caen Normandie; 2016.

[16] Derouesné C. Maladie d'Alzheimer : un autre regard. Information Psychiatrique. 01 Jan 2010; Vol86(N°1): p 49-56.

[17] Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. Neuropeptides. 2015 Aug; 52:1-18.

[18] Farget D. Etudes biologiques de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie moléculaire de la maladie d'Alzheimer [thèse]. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble; 2012.

[19] Dansokho DC. Rôle et potentialités des cellules T régulatrices dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer [thèse]. Français: Université Pierre et Marie Curie- Paris VI, 2015.

[20] Benchekroun M. Synthèse multicomposants et évaluation pharmacologique de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini pour le traitement de la maladie d'Alzheimer [Thèse]. Français: Médecine humaine et pathologie. Université de Franche -comté; 2014.

[21] Luc B. Maladie d'Alzheimer, histoire de recherche et de traitements. N°2. Les cahiers du comité pour l'histoire. De cerveau aux neurosciences. Itinéraires dans la longue durée. Vol 2/2 : 59-65.

[22] Nathalie. Cartier-lacave, maladie d'Alzheimer. Encyclopaedia Universalis [en ligne], [consulté le 15/04/2022]. Disponible sur [:https://www.universalis.fr/encyclopedie/maladie-d-alzheimer/](https://www.universalis.fr/encyclopedie/maladie-d-alzheimer/).

[23] Claude Breton M et Turgeon M avec la collaboration de Gosselin C. Traitements pharmacologiques de la maladie d'Alzheimer et maladie apparentées [Rapport]. Québec. Mars 2015.

[24] Renaud D, Mulin E, Robert Ph. Les symptômes psychologiques et comportementaux dans la maladie d'Alzheimer; 2010 Sep. p. 171 [Consulté le 15 avril 2022]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0755498205840114>.

[25] Zerroug E. Analyse in silico de plusieurs séries de pharmacomolécules hétérocycliques appliqué à la conception des médicaments [thèse]. Biskra : Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie. Département des sciences de la matière, 2020.

[26] Fadi M. M.D, CSPQ, FRCPC. La maladie d'Alzheimer : pensez-y ! . 2003 Fév. [Consulté le 20/02/2022] Disponible sur: <http://www.stacommunication.com>.

[27] Woolf NJ, Butcher LL. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. Behavioural Brain Research .2011; 221(2): 488-98.

[28] Fishman MC. Sir Henry Hallett Dale and acetylcholine story. The Yale journal of biology and medicine. 1972;45:104-18.

[29] Kandel ER, Squire LR. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. Science. 2000;290:1113-20.

[30] Rand JB. Acetylcholine. WormBook. 2007;1-21.

- [31] Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *ProgNeurobiol.* 2000;61(1):75-111.
- [32] Gotti C, Fornasari D, Clementi F. Human neuronal nicotinic receptors. *ProgNeurobiol.* 1997;53(2): 199-237.
- [33] Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev PharmacolToxicol.* 1990;30: 633-673.
- [34] Brown DA. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. *J Mol Neurosci.* 2010;41(3): 340-346.
- [35] Emmanuelle G. Altérations génétiques des cholinestérases chez des souris : conséquences morphologiques et fonctionnelles à la jonction neuromusculaire [thèse]. *Museum national d'histoire naturelle*, 2006.
- [36] Santarpia L, Grandone I, Contaldo F, Pasanisi F. La Butyrylcholinestérase comme marqueur pronostique. 2013 mars;4(1):31-9.
- [37] Amy T; Paras BK. Physiologie , Acétylcholinestérase StatPearls-NCBI Bookshelf Last Update : May 9, 2021. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539735/>.
- [38] Sanson B. La dynamique structurale de l'acétylcholinestérase : étude réalisée par cristallographie aux rayons X et une méthode spectroscopique complémentaire. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français.
- [39] Winkler DA. Overview of quantitative structure-activity Relationship (QSAR). *Molecular analysis and Genom Discovery.*2005; 347-367
- [40] Dvira H, Silmanb I, Harel M, Rosenberryc TL, Sussmana JL. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. Published in final edited form as : *ChemBiol Interact.* 2010 September. [consulté le 22/04/2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894301/>.
- [41] Taylor and z. Radic T and Z. the Cholinesterases : from genes to proteins. *Annu Rev PharmacolToxicol*, 34, 281, 1994.

[42] Alain G, Bruno D. Françoise forette-diagnostiqué la maladie d'alzheimer sans savoir la soigner, recherche et santé. N°105.1^{er} trimestre p; 13; 2006.

[43] Grutzendler J, Morris J. Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. Springer Int. Publ. 2001 janv;61(1):41-52.

[44] Lleo A, Greenberg SM, Growdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. Annual Review of Medicine. 2006;57:513-33.

[45] Camps P, Munoz-Torro D. Cholinergic Drugs in Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease. Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2002;2(1):11-25.

[46] Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM et Vasić VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. Current Neuropharmacology. 2013;11:315-335.

[47] Carletti E, Li H, Li B, Ekstrom F, Nicolet Y, Loiodice M et al. Aging of cholinesterases phosphorylated by tabun proceeds through O-dealkylation. J Am Chem Soc. 2008;130(47):16011-20.

[48] Lopez-Arrieta JM, Schneider L. Metrifonate for Alzheimer's disease. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Apr 19;(2):CD003155.

[49] Benzi G, Moretti A. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease?. European Journal of Pharmacology. 1998;346: 1-13.

[50] Marcusson J, Bullock R, Gauthier S, A Kurz, S Schwalen. Galantamine demonstrates efficacy and safety in elderly patients with Alzheimer's disease. Alzheimer Dis Assoc Disord. 2003; 17 (Suppl3): S86-91.

[51] Sabbagh MN. Drug development for Alzheimer's disease: Where are we now and where are we headed?. Am J Geriatr Pharmacother. 2009 jun;7(3):167-85.

[52] Thakur A, R. Pathak S. Introduction to medicinally important constituent from chinese medicinal plants. In: A Tewari et S Tiwari. Synthesis of Medicinal Agents from Plants. Elsevier Ltd ; 2018. p.333-349.

- [53] Alcolea-Palafox M, Posada-Moreno P, Ortuño-Soriano I, L. Pacheco-del-Cerro J, Martínez-Rincón C, Rodríguez-Martínez D et al. Research Strategies Developed for the Treatment of Alzheimer's Disease. Reversible and Pseudo-Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase: Structure-Activity Relationships and Drug Design. In: Atta-ur-Rahman, M Iqbal Choudhary. Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease. Bentham Science Publishers Ltd; 2014. p. 426-477.
- [54] Sugimoto H, Yamanishi Y, Iimura Y, Kawakami Y. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 2000;7:303-39.
- [55] Revadigar V, Ghalib RM, Murugaiyah V, A. Embaby M, Jawad A, Mehdi SH et al. Enzyme Inhibitors Involved in the Treatment of Alzheimer's Disease. In: Atta-ur-Rahman, M Iqbal Choudhary. Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease. Bentham Science Publishers Ltd; 2014. p. 142-198.
- [56] Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research*. 2004 ;50: 441-451.
- [57] Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt A, 27-50.
- [58] Ahmed F, Ghalib RM, Sasikala P. Ahmed KKM. Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacognosy Reviews*. 2013;7(14):121-130.
- [59] López MD, Pascual-Villalobos MJ. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*. 2010;31:284–88.
- [60] Gunsteren WFV, Berendsen HJC. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *AngewChemInt ED Engl*. 1990;29:992-1023.
- [61] Liotta D. *Advances in Molecular Modeling*. Ed JAI Press. 1988;1.
- [62] Debord J. Introduction à la modélisation moléculaire. 2004;37-41.

- [63] Reuter N, Dejaegere A, Maigret B, Karplus M. Frontier bonds in QM/MM methods: a comparison of different approaches. *J PhysChem A*. 2000;104(8):1720-1735.
- [64] Koch W, Holthausen MC. *Chemist's Guide To Density Functional Theory*. Wiley VCH, Weinheim. 2000.
- [65] Schulz-Gasch T, Stahl M. Scoring Functions for Protein-ligand Interactions: A Critical Perspective. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004;1: 231-239.
- [66] Kitchen D, Decornez H, Furr J, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery : methods and applications . *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:935-949.
- [67] Halperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R. Principles of Docking : An Over view of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *Proteins : Structure, Function, and Genetics* .2002 ; 47 : 409-443.
- [68] Chevrollier N. Développement et application d'une approche de docking par fragments pour modéliser les interactions entre protéines et ARN simple-brin. Phdthesis, Université Paris-Saclay [En ligne]; 2019. [Consulté le 1 mars 2021]. Disponible sur:<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02436914>.
- [69] Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase Substances antibactériennes à l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. Thèse de doctorat d'université: Biochimie appliquée. Constantine: Université Mentouri de Constantine. Algérie ;2007;12-90.
- [70] Holland J. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. University of Michigan Press: Ann Arbor.MI.1975.
- [71] Kang O, kim S, Seo Y, Joung D, Choi J, Lee Y, Kang D, Lee H, Kwon D et al. Curcumin decreases oleic acid-induced lipid accumulation via AMPK phosphorylation in hepatocarcinoma cells. *EurRev Med PharmacolSci*. 2013;17:2578-2586.
- [72] Corinne H. Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase beta par criblage virtuel et RMN [Thèse] Université Toulouse III - Paul Sabatier ; le 16 juillet 2008.

[73] Alban A. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Université d'Orléans ; 2007. Français.

[74] Zeroug E. Analyse in silico de plusieurs séries de pharmacomolécules hétérocycliques appliqué à la conception des médicaments [thèse].Biskra : Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie. Département des sciences de la matière; 2020.

[75] Kitchen DB, Decornez H, Furr JR., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Drug discovery; 2004;3. P.935.

[76] Bissantz C, Folkers G, Rognan D. Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases.1. Evaluation of Different Docking/Scoring Combinations.J. Med. Chem; 2000;43.p.4759.

[77] Weiner PK, Kollman PA, AMBER-assisted model building with energy refinement-a general program for modeling molecules and their interactions. Comput J . Chem;1981; 2. P. 287.

[78] Weiner SJ, Kollman PA, Nguyen DT, DA. Case, An all-atom force field for simulations of protein and nucleic acids . Comput J . Chem;1986; 7. P. 230.

[79] Halperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R .Principles of docking. An overview of search algorithms and a guide to scoring functions, Proteins; 2002; 47. P.409.

[80] Charifson PS, Corkery J, Murcko MA, Walters WP, Consensus scoring. A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins, J. Med.Chem;1999; 42. P.5100.

[81] Terp GE, Johansen BN, Christensen IT, Jørgensen FS. A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities, J. Med .Chem; 2001; 44 . p.2333.

[82] Wang RX, Lai LH., Wang SM. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction, Comput, J. Aided. Mol. Des ; 2002; 16. p .11.

- [83] Thiriote E. Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionin Sulfoxyde Réductases de classe A [Thèse]. Nancy: Université de Nancy. France;2009 .p.291.
- [84] Vieth M, Hirst JD, Kolinski, Brooks CL.1998. Assessing energy functions for flexible docking.Comput J. Chem;19:1612-1622.
- [85] Gabb J, Jackson RM, Sternberg MJE.1997. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information .J. Mol .Biol .272, 106–120.flexible docking.Comput. J. Chem;19: 1612-1622.
- [86] Ghadhab Elh T, Soufi M. Application du docking moléculaire par SURFLEX pour la mise en évidence des nouveaux inhibiteurs de la kinase dépendante de la cycline 2(CDK2).[mémoire]. Université des frères Mentouri Constantine 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie département de Biochimie et biologie moléculaire. 2020.
- [87] Boulfefel S, Djeghroud B. Recherche in silico de nouveaux inhibiteurs de la Nicotinamide Phosphoribosyltransférase pour le traitement du cancer colorectal [Mémoire] .Université des frères Mentouri Constantine 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département de Biochimie et Biologie Cellulaire Moléculaire. 2020.
- [88] Lamri Zegar S, Chadi H. Prédiction in silico de la structure 3D et étude d'amarrage moléculaire de la xanthine oxydoréductase [Mémoire] Centre universitaire Abdelhafid Boussouf -Mila .Institut des Sciences et de la Technologie. Département des Sciences de la Nature et de la Vie. 2020/2021.
- [89] Kerboua Laouar A, Kerrouchi R. Docking moléculaire in silico et propriétés ADMET de certains composants d'huile de graines de Lepidum Sativum contre l'Acétylcholinestérase pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Université Frères Mentouri -Constantine 1. [Mémoire]. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie Appliquée. 2021.
- [90] Makhloufi Kh, Lazreg I. Conception in silico de nouveaux composés anticancéreux [Mémoire]. Université Mohamed Khider de Biskra. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département des Sciences de la Matière.2019.

- [91] Laurent H. Développement et validation du logiciel S4MPLE. Application au docking moléculaire et à l'optimisation de fragments assistée par ordinateur dans le cadre du fragment-Based Drug Design [thèse]. Université de Strasbourg . École doctorale des Sciences Chimiques UMR7140. 2013.
- [92] Canault B. Développement d'une plateforme de prédiction in silico des propriétés ADME-Tox [thèse]. France: Université d'Orléans; 2018.
- [93] Lombardo F, Desai PV, Arimoto R, Desino KE, Fischer H, Keefer CE et al. In Silico Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics (ADME-PK): Utility and Best Practices. An Industry Perspective from the International Consortium for Innovation through Quality in Pharmaceutical Development. *J Med Chem*. 2017;60:9097–9113.
- [94] Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(8):711-5.
- [95] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Mar 1;46(1-3):3-26.
- [96] Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*. 2002 Jun 6;45(12):2615-23.
- [97] Talevi A, Quiroga PAM. ADME Processes in Pharmaceutical Sciences: Dosage, Design, and Pharmacotherapy Success. 1^{er} ed. Argentine: Springer Cham; 2018.
- [98] Marchant CA, Briggs KA, Long A. In silico tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: derek for windows, meteor, and vitic. *Toxicol Mech Methods*. 2008; 18(2-3). p. 177-87.
- [99] Luis G, Valerio Jr. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 241(3):356-70.
- [100] Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res*. 1975 Dec;31(6): 347-64.

[101] Keller DI et al. Characterization of novel KCNH2 mutations in type 2 long QT syndrome manifesting as seizures. *Can J Cardiol.* 2009 Aug; 25(8):455-462.

[102] Helen M. Berman, John W, Philip E. Protein Data Bank. *Bournucleic acide res.* [En ligne]. [Consulter le 02/04/2022]; 235-242. 1.Janv 2000. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc//articles/PMC102472/Pdb>.

[103] Disponible sur :

<http://elearning.univ-biskra.dz/moodle/mod/resource/view.php?id=68580>

[104] Bartolucci C, Perola E, Pilger C, Fels G, Lamba D. Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins.* 1 ;42(2) :182-91.2001 Feb.

[105] Kadrilege et Datacross. ChemDraw 18.0, Le dessin moléculaire par excellence [En ligne]. [Consulté le 23/05/2022]. Disponible sur <https://ritme.com/fr/logiciels/chemdraw-chemoffice/>.

[106] Site Web : <https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/>.

[107] Site Web : <https://vina.scripps.edu/manual/>.

[108] Site Web :

https://www.3ds.com/fileadmin/PRODUCTSSERVICES/BIOVIA/PDF/Discovery_Studio_Course_Catalog-biovia.pdf.

[109] Site Web: <http://pymol.sourceforge.net/newman/userman.pdf>.

[110] Hawkins PC, Warren GL, Skillman AG, Nicholls A. How to do an evaluation: pitfalls and traps. *J Comput Aided Mol Des.* 2008;22(3-4):179-90.

[111] Saoussene ML. Etude docking et synthèse de dérivés de xanthone : voie d'accès à de nouveaux inhibiteurs de l' α -glucosidase [Thèse]; 2016.

[112] Kirchmair J, Markt P, Distinto S, Wolber G, Langer T. Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection--what can we learn from earlier mistakes?. *J Comput Aided Mol Des.* 2008;22(3-4):213-28.

[113] Source:Guoli X, Zhenxing W, Jiakai Y, Li F, Zhijiang Y, Changuy H et al. ADMETlab2.0: Une plateforme en ligne intégrée pour des prédictions précises et complètes des propriétés ADMET. NucleicAcidsResearch [En ligne]. [Consulté le 28/05/2022] 2;49(W1): W5-W14.2021juil.

[114] Site Web : <https://admetmesh.scbdd.com/>.

[115] Cheung J, Gary EN, Shiomi K, Rosenberry TL. Structures of Human Acetylcholinesterase Bound to Dihydratanshinone I and Territrem B Show Peripheral Site Flexibility. ACS Med Chem Lett. 2013 Sep 23;4(11):1091-6.

[116] Luo S, Pal D, Shah SJ, Kwatra D, Paturi KD, Mitra AK. Effect of HEPES buffer on the uptake and transport of P-glycoprotein substrates and large neutral amino acids. Mol Pharm . 2010 Apr 5;7(2):412-20.

[117] Aymar GWL. Simulation numérique et approche orientée connaissance pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques [Thèse]. Université Henri Poincaré; 2010.

[118] Hadhoum N, Hadjadj-Aoul FZ, Hocine, Smain et al. "DESIGN AND ONE-POT SYNTHESIS OF SOME NEW [3, 5-DI (4', 5'-DIPHENYL-2'-SUBSTITUTED)-1H-IMIDAZOL-1-YL]]-1H-1, 2, 4-TRIAZOLE DERIVATIVES: IN SILICO ADMET AND DOCKING STUDY, ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES EVALUATION. Heterocycles : an international journal for reviews and communications in heterocyclic chemistry. 2021;102(10) :1949-68.

[119] Imberty A, Hardman KD, Carver JP et Perez S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. Glycobiology. 1 déc 1991; 1(6):631 - 42.

[120] Médicaments de la maladie d'Alzheimer : les points essentiels [En ligne]; 15 mai 2019. [Consulté le 13/03/2022]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/stimulants-de-la-cognition-les-points-essentiels>.

[121] Site Web : <https://go.drugbank.com/drugs/DB00989>.

[122] Malone K, Hancox JC. QT interval prolongation and Torsades de Pointes with donepezil, rivastigmine and galantamine. Ther Adv Drug Saf. 2020 Aug 17;11: 1–14.

[123] Site Web : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77991>.

[124] Sandoz R. Monographie de produit.Sandoz Canada Inc.145 Jules-léger Boucheville,
QC, Canada J4B 7K8. 1 Dec 2016. p.1-58. Disponible sur :

https://www.sandoz.ca/sites/www.sandoz.ca/files/Rivastigime_PM_French20150409.pdf

Résumé

Actuellement, aucun traitement pharmacologique ne permet de guérir la MA et les maladies apparentées, ni même permettre d'arrêter son évolution, néanmoins il existe des médicaments qui ont la capacité de ralentir les symptômes de la maladie, principalement les inhibiteurs cholinestérases. Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à la conception d'une seule série de six molécules obtenues en s'inspirant de la rivastigmine et ayant pour cible probable AChE (4EY6). Un docking moléculaire a été réalisé pour les molécules de la série grâce au logiciel Autodock Vina (ADV). Une étude, *in silico*, des propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et la toxicité par l'intermédiaire du serveur ADMET lab2.0. Le composé M4 a donné le meilleur score (-8.5) comparé aux autres molécules et la rivastigmine. Pour la rivastigmine, nous avons obtenus un score de (-7.2). Enfin, la prédiction des paramètres pharmacocinétiques et physico-chimiques a montré que ce composé prometteur (M4) possède un bon profil ADMET et peut être proposé comme inhibiteur potentiel de l'AChE. Le présent travail ouvre une large piste de développement et les résultats obtenus au cours de ce travail ne sont que préliminaires. Une étude expérimentale complémentaire permettra de vérifier les résultats théoriques obtenus *in silico*.

Mots clés : MA, rivastigmine, Autodock Vina, docking moléculaire, AChE

Abstract

Currently, no pharmacological treatment allows to cure the Alzheimer's disease and the related diseases. Nevertheless, there are drugs that have the capacity to slow down the symptoms of the disease, mainly cholinesterase inhibitors. In our study, we were interested in the design of a single series of 6 molecules obtained from rivastigmine and having for probable target AChE (4EY6). Molecular docking was performed for the molecules of the series using the AutodockVina (ADV) software. *In silico* study of the physicochemical properties, pharmacokinetics and toxicity through the ADMET lab2 server. The compound M4 has showed the best score (-8.5) compared with rivastigmine and other compound. The score of rivastigmine is (-7.2). Finally, the prediction of pharmacokinetic parameters and physicochemical properties shows that this promising drug has good ADMET profiles and can be proposed as a new potential AChE inhibitor. The present work opens a broad developmental avenue and the results obtained in this work are only preliminary. A complementary experimental study *in vitro* and/or *in vivo* should be allowed to confirm the theoretical results obtained *in silico*.

Key words : Alzheimer's disease, rivastigmine, AutodockVina, molecular docking, AChE