

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

UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES EXACTES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :.....

Série :.....

MEMOIRE

Présenté par

Mr : KRID ADEL

Pour obtenir

Le grade de MAGISTER EN CHIMIE THEORIQUE

Intitulé

Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant.

Soutenu le / / 2008 devant la commission d'examen :

Mr. D. KHELIFI *Prof* Université Mentouri-CONSTANTINE **Président.**

Mr. M. BENCHARIF *Prof* Université Mentouri-CONSTANTINE **Directeur.**

M^{me} L. BENCHARIF *M.C* Université Mentouri-CONSTANTINE **Examinatrice**

Mr. T.BENLECHEB *M. C* Université Mentouri-CONSTANTINE **Examineur**

Remerciements

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à *Monsieur le Professeur Mustapha Bencharif*, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son groupe de recherche, pour sa disponibilité, pour la confiance qu'il m'a témoigné ainsi que pour ses nombreux encouragements dans les moments difficiles durant ces années.

Je tiens à remercier Monsieur Khelifi Douadi Professeur à l'Université de Constantine pour avoir accepté la présidence de mon jury.

Ma gratitude va à *Monsieur Tahar Benlecheb M.C* à l'Université de Constantine pour avoir trouvé une disponibilité et accepté d'être membre de jury de thèse.

J'adresse mes respectueux remerciements à *Madame Leila Bencharif*, maître de conférence à l'université Constantine pour avoir accepté d'être un membre de ce jury pour son aide durant ces années que j'ai passé au laboratoire de chimie des matériaux et pour ses conseils qui m'ont été vraiment un guide durant ma formation.

Je remercie mes parents, pour l'amour, l'aide et le soutien qu'ils m'ont toujours apporté aussi bien dans les moments difficiles que radieux.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de notre laboratoire pour la bonne ambiance qu'elle sait apporter et pour son aide scientifique.

I can't forget my beautiful Wafa for her help and her encouragement during these last years, I tell you: THANKS SO MUCH HONEY.

A mes parents,

A mon frère et sœurs,

A toi Wafa.

Sommaire

Introduction :	1
Chapitre I : Aspect biologique :	3
I-Le stress oxydant.....	4
I-1-Définition.....	4
I-2- Les espèces réactives de l'oxygène.....	5
I-3- comment lutter contre les divers réactifs de l'oxygène.....	6
II- La maladie d' Alzheimer.....	7
II-1- Définition et généralit.....	7
II-2- Traitement de la maladie d' Alzheimer.....	7
BBLIOGRAPHIE	10
Chapitre II : Aspect chimique : protéine et ligand	12
I-Structure des protéines.....	13
I-1- structure primaire.....	13
I-2- structure secondaire.....	13
I-3- structure tertiaire.....	14
I-4- structure quaternaire.....	15
II- rôle biologique des protéines.....	16
III- le ligand.....	17
IV- Protéines et interactions intermoléculaires.....	17
V- fonctions des protéines.....	18
VI- Les enzymes.....	20
VI-1- définition.....	20
VI-2- Spécificité de l'association protéine ligand ; le site actif.....	20

VI-3- Inhibition enzymatique.....	20
VI-3-1- Inhibition compétitive.....	21
VI-3-2- Intérêt de l'inhibition compétitive	21
VII- Contributions majeures dans les interactions protéine ligand.....	22
BIBLIOGRAPHIE.....	24
Chapitre III : Structure de l'Acétylcholinestérase et ces inhibiteurs.....	26
I-Structure de l'acétylcholinestérase.....	27
I-1 Présentation.....	27
I-2- Le site actif et la triade catalytique.....	28
I-3- Le site anionique périphérique.....	29
II- L'acylation du substrat.....	29
III- Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.....	31
III-1- Les inhibiteurs pseudo-irréversibles.....	31
III-2- Les inhibiteurs irréversibles.....	32
III-3- Les inhibiteurs analogues à l'état de transition.....	32
III-4- Les inhibiteurs réversibles.....	33
III-4-1- Les amino-acridines.....	33
III-4-2- Les N-Benzylpipéridines.....	33
III-4-3- Les alcaloïdes.....	34
BIBLIOGRAPHIE.....	36
Chapitre IV : Le Docking moléculaire.....	37
I-Définition.....	38
II- Etat de l'art du Docking moléculaire.....	38
II-1- Quel matériel faut-il pour le docking moléculaire ?.....	38

II-2- Comment fonctionne un programme de docking moléculaire ?.....	39
III- Algorithmes de recherche conformationnelle ou heuristique d'échantillonnage.....	40
1) La méthode de Monté carlo.....	41
2) Algorithmes évolutionnaires.....	42
IV- Fonctions de Score ou fonctions Objectives.....	43
A- Fonctions de score se basant sur les champs de forces.....	44
B- Fonctions de score empiriques.....	45
C- Fonctions de score basées sur des données ou fonctions statistiques.....	46
D- Fonction de score consensus.....	47
BIBLIOGRAPHIE	48
Chapitre V : résultats et Discussions	52
1- Interaction Acétylcholine- Acétylcholinestérase.....	53
2- Interaction TACRINE- Acétylcholinestérase.....	55
3- Interaction de 1,3-biphényl-2-propen-1-on et ses dérivées – AChE.....	58
BIBLIOGRAPHIE	71
Conclusion générale	72
Annexe	

Introduction :

Au cours de ces dernières années, la recherche pour découvrir de nouveaux traitements ont été améliorées en partant de la procédure d'essai-erreur, à la procédure sophistiquée qui inclue plusieurs approches basées sur des calculs théoriques de la chimie quantique.

Ces approches théoriques permettent de prédire le mode d'interaction d'un ligand avec son récepteur. Elles fournissent un moyen d'étudier les interactions au niveau moléculaire et sont, de ce fait, une indication à l'activité biologique de nouvelles molécules ne tenant compte que des critères structuraux.

Ces approches peuvent être classées en deux catégories :

- De novo design.
- Le Docking moléculaire.

Le Docking moléculaire, vise à prédire la structure d'un complexe constitué d'un ligand et d'une protéine, pour prévoir les modes d'interactions possibles pouvant mener à une valeur d'enthalpie libre de formation qui traduit l'inhibition de la cible étudiée. Les anciens formalismes de Docking moléculaire, traitent la protéine ainsi que le ligand comme des corps rigides. A présent, les nouveaux codes prennent en compte la flexibilité du ligand.

C'est dans ce contexte, que notre équipe de chimie théorique du laboratoire de chimie des matériaux (LCM) s'est intéressée à étudier les interactions entre l'acétylcholinestérase et divers ligands choisis parmi les molécules préparées au sein du laboratoire.

Le choix de cet enzyme est dicté par son rôle dans le dysfonctionnement au niveau des synapses caractérisant la maladie d'Alzheimer. Bien qu'à notre connaissance, le déficit de l'acétylcholine ne soit pas le seul incriminé, sa régénération ou son rétablissement peut aboutir à une amélioration des symptômes remarquables de la maladie.

Les travaux sont présentés comme suit :

- Le premier chapitre porte sur la description du stress oxydant.
- Le second concerne la pathologie de la maladie d'Alzheimer.
- Le troisième chapitre présente la structure tridimensionnelle de l'acétylcholinestérase ainsi ces inhibiteurs connus.
- Le quatrième chapitre présente le divers aspect du Docking moléculaire.
- Le dernier chapitre expose l'essentiel de nos résultats et discussion.

A titre indicatif, nous avons mis en annexe après la conclusion, les notions élémentaires sur les acides aminés qui constituent les protéines.

I- Le Stress Oxydant

I-1 Définition :

L'oxydo-réduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie et pour notre organisme, puisque l'oxygène est l'accepteur d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP. Dans le cas où il y a transfert d'un nombre d'électrons impair, il y a formation d'espèces toxiques ayant des électrons non appariés (célibataires), appelées radicaux libres. Parmi ceux-ci, peuvent être cités les radicaux peroxy (ROO^\cdot), alcoxy (RO^\cdot), superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et hydroxyles (HO^\cdot). Ces radicaux centrés sur l'oxygène (appelés ainsi parce que l'électron célibataire est porté par l'atome d'oxygène) sont reconnus par leur grande réactivité et font partie des espèces oxygénées réactives (ROS : Réactive Oxygen Species, selon la terminologie anglo-saxonne) [25]. Il a été démontré que les ROS oxydent les lipides, les protéines, les enzymes et l'ADN. Ces dommages oxydatifs sont considérés comme la cause principale de nombreuses maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer (Gutteridge, 1993).

Notre organisme produit naturellement ces radicaux libres. Lorsqu'ils sont, dans un organisme équilibré ils sont neutralisés par des enzymes et par des molécules anti-oxydantes telles que les vitamines C, E ou Q (aussi appelée coenzyme Q).

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron ou son transfert sur une autre molécule. La probabilité entre ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré. Si elle est modérée, la probabilité d'accepter un électron est grande et, dans ce cas, le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydoréduction classique. Si au contraire cette instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule.

Le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre en faveur des espèces pro-oxydantes. A titre d'exemples quelque cas favorisant cet état sont :

- l'introduction dans la cellule de radicaux libres ou d'espèces réactives oxygénées (polluants photochimiques pénétrant l'organisme via le système respiratoire, l'alimentation ou les muqueuses) [1].

- un défaut du système de protection, par exemple une mutation inactivant une des enzymes du système de protection ou une carence en une des vitamines.

-l'introduction dans la cellule ou dans un organe de molécules hautement réactives, par exemple nanoparticules (très petite et à surface spécifique très développée). Si celles-ci sont nombreuses, les macrophages n'arrivent plus à les traiter et peuvent libérer leurs oxydants dans l'organisme provoquant une réaction inflammatoire exacerbée.

Le *stress oxydant* est un facteur d'inflammation et de mutagenèse, mais il est aussi considéré comme une des principales causes de cancer et jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer, comme dans plusieurs pathologies plus courantes telles que les maladies cardiovasculaires, l'arthrite rhumatoïde ou les cataractes. Les antioxydants convenablement dosés peuvent diminuer les altérations cellulaires et contribuent ainsi à l'équilibre de l'organisme [2].

I-2 Les espèces réactives de l'oxygène :

Les espèces réactives de l'oxygène regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de cet atome mais également d'autres composés non-radicalaires très réactifs. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont regroupées dans le tableau suivant :

ROS	Formule chimique
Oxygène moléculaire	$^3\text{O}_2$
Dioxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion superoxyde	O_2^-
Radical hydroxyle	OH^\bullet
Radical hydroperoxyde	HOO^\bullet
Radical peroxyde	ROO^\bullet
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO^\bullet
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^\bullet
Peroxinitrite	ONOO^\bullet
Hypochlorite	ClO^\bullet

Tableau : Espèces réactives de l'oxygène. [24]

I-3 Comment lutter contre les divers réactifs de l'oxygène ?

Le type de radicaux produit ainsi que leurs lieux de production et de propagation étant variés, la riposte anti-radicalaire est polymorphe, à la fois préventive et curative [3]. Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous organismes, qu'ils soient intracellulaire, membranaires ou extracellulaires. Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires).

Le fer et le cuivre sous forme libre sont particulièrement promoteurs de dommages radicalaires. Ces métaux sont physiologiquement transportés grâce à des protéines comme la ferritine, la transférine, la céruloplasmine....qui agissent donc en tant qu'antioxydants primaires.

Le superoxyde dismutase est une enzyme convertissant le superoxyde en hydrogène peroxyde. Ce dernier est ensuite, soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase, soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion, catalysée par la glutathion peroxydase. Le glutathion oxydé est non toxique et peut en outre être réduit par le NADPH grâce à l'enzyme glutathion réductase. La glutathion peroxydase ainsi que les différentes isoformes de superoxyde dismutase sont des métallo-enzymes comprenant soit du sélénium (glutathion peroxydase) soit du manganèse (glutathion dismutase mitochondriale) soit du cuivre et du zinc (superoxyde dismutase cytosolique). C'est donc indirectement que ces métaux possèdent une activité antioxydante [4].

Les scavengers liposolubles, comme l' α -tocophérol (vitamine E), sont concentrés dans les membranes cellulaires où ils sont particulièrement efficaces pour limiter la superoxydation lipidique. Leur effet protecteur est principalement lié à leur capacité à céder un de leurs électrons pour arrêter la propagation radicalaire tout en étant capable soit de céder un second électron lors d'une réaction d'oxydation conventionnelle soit de se régénérer par le remplacement de l'électron manquant [5].

Dans les milieux hydrosolubles, de nombreuses molécules semblent avoir un pouvoir antioxydant. C'est le cas de la vitamine C, de l'acide urique, de l'albumine et de la bilirubine. Dans la pratique, leur pouvoir de scavenger n'est pas toujours évident. La vitamine C, par exemple a des effets pro-oxydants en présence d'ions métalliques [6-7]

II- La maladie d'Alzheimer :

II-1- Définition et généralités :

La démence entraîne une détérioration chronique de la fonction intellectuelle et d'autres aptitudes cognitives assez grave pour nuire à la capacité de se livrer aux activités de la vie quotidienne [8].

La démence est une maladie qui augmente avec le vieillissement cellulaire [9-10]. Elle est décrite pour la première fois en 1906 par Alois Alzheimer, neuropathologiste allemand [11]. Elle est à l'origine de 40 à 70% des syndromes démentiels [12,13].

La maladie d'Alzheimer est un déséquilibre neurodégénérative et irréversible qui détruit progressivement les cellules nerveuses du cerveau. Elle se manifeste par différents troubles des fonctions intellectuelles (mémoire des faits récents, orientation dans le temps et dans l'espace, langages, utilisation des objets...), dont la progression conduit à une perte progressive d'anatomie [14,15]. Elle se manifeste, entre autres, par la détérioration des cellules nerveuses libérant une substance appelée Acétylcholine, dont le rôle est de transmettre les messages entre les cellules du cerveau. Le déficit en Acétylcholine chez les malades est aggravé par l'action d'une enzyme, l'Acétylcholinestérase (AChE), qui décompose rapidement l'Acétylcholine. Les traitements liés à la RIVASTIGMINE, la TACRINE, le DONEPEZIL, ont pour but d'inhiber l'AChE pendant un temps suffisamment long pour que le taux d'Acétylcholine puisse se relever.

II-2-Traitement de la maladie d'Alzheimer :

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

La cause exacte est encore inconnue, mais il est supposé que des facteurs environnementaux et génétiques y contribuent. Les plus grandes méthodes dans le traitement de la MA se focalisent sur deux aspects fondamentaux : traitement au niveau des plaques séniles ou plaque amyloïdes, et traitement de la transmission cholinergique. Ce sont les deux approches dans le traitement de cette maladie.

Dans la première approche, Il s'agit donc de lésions extracellulaires de la maladie d'Alzheimer. Ces plaques correspondent à l'accumulation d'un peptide anormal et neurotoxique de 42 acides aminés, le peptide bêta-amyloïde. Ce peptide, provient d'un mauvais clivage de la protéine APP (Amyloïd Protein Precursor). Ceci participerait à l'entrée

massive de calcium dans le neurone et activerait la microglie (réaction inflammatoire), ce qui entraîne la mort du neurone par nécrose ou par apoptose. Donc il est préalable de prévenir la formation de ce peptide ou au moins diminuer sa génération ou déposition. De ce fait il est demandé de bloquer ou inhiber l'APP qui est responsable de la formation des AB peptides [23].

La plus grande partie des recherches scientifiques réalisées sur le traitement de la maladie d'Alzheimer(MA) a été guidée par un constat : l'existence d'une relation dans cette maladie, entre le déficit des neurotransmissions cholinergiques et les différents symptômes, en particulier cognitifs. Les recherches en ont donc eu pour but d'augmenter l'activité cholinergique centrale. [16] ce qui définit la deuxième approche dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Les plus étudiés, les inhibiteurs des cholinestérases, sont les seuls à avoir obtenu jusqu'à présent une application clinique [16].

Le précurseur des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase est la PHYSOSTIGMINE, elle a montré chez des patients une amélioration de la mémoire et des fonctions cognitives [17]. Cependant l'intérêt de cette molécule est limité par sa demi-vie très courte [18].

En 1986, Summer et al. [19] ont rapporté des résultats intéressants sur la TACRINE, autre inhibiteur de l'acétylcholinestérase qui présentait l'avantage d'une demi-vie de durée supérieure à celle de la PHYSOSTIGMINE. C'est le premier médicament dont l'utilisation a été autorisée dans la MA par la FDA aux USA (en 1993) et par la France (AMM en Mai 1994) [20].

En novembre 1996, le DONEPEZIL, un inhibiteur sélectif de l'acétylcholinestérase a été autorisé par la FDA et en septembre 1997, il a reçu son AMM en France [21]. Le troisième médicament de la classe arrivé sur le marché est la RIVASTIGMINE. Il a reçu son AMM en 1998 en France et dans de nombreux pays européens [22]. La TACRINE, le DONEPEZIL et la RIVASTIGMINE, tous inhibiteurs des cholinestérases, sont actuellement les seuls médicaments disponibles dans le traitement symptomatique des formes légères à modérées de la maladie d'Alzheimer.

Notre travail consiste à tester quelques nouvelles molécules de type Chalcone sur l'acétylcholinestérase. Il s'agit de calculer la grandeur thermodynamique de l'enthalpie libre

du complexe formé à partir de la protéine hôte et un ligand. A partir des résultats obtenus nous étudierons les principales interactions lors de la formation des complexes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]- http://fr.wikipedia.org/wiki/Stress_oxydant
- [2]- GUTTERIDGE JM. Free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequence. Free Radic Res Commun, 1993, *19* : 141-158.
- [3]-HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity, cause, or consequence ? Lancet, 1994, *344* : 721-724.
- [4]- Ganther H.E., Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention : complexities with thioredoxin reductase, carcinogenesis,1999,20(9), p.1657.
- [5]-Packer L., protective role of vitamin E in biological systems, Am. J. Clin. Nutr.,1991, 53, p.1050S
- [6]- BUETTNER GR, JURKIEWICZ BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals : combinations to avoid. Radiat Res, 1996, *145* : 532-541.
- [7]- HERBERT V, SHAW S, JAYATILLEKE E. Vitamin C-driven free radical generation from iron. J Nutr, 1996, *126* : 1213S-1220S.
- [8] MH. Beers, R. Berkow, (eds). The Merck manual of diagnosis and therapy. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories, 1999 1999.
- [9] J. L Cummings, G. Cole. Alzheimer disease, JAMA 2002 2002, 287, 2335-8.
- [10] Bird TD. Maladie d'Alzheimer et autres demences. In : Principe de medecine interne d'Harrison eds. Braunwald E, Fauci AS. Kasper DL, et al.New York. MC Graw Hill, 2001 2001. 2391-8.
- [11] K. Maurer, S. Volk H. gerbaldo, D. Auguste. premiere patiente du docteur Alzheimer. La recherche, 1997 1997, 303, 58-60.
- [12] A.S Henderson. Alzheimer's disease in its epidemiological context. Acta neurol Scand, 1993, 88 (suppl 149) , 1-3.
- [13] C. Desrouene. Maladie d'Alzheimer. Rev Prat 1997 1997, 47 (1), 87-90.

[14] A. Brice. La maladie d'Alzheimer, Encyclopedie Orphanet, octobre 2004 2004.

[15] C. Belisle, B. Rivard et coll. La demence de type Alzheimer et les autres atteintes cognitives. Ed formed 1999 1999.

[16] Schneider LS, Tariot PN. Emerging drugs for Alzheimer's disease : mechanisms of actions and prospects for cognitive enhancing medications. Med Clin North Am 1994 ; 78 : 911-34

[17] Rogers SL, Friedhoff LT et all. The efficacy and Safety of Donepezil in Patients with Alzheimer's Disease : Results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Dementia 1996 ; 7 : 293-303

[18] Gustafon L. Physostigmine ant tetraaminoacridine treatment of Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand 1993 ; 88 (suppl 149) : 39-41

[19] Summers WK, Majovski LV, Marsh GM et al . Oral tetrahydro aminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. N Engl J Med 1986 ; 315 : 1241-45

[20] Blanche cotte H et al . Tacrine. Dossier CNIMH 1995 ; 16 (4) : 55-83

[21] Laboratoire Esai. Aricept . Dossier scientifique hospitalier.

[22] Kuman V. Un nouvel inhibiteur de la cholinestérase dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Int J Geriatr Psychopharmacology 1998 ; 1 : Editorial

[23] G. V. Ferrari, M. A. Canales. L. M. Weiner, I. Silman, N. C. Inestrosa, *Biochemistry.*, **2001**, 40, 10447-10457.

[24] Thèse de Doctorat d'Etat en biochimie Appliquée. A. Bensegueni. 2007.

[25] NOVELLIGP. Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol*, 1997, 48 : 517-527.

Chapitre II

Aspect chimique : protéine et ligand

I- Structure des protéines :

Les molécules constituant les êtres vivants peuvent être classées en quatre grandes familles : les lipides, les carbohydrates, les acides nucléiques et les protéines. D'un point de vue chimique, une protéine est un hétéro-polymère linéaire, c'est-à-dire qu'elle est le résultat de l'enchaînement linéaire de monomères : les acides aminés ou résidus. La structure d'une protéine peut être décrite à plusieurs niveaux de structure [1].

I-1 - Structure primaire :

La structure primaire correspond à la séquence proprement dite de la protéine, c'est-à-dire à l'enchaînement des acides aminés par la liaison peptidiques [1]. On dénombre pas moins de 20 acides aminés qui ne diffèrent les uns des autres que par leur chaîne latérale (groupement R) portée par le C α (voir annexe). On parle de peptide lorsque le nombre de résidus formant la molécule est inférieur à 50 et de protéine au-delà de 50 résidus.

I-2- Structure secondaire :

La structure secondaire d'une protéine correspond aux repliements qu'adoptent les portions partielles de la séquence protéique, caractérisées par les angles dièdres ω, ϕ, ψ de leurs résidus (Figure02) et par la présence de certaines liaisons hydrogène.[2]

Dans les protéines, les acides aminés sont reliés entre eux par une liaison peptidique $O=C-N-H$ caractérisée par 2 formes imposant ainsi à l'angle de torsion de la liaison C-N (angle dièdre ω) deux valeurs particulières (Figure03)

0° : liaison peptidique cis : son taux d'occurrence est très faible. C'est avec la proline que l'on a le plus de chance d'observer une liaison peptidique cis : jusqu'à 10% de l'ensemble des prolines (Fischer et al.1994).

180° : liaison peptidique trans : c'est la forme la plus stable correspondant à la forme quasiment exclusivement observés dans les protéines.

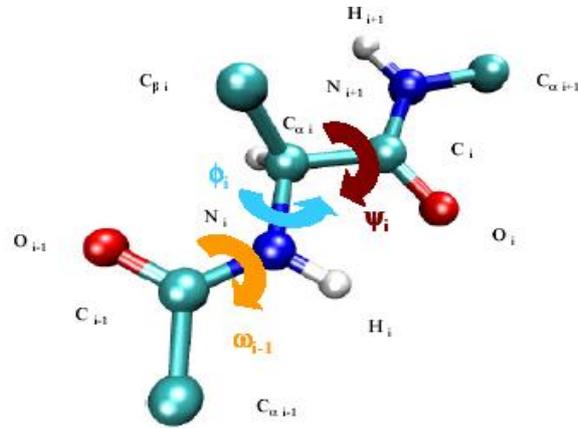


Figure 02 : Définition des Angles dièdres ω , ϕ et ψ .

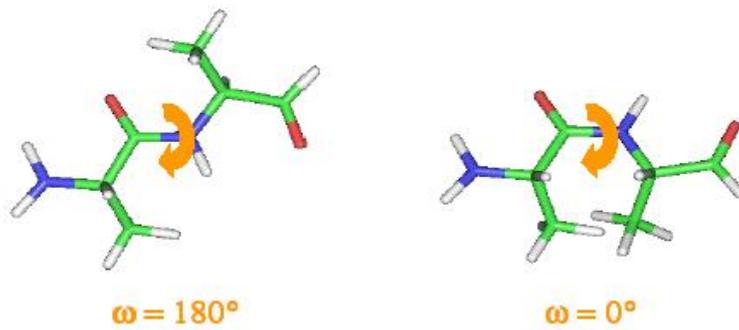


Figure 03 : Liaisons peptidiques *trans* ($\omega = 180^\circ$) et *cis* ($\omega = 0^\circ$).

Puisque la grande majorité des liaisons peptidiques sont en conformation *trans* ($\omega=180^\circ$), il est donc possible de décrire la structure d'une protéine à partir de ces deux angles dièdres ϕ et ψ . L'angle dièdre Φ correspond à l'angle de torsion de la liaison N-C α et ψ , à l'angle de la torsion de la liaison C α -C (Figure02).

I-3- Structure tertiaire :

La structure tertiaire des protéines correspond au repliement et à l'assemblage des différents éléments de structures secondaire. Cette structure correspond en fait à la structure tridimensionnelle (structure3D) de la protéine (Figure04). Ce sont des interactions non liantes de types électrostatiques et de Van Der Waals, ainsi que les ponts salins, les liaisons hydrogènes et les ponts disulfures qui permettent de stabiliser ce type de structure [3].

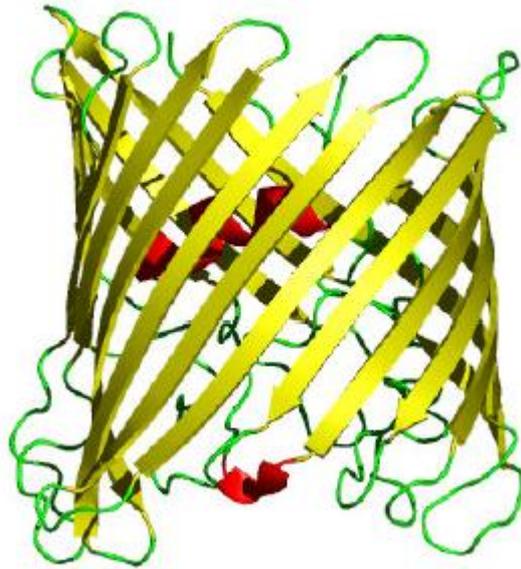


Figure04 : structure tertiaire de la porine (code PDB 1E54)

I-4- Structure quaternaire :

La structure quaternaire d'une protéine résulte de l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques ou sous-unités [1-2]. Ces sous unités peuvent être identiques comme c'est le cas de l'hémoglobine (Figure05) ou bien radicalement différentes comme dans le cas de la protéine du virus du tabac.

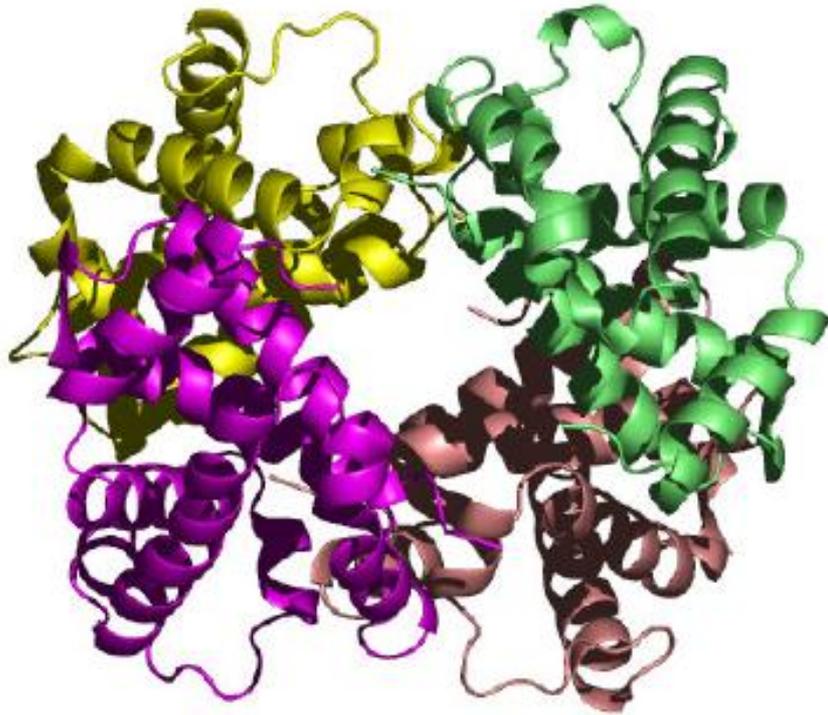


Figure05 : Structure quaternaire de l'hémoglobine humaine (code PDB : 1a3N)

Constituée de 4 sous-unités identiques représentées en différentes couleurs.

II- Rôle biologique des protéines [4]:

Les protéines ont un grand et large rôle dans l'organisme des êtres vivants, on peut citer comme exemples :

- la catalyse enzymatique car la protéine peut augmenter la vitesse d'une catalyse d'un facteur de 10^6 .
- Le transport membranaire, ou dans l'organisme de l'être vivant.
- La protection immunitaire (anticorps).
- Le support mécanique (collagène).
- Le mouvement (les protéines musculaires comme l'actine et la myosine).
- La création et la transmission de l'influx nerveux (système nerveux).
- Le contrôle de la croissance et la différenciation cellulaire (information génétique, hormones...).

Dans la majorité des rôles biologiques cités, la protéine joue le rôle de récepteur, et dans la conception des médicaments, elle est le site multi potentiel par rapport au mode de fixation de différents conformères d'une drogue.

III- Le ligand :

Un ligand est une molécule chimique, qui pourrait être composée d'un ou de plusieurs fragments (groupements)[5-6]. Il peut être :

- 1- Un substrat : Molécule qui se fixe au site actif de la protéine ou de l'enzyme pour subir une action : (décarboxylation, hydrolyse, déshydrogénation...).
- 2- Coenzyme : Molécule qui complète l'action de certaines enzymes.
- 3- Activateur : Composé chimique qui entraîne un changement de conformation du site actif de l'enzyme pour augmenter son affinité pour le substrat.
- 4- Inhibiteur : Contrairement à l'activateur, ce type de ligand modifie la structure électronique du site actif en diminuant l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

IV- Protéines et interactions intermoléculaires [1-2]:

Les molécules organiques sont capables de s'auto associer les unes aux autres grâce à plusieurs types de liaisons faibles, dont les forces électrostatiques, les forces de van der Waals, les liaisons hydrogène et les liaisons hydrophobes. Les associations sont dues aux propriétés chimiques, électroniques, et géométriques des molécules. A l'inverse des liaisons covalentes, les liaisons faibles permettent une grande flexibilité et plasticité des macromolécules (protéine, enzymes, complexes protéine-ligand ou protéine- protéine).

Les interactions qui stabilisent les structures tridimensionnelles des macromolécules sont :

- Electrostatiques lorsqu'elles concernent les interactions de type dipôle / dipôle permanent d'une part et les ponts salins d'autre part.
Ces derniers, correspondent aux interactions entre régions chargées déterminées par les lois de l'électrostatique. A pH physiologique, les résidus chargés positivement sont les lysines, les arginines, certaines histidines et l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique. Les résidus chargés négativement sont les aspartates, glutamates et l'extrémité C-terminale.

- De type VDW lorsqu'elles concernent des nuages électroniques de deux atomes adjacents conduisant à la présence d'une force attractive pour des distances de 3-4 Å° (ces forces comprennent une composante attractive à longue portée [force de dispersion de London] et une composante répulsive à très courte portée). Cependant, de par leur grand nombre, ces interactions jouent un rôle important dans la stabilisation des complexes et favorisent leur compacité.
- De type hydrogène lorsqu'elle résulte de manière électrostatique entre un atome d'hydrogène(H), lié par covalence à un atome électronégatif (O, N, S) (donneur) et un deuxième atome électronégatif possédant une paire d'électrons non partagée (accepteur). Les liaisons hydrogène sont plus fortes que les liaisons de van der Waals ; leurs énergies sont estimées entre 3 et 9 kcal/mol. Les acides aminés polaires peuvent ainsi former des liaisons hydrogène entre eux ou avec des molécules d'eaux.
- De type hydrophobes et de solvations lorsque les molécules non polaires tendent à se rapprocher afin de limiter les contacts avec l'eau, et à créer entre elles des liaisons dites interactions non covalentes. Les acides aminés hydrophobes ont des chaînes latérales non chargées et non polaire ; il s'agit de l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, le tryptophane et la méthionine. De même que les interactions de van der Waals, les effets hydrophobes sont responsables de la densité à l'interface dans les assemblages macromoléculaires.

V-Fonctions des protéines :

La catalyse enzymatique est un facteur des rôles majeurs joués par les protéines dans les cellules. En effet les réactions favorables d'un point de vue thermodynamique ont lieu au sein des cellules mais ne se réalisent pas spontanément (ou alors à une vitesse très faible) en raison de l'existence d'une barrière énergétique difficile à franchir, ou à augmenter la vitesse de réaction [7].

Une enzyme ne catalyse en générale qu'une seule réaction, parce qu'elle n'est pas capable de se lier efficacement qu'à un seul substrat. Cette spécificité résulte du fait : lorsque

deux molécules se rencontrent, leur association se stabilise grâce à plusieurs liaisons faibles (liaisons hydrogène, liaison ionique, forces de Van Der Waals, et dans une moindre mesure, interaction hydrophobe ; ces liaisons sont environ 100 fois plus faibles qu'une liaison covalente).

Cela ne peut se produire que si les deux surfaces moléculaires sont complémentaires (Figure06-B). Dans le cas contraire, les deux molécules ne restent pas associées et aucune réaction ne peut avoir lieu (Figure06-A).

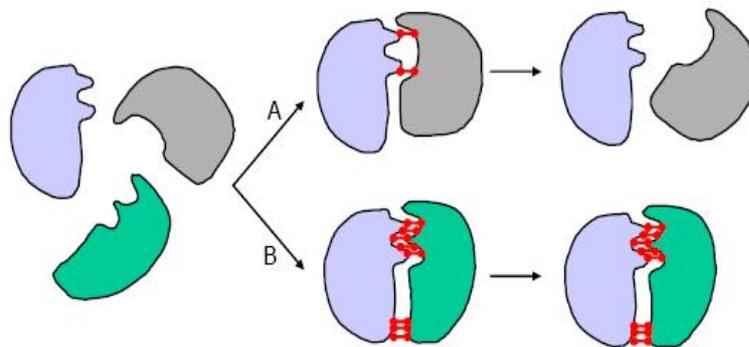


Figure 06 : Importance de la complémentarité des surfaces dans les mécanismes de reconnaissance moléculaire. (A) La complémentarité est faible: le nombre de liaisons non covalentes ne suffit pas pour stabiliser l'association entre les deux molécules. (B) Le grand nombre de liaisons faibles permet de stabiliser l'association entre deux molécules complémentaires

VI- Les enzymes :

VI-1- Définition :

Une enzyme est une protéine de masse moléculaire élevée, thermolabile, biocatalyseur des réactions métaboliques, elle est produite par un organisme vivant et capable d'agir en dehors de cet organisme [8]. Les enzymes sont caractérisés par l'identification des molécules sur lesquelles elles agissent [9].

VI-2- Spécificité de l'association protéine-ligand ; le site actif :

Toutes les protéines se replient dans une conformation dite native où elles acquièrent leur activité biologique et leur pouvoir catalyseur dans le cas des enzymes [10]. C'est dans cette conformation qu'elle adopte une région spécifique dite site actif. Il est constitué d'un petit nombre d'acides aminés qui participent directement à l'activité catalytique. Ces acides aminés sont caractérisés par une chaîne latérale dont à la fois la nature chimique (groupement ionisable ou polarisable) et la structure (encombrement stérique) sont particulières. Il faut noter que la stéréochimie résultant de cet agencement unique des acides aminés du site actif est la cause de la stéréospécificité de la reconnaissance entre les acides aminés et le (ou les) ligand(s) [10].

Les acides aminés rencontrés habituellement au sein des sites actifs sont : Histidine, Sérine, Cystéine, Lysine.

VI-3- Inhibition enzymatique :

Toute molécule qui modifie la vitesse de réaction enzymatique est appelé effecteur. Les effecteurs qui augmentent l'activité enzymatique sont des activateurs, et ceux qui la diminuent sont des inhibiteurs. Certaines molécules peuvent selon des conditions, se comporter comme un activateur ou un inhibiteur [11]. L'inhibition de l'activité enzymatique est un mode de régulation primordial des voies métaboliques dans la cellule, d'autant que les inhibiteurs naturels peuvent prendre de multiples formes : antibiotiques, toxines, drogues, poison...

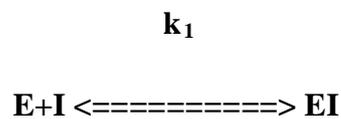
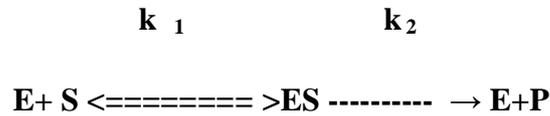
Il existe trois types d'inhibition : inhibition compétitive, non compétitive et inhibition incompétitive.

Celle qui nous intéresse dans notre étude est l'inhibition compétitive.

VI-3-1- Inhibition compétitive (fixation exclusive) : [12]

Dans ce type d'inhibition l'inhibiteur compétitif se lie au même site que le substrat. On pourrait dire que cette inhibition est un mécanisme où la fixation de l'inhibiteur empêche celle du substrat.

Le mécanisme réactionnel est le suivant :



VI-3-2- Intérêt de l'inhibition compétitive :

Cette question est très complexe, car elle touche au problème général de la spécificité des protéines. Mais ces répercussions sont énormes en toxicologie, dans la conception des médicaments, dans la fabrication des pesticides et d'une foule d'ingrédients utiles qu'il serait trop long de citer. Un tel inhibiteur peut agir de plusieurs façons :

- 1- Il présente une analogie avec le substrat par sa forme, la nature de la disposition de ces fonctions polaires dans l'espace [8]
- 2- Il présente fortuitement un certain nombre de critères qui lui permettent de s'encaster dans le site en contractant le même type d'association que le substrat naturel malgré des fonctions chimiques éventuellement différentes.
- 3- L'inhibiteur montre une analogie avec un état de transition [8].

VII- Contributions majeures dans les interactions protéine-ligand :

L'attachement sélectif d'une molécule (ligand) de poids moléculaire bas à une protéine spécifiée (cible) est effectué par la reconnaissance structurale et énergétique des deux entités (protéine et ligand).

L'affinité peut être mesurée expérimentalement par la constante K_i :

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

Les constantes expérimentales déterminées sont de 10^2 à 10^{-12} M de grandeur, correspondantes à l'énergie libre de Gibbs d'attachement. Actuellement, il y a plusieurs bases de données expérimentales 3D de complexes protéine-ligand et leurs affinités correspondantes. Ces bases indiquent clairement qu'il y a plusieurs caractères basiquement trouvés dans ces complexes :

- 1- Il y a un grand niveau de complémentarité stérique entre la protéine et le ligand, qui peut être traduit comme le paradigme clé-serrure.
- 2- Il y a usuellement une grande complémentarité de propriétés de surface entre la protéine et le ligand. La partie ou la contribution lipophile des ligands est trop fréquemment trouvée en contact avec celle de la protéine. Les groupes polaires sont usuellement appariés avec des groupes polaires de la protéine afin de former des ponts hydrogène ou des interactions ioniques.
- 3- Les ligands s'attachent usuellement dans une conformation énergétiquement favorable.

D'une manière générale les interactions protéine-ligand sont très importantes pour l'attachement du ligand au sein de la protéine. Les interactions les plus importantes sont figurées dans la figure 07.

Les bases de données existantes indiquent qu'il y a toujours une compensation substantielle entre les contributions de l'enthalpie et de l'entropie [11-13]. Elles montrent aussi que l'attachement peut être « enthalpy-driven » (ex, Streptavidine-biotine, $\Delta G = -76.5 \text{ KJ/mol}$, $\Delta H = -134 \text{ KJ/mol}$) ou bien « entropy-driven » (ex, Streptavidine-HABA, $\Delta G = -22.0 \text{ KJ/mol}$, $\Delta S = 7.1 \text{ KJ/mol}$) [14].

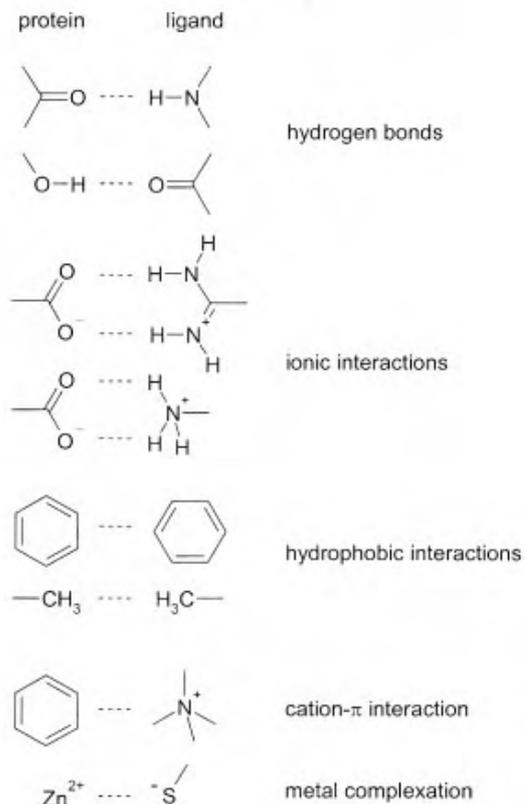


Figure : 07

Les interactions non-covalentes typiques, trouvées dans les complexes protéine-ligand.

Il a été montré par comparaison des affinités de paires de ligands, qui diffèrent d'un seul pont hydrogène, que la contribution d'un seul pont à l'affinité peut quelque fois être très petite ou bien adverse à l'interaction [15]. Les ponts hydrogène chargés sont plus forts que les ponts neutres et ceci est trouvé dans les grandes pénalités de solvation.

Les interactions lipophile sont essentiellement les contacts des parties apolaires de la protéine et du ligand. Le point de vu le plus acceptable généralement est que ces interactions sont principalement dues aux déplacements et libération des molécules d'eaux ordonnées, et pour cela le mécanisme est dirigé par la contribution d'entropie « entropy-driven » [16-17]. Le gain d'entropie résulte quand les molécules d'eaux ne sont pas éloignées.

Il a été montré dans plusieurs cas que l'affinité d'interaction (d'attachement) est proportionnelle à la surface lipophile plongé dans le solvant avec un rang de 80-200 J/(mol A^{o2}) [18-19].

Plusieurs complexe protéine-ligand sont caractérisés par la présence d'interactions lipophiles et polaires. La conformation du ligand est déterminée par l'importance relative de ces contributions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Biochimie structurale 1, Chapitre 4 : Biochimie des protéines 50-63.
- [2] R. Srinivasan and G. Rose. A physical basis for protein secondary structure. PNAS, 1999 1999, 96, 14258-14263.
- [3] P.C. Turner, A.G. McLennan, A.D. Bates & M.R.H. White, biologie Moléculaire.
Chapitre B, 22-23.
- [4] Cours d'enzymologie de Jaques Bratti.
- [5] Richards, F.M. (1991) The protein folding problem. Sci. Amer. 264(1), 34-41.
- [6] Voet, D. And Voet, J.G.(1995) Biochemistry, 2nd Edn.
- [7] P. Andrey. niveaux d'organisation du vivant quelques notions de base en biologie. UPMC & AMIB, INRA, Jouy en Josas.
- [8] J. Pelmont, Enzymes. Catalyseurs du monde vivant, chapitre 14, 387.
- [9] m/s HISTOIRE DE LA MEDECINE ET DES SCIENCES, Eduard Buchner, ou un siècle d'enzymologie.
- [10] <http://ead.univangers.fr/@jaspard/Page2/COURS/4EnzymologieLicence/1COURS/111Cours.htm>
- [11] <http://ead.univangers.fr/@jaspard/Page2/COURS/4EnzymologieLicence/3CoursINHIBITEURS/1CoursInhibition.htm>
- [12] Jeffery W. Keilor. Inhibition des reactions enzymatiques enzymologie BMC 2004.
- [13] D.H. Williams, D.P. O'Brien and B. Bardsley, J. Am. Chem.Soc., 2001, 123,737.
- [14] P.C. Weber, J.J. Wendoloski, M.W. Pantoliano and F.R. Salemme, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 3197.
- [15] A.R.Fersht,J.-P.Shi,J. Knill-Jones, D.M. Lowe, A.J. Wilkinson,D.M. Blow,P. Brick,P. Carter, M.M.Y. Waye and G. Winter, Nature, 1985, 314, 235.
- [16] Y.W. Chen and A.R. Fersht, J. Mol. Biol., 1993, 234, 1158.
- [17] P.R. Connelly, R.A. Aldape, F.J. Bruzzese, S.P. Chambers, M.J. Fitzgibbon, M.A. Fleming, S. Itoh, D.J. Livingston, M.A. Navia, J.A. Thomson and K.P. Wilson, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 1994, 91, 1964.

- [18] B.P. Morgan, J.M. Scholtz, M.D. Ballinger, I.D. Zipkin and P.A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 297.
- [19] B.A. Shirley, P. Stanssens, U. Hahn and C.N. Pace, *Biochemistry*, 1992, 31,725.

Chapitre III

Structure de l'acétylcholinestérase et ces inhibiteurs

I- Structure de l'acétylcholinestérase :

I-1- Présentation :

Le principal rôle biologique de l'acétylcholinestérase (AChE EC 3.1.1.7) est la régulation de la transmission de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques [1]

Le monomère de cette enzyme possède une forme ellipsoïdale, avec une dimension de $45 \times 60 \times 65 \text{ \AA}$. Les sous unités contiennent 11 feuillets β standards entourés de 15 α -hélices, de même il est remarqué la présence de 3 courts standard feuillets β qui ne sont pas reliés par des ponts hydrogène au niveau du cœur de l'enzyme [2] comme il est représenté dans la figure 01.

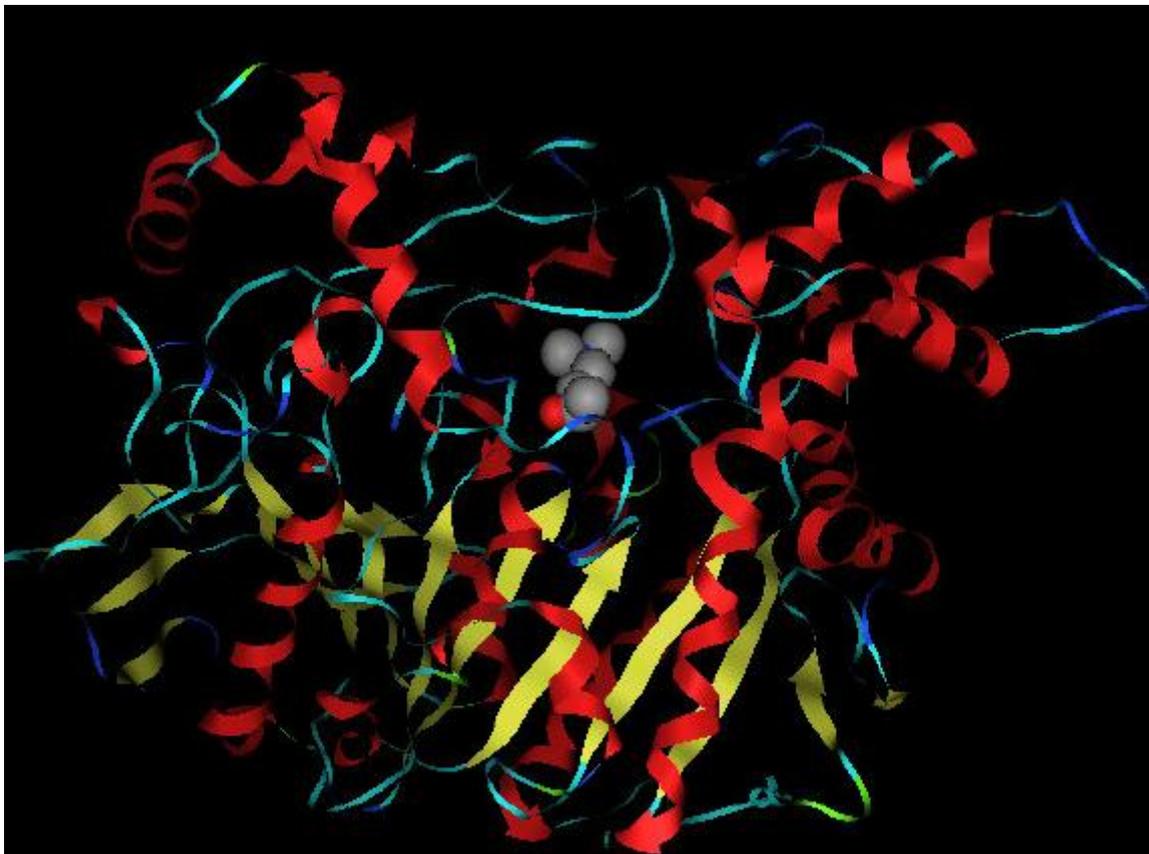


Figure 01 : Représentation schématique en ribbon de la structure 3-D du monomère de T. Californica AChE

I-2- Le site actif et la triade catalytique :

Les acides aminés Glu 327, His440 et la Ser200 sont les composants principaux de la triade catalytique de cette enzyme. Cette triade est localisée à la base d'une gorge étroite de 20 Å de profondeur [3]. Cette gorge est alignée de 14 résidus aromatiques.

Deux acides aminés de nature anionique sont d'une très grande importance, Asp72 et Glu199. Asp72 est localisé en bas et au bord de la gorge alors que Glu199 est situé exactement à la base de cette cavité. Ce dernier est un site anionique qui est le plus proche du groupement triméthylamonium du substrat (ACh).

Les résidus aromatiques jouent un rôle très remarquable dans la stabilisation du complexe. La partie choline est stabilisée par les acides Try84 et Phe330 dans le site d'interaction de l'ammonium quaternaire du substrat. Ces deux acides aminés forment les principaux acides du site anionique. (Voir figure 02).

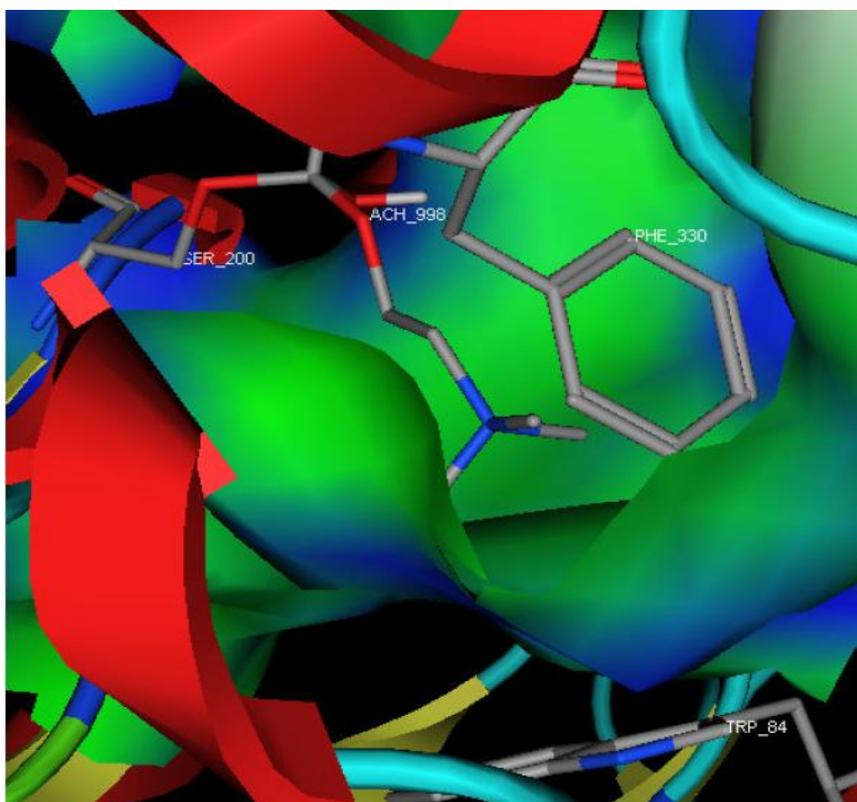


Figure 02 : Try84 et Phe330, résidus d'interaction avec le nitrogène quaternaire du substrat dans son état de liaison.

L'oxygène du groupement carbonyle du substrat est stabilisé via des liaisons hydrogène avec la fonction amide de chacun des résidus Gly118, Gly119 et Ala201.

I-3- Le site anionique périphérique :

Trp279 et Tyr70 sont introduits comme des résidus du site anionique périphérique (PAS : periphéric anionic site). Il est remarqué que deux séries d'acides aminés (270-278 et 251-266 dans TCACHÉ) contribuent eux aussi au site anionique périphérique, ces résidus se localisent au bord de la cavité (gorge).

De ce fait les ligands associés au site périphérique, permettent d'empêcher l'accès du substrat dans la gorge (via un empêchement physique). Ceci dit, la fonction catalytique de l'enzyme peut être régulée de façon allostérique par la liaison d'un ligand au niveau de ce site (PAS) [4].

II - L'acylation du substrat :

Comme il est mentionné avant, la tâche de cette enzyme est l'hydrolyse du substrat l'acétylcholine. Cette hydrolyse s'effectue selon deux processus, l'acylation d'une part (voir figure 03) et la dé-acylation d'autre part.

Comme il est montré dans la figure 04 la Ser200 et la His440 sont impliqués directement dans la réaction avec le substrat.

L'acyle-enzyme formé est produit par la transformation (transfère) du proton de la Ser200 vers la partie imidazole de la His440. Ainsi la Ser200 dé-protoné attaque le substrat ; c'est la phase ou processus d'acylation.

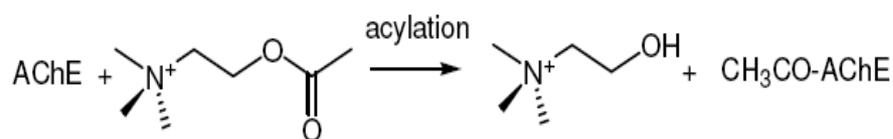


Figure 03 : phase d'acylation de l'enzyme

Ensuite l'acyle-enzyme formé est hydrolysé par les molécules d'eaux qui se trouvent au niveau de la cavité et ce processus de dé-acylation remet l'enzyme à son état original.

Au niveau de la première phase, les interactions cation π prennent place entre le nitrogène positivement chargé du substrat et l'acide aminé Try84.

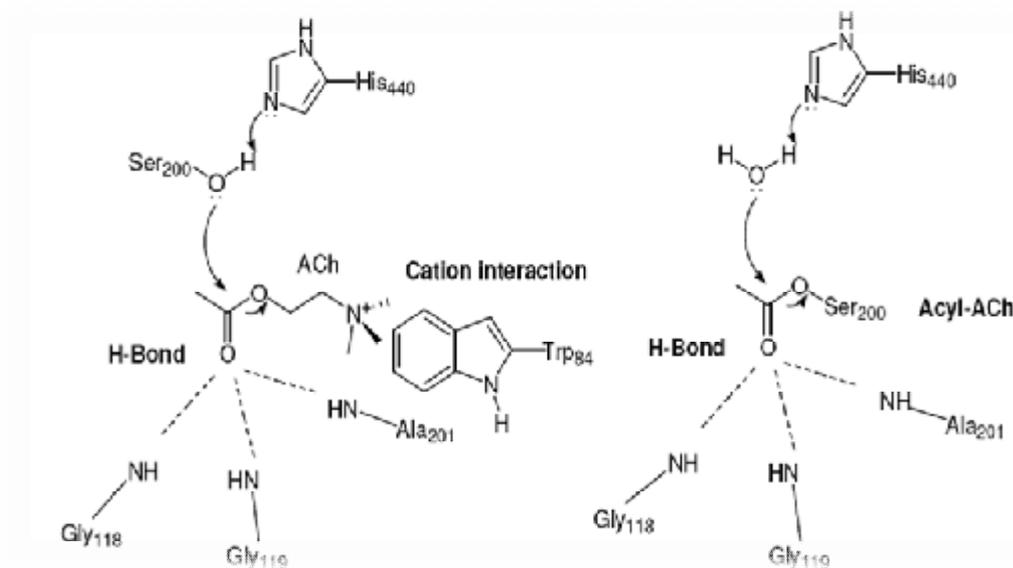


Figure 04 : liaisons hydrogène et interaction cation π entre le substrat et les différents acides aminés.

III- Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChEIs) :

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase peuvent être classés selon leur mode d'action, on site les inhibiteurs pseudo-irréversibles, irréversibles, analogue d'état de transition et les inhibiteurs réversibles.

III-1- Inhibiteurs pseudo-irréversibles :

Cette classe d'inhibiteurs incluse les composés ayant un groupement fonctionnel carbamate. Ils sont carbamylatés par la triade catalytique de l'AChE. La vitesse d'hydrolyse de ces complexes avec la Ser200 est plus lente que celle du complexe ACh-AChE. Le premier inhibiteur de cette classe qui a été étudié pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (AD) été la physostigmine, mais du faite que cet inhibiteur possède une courte duré de demi vie, il a été rejeté. Afin de prouver son potentiel plusieurs analogues ont été étudiés. La Rivastigmine qui est un dérivé de la Miotine est un autre inhibiteur pseudo-irréversible possédant le groupement carbamate (figure05) est moins potentiel que la physostigmine mais inhibe aussi la BChE. Ce dernier se caractérise par une longue durée de demi-vie in vivo et par sa bonne protection neurale, ce qui lui a permis d'être accepté dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [5]

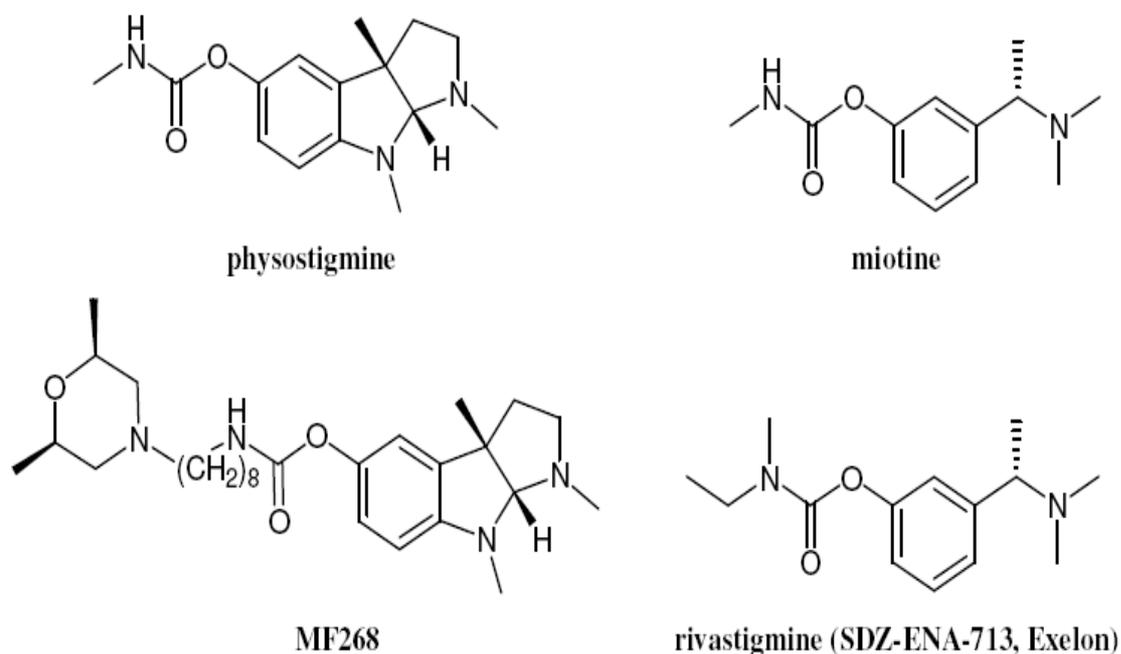


Figure 05 : structures chimiques des inhibiteurs pseudo-irréversibles de l'AChE.

III-2- Inhibiteurs irréversibles :

Les organophosphates sont inclus dans ce groupe. Un des représentatifs de ce groupe est le metrifonate (figure06). Quoique son efficacité soit acceptable, son application comme médicament a été retirée due aux problèmes causés tels que affaiblissement musculaire et problème de respiration chez une restreinte proportion de patients.

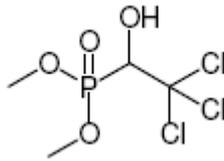


Figure 06 : structure chimique de la metrifonate

III-3- Inhibiteurs analogues à l'état de transition :

Les Trifluorométhylcétones sont des inhibiteurs effectifs de ce groupe, possédant des interactions réversibles avec la Ser200 du site actif de l'enzyme, formant un hémicétal tétraédrique comme état de transition [6]. En effet, parmi ces inhibiteurs, le m-(N, N, N-triméthylamino) trifluoroacétophenone est un inhibiteur potentiel (Figure07), mais sa nature ionique empêche sa capacité d'affranchir la barrière de sang au niveau du cerveau [blood brain barrier (BBB)], cependant des dérivés plus lipophiliques et non-ioniques de ce ligand peuvent mieux fonctionner. L'un de ces inhibiteurs est le zifrosilone (MDL-73745) (figure 07) qui réagit comme inhibiteur de cette famille.



Figure07 : Structure chimique de m-(N,N,N- triméthylamino)trifluoroacétophenone (à gauche) et zifrosilone (MDL-73745) (à droite)

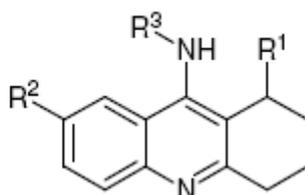
III-4- Les inhibiteurs réversibles :

Au contraire des trois classes d'inhibiteurs décrites avant, les inhibiteurs réversibles interagissent avec le site actif de l'enzyme et inhibent l'activité du substrat l'ACh.

Dans ce groupe on distingue les aminoacridines, N-benzylpipéridines et les alcaloïdes.

III-4-1- Les aminoacridines :

Le plus potentiel de ce groupe est la Tacrine (Cognex), qui a été le premier inhibiteur approuvé par la FDA en 1993. Il a été le composé lead pour la synthèse d'autres dérivés, comme le Valnacrine et le Suronacrine (figure08) qui ont montré une toxicité réduite [7].



$R^1=R^2=R^3=H$, tacrine

$R^1=OH$, $R^2=R^3=H$, valnacrine (HP-029)

$R^1=OH$, $R^2=H$, $R^3=benzyl$, suronacrine (HP-128)

Figure 08 : Structures chimiques de la Tacrine, Valnacrine et Suronacrine

III-4-2- Les N-Benzylpiperidines :

Donepezil (E2020) est le prototype de cette classe structurale qui a été le second médicament approuvé par la FDA dans le but de traiter la maladie d'Alzheimer dans un stade avancé. Il est potentiel, une demis vie assez longue et il est sélectif pour l'AChE que la BChE.

TAK-147 (Figure09) est un autre dérivé de cette famille, qui possède un potentiel inférieur à celui du Donepezil et il est toujours sous testes cliniques. D'autres dérives ont été introduites, où la partie indanone du Donepezil a été remplacée par des systèmes hétérocycliques [8], tels que les N-benzylpiperidine benzisoxazoles. L'un de ces derniers est le Morpholino substitué.

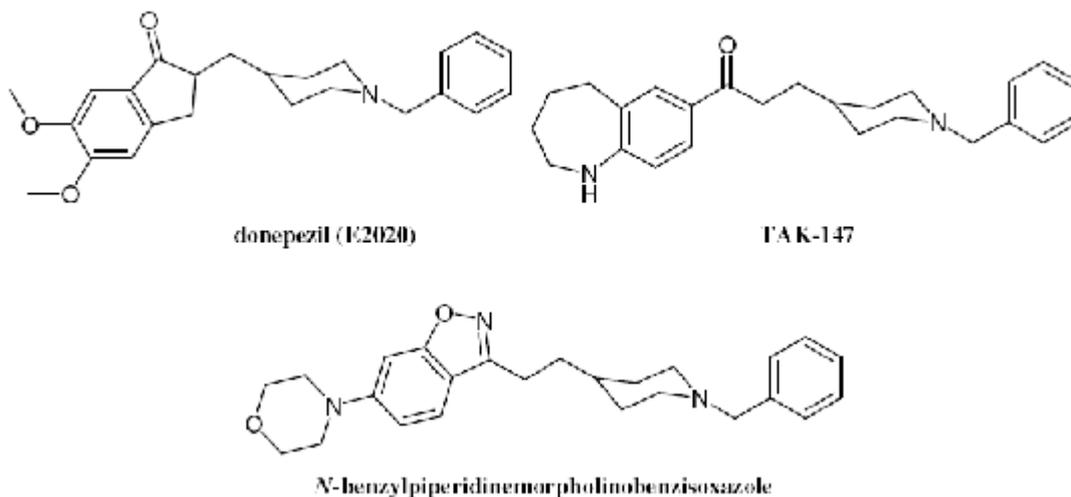
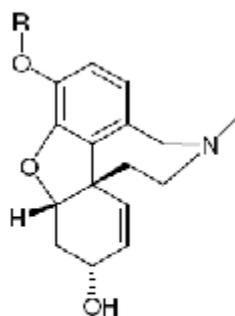


Figure 09 : Structures chimiques du donepezil, TAK-147 et N-benzylpiperidinemorpholinobenzisoxazole.

III-4-3- Les alcaloïdes :

Galanthamine (Reminyl) est un alcaloïde avec amine tertiaire, a été approuvé dans plusieurs pays pour le traitement de la maladie d'Alzheimer [9]. Plusieurs dérivés ont été synthétisés et étudiés et ont montré un potentiel plus fort que celui de la galanthamine, comme P11012 et P11149 (Figure 10) [10]



R= CH₃, galanthamine
 R= COCH₃, P11012
 R= CO (1-adamantly), P11149

Figure 10 : Structure chimiques de la galanthamine, P11012 et P11149.

(-)-Huperzine A (Figure 11) est un autre alcaloïde, isolé à partir d'une herbe médicinale chinoise *Huperzia serrata*, et qui est un très bon inhibiteur potentiel avec un degré de toxicité très bas. Il a été pris comme composé lead dans le design de plusieurs dérivés.

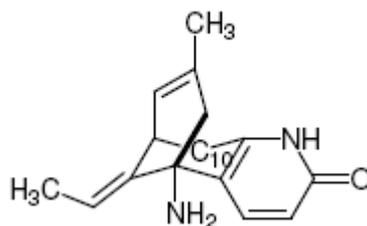


Figure 11 : structure chimique du (-)-huperzine A

Bibliographie

- [1] E. A. Barnard, *The Peripheral Nervous System*, Plenum Press, New York., **1974**, pp, 201-224.
- [2] J. L. Sussman, M. Harel, I. Silman. *Chem. Biol. Interactions.*, **1993**, 87, 187-197
- [3] J. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, *Science*, **1991**, 253, 872-879
- [4] P. Taylor, Z. Radic, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1994**, 34,281-320
- [5] L. S. Schneider, *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **2000**, 2, 427-437
- [6] P. Camps, D. Munoz-Torro, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2002**, 2, 11-25
- [7] E. Rose, J. Aleu, J. Marsal, C. Solsona, *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, 390, 7-13
- [8] A. Martinez, E. Fernandez, A. Castro, S. Conde, I. Rodriguez-Franco, J. E. Banos, A. Badia, *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, 35, 913-922
- [9] J. J. Sramek, E. J. Frackiewicz. N. R. Cutler, *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **2000**, 9, 2393-2402
- [10] P. Camps, D. Munoz-Torro, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2002**, 2, 11-25

Chapitre IV

Le docking moléculaire

I- Définition:

Les interactions entre molécules sont à la base des mécanismes biologiques. Les détails de ces interactions, au niveau moléculaire sont donc d'un très grand intérêt et peuvent être étudiés par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN).

Le docking moléculaire in silico a pour but de prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées[1], ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales mentionnées ci-dessus. Les logiciels de docking sont donc des outils très utilisés en chimie, biologie, pharmacie et en médecine car la plus part des principes actifs sont des petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur).

Comprendre comment un ligand s'attache ou interagit avec une cible protéique afin de l'inhiber ou l'activer est d'une importance capitale dans la recherche et l'industrie pharmaceutique. C'est dans ce chapitre que nous allons présenter et illustrer l'état de l'art du Docking moléculaire.

II- Etat de l'art du Docking Moléculaire :

II-1- Quel matériel faut-il pour le docking moléculaire ?

La première question est de savoir où se trouvent les structures chimiques des cibles visées à traiter ? Afin de répondre à cette question, il est nécessaire d'aller directement à la Bank PDB [2] (<http://www.pdb.org>) et déterminer où sont déposées les structures de ces cibles. A présent, la PDB contient plusieurs de milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie aux rayons X, soit par RMN. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la Bank, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée.

La deuxième question est de savoir où se trouve la structure du (ou des) ligand(s) utilisé(s) lors du docking moléculaire ?

Il y a deux grandes sources de structures chimiques des ligands. La première représente les programmes informatiques de modélisation moléculaire, où les différentes structures sont générées par optimisation de géométrie. Ces structures sont gouvernées par les lois de la chimie quantique. Ces structures peuvent être aussi obtenues par des langages comme SMILES [3] (Simplified Molecular Input line Entry System). Nous citons comme

exemple les programmes qui génèrent des SMILES : (a) chemDraw Ultra™ (<http://www.cambridgesoft.com/>) (b) KnowITALL chemWindow™ (<http://www.bio-rad.com/>) (c) ISIS/Draw™ (<http://www.mdli.com/>) (d) ACD/ChemSketch™ (<http://www.acdlabs.com/>) etc.

La seconde source de structures de ligands est parfois d'aspect commercial, où on trouve des bases de données de structures chimiques relatives à des critères générés par des programmes informatiques comme l'assignement de l'état correct de protonation, les charges partielles, les formes tautomériquesetc. Nous trouvons des Banks comme :

- The Available Chemical director™ (http://www.mdl.com/product/experiment/available_chem_dir)
- The iResearch™ library (<http://www.chemnavigator.com/one/products/iRL.asp>)
- The national Cancer Institute Database [] (<http://129.43.27.140/ncidb2/download.html>)
- The ligand.Info database [4] (<http://blaster.docking.org/Zinc/>)

Cette dernière base de données a un accès gratuit où on peut télécharger différentes structures de ligands. Elle représente une grande importance aux scientifiques qui s'intéressent au docking et au criblage virtuel du fait que les structures trouvées au sein de cette Bank sont assignées à des propriétés physico-chimiques telles que le poids moléculaire, logP, nombre de liaisons rotatables, nombre d'atome donneurs hydrogène, nombre d'atomes accepteurs d'hydrogène, nombre des centres chiraux, nombre de doubles liaisons chirales (isomérisation Z/E), charges nettes, nombre de fragments rigides,....etc.

II-2- Comment fonctionne un programme de docking moléculaire ?

Un programme de docking moléculaire a pour but de prédire correctement le mode d'interaction entre deux entités chimiques, et de reconnaître parmi ceux –ci lequel est le meilleur. De ce fait, tout programme de docking se repose sur deux composantes principales majeures : d'une part un algorithme de recherche ou encore heuristique d'échantillonnage qui soit capable de rechercher et générer toutes les conformations possibles et donc générant les modes d'interaction possibles.

Et d'autre part une fonction objective dite fonction de score capable d'identifier parmi tous les modes générés, le mode correspondant à la vraie interaction.

Cependant, chaque programme de docking diffère par rapport aux autres par la manière de recherche de l'espace conformationnel et la fonction de score qui le guide.

En analysant la structure 3D des complexes protéine-ligand plusieurs degrés de flexibilité peuvent être considérés. La première approche indique que les deux entités sont des corps rigides, et donc il n'y a aucun degré de liberté sur les liaisons. Ceci est la base de l'algorithme le plus simple de recherche conformationnelle, et de ce fait il est la base des premiers programmes de docking moléculaire [5]

Actuellement cette approche est utilisée dans le docking protéine-protéine. L'approche la plus récente dans le traitement de la flexibilité, considère la cible protéique comme corps rigide tandis que le ligand est flexible. En effet elle représente l'approche la plus utilisée dans la plupart des logiciels ou programmes de docking. Néanmoins, celle-ci reste approximative, du fait que le récepteur ne doit pas être considéré comme corps rigide (au moins la flexibilité du site d'interaction doit être prise en compte).

III- Algorithmes de recherche conformationnelle ou heuristique d'échantillonnage :

L'habilité de prédire une large et diverse base de conformations ou « poses » est un pré-requis pour que le docking soit utile [6]. Les algorithmes de recherche ou les heuristiques sont d'une grande nécessité au regard de la taille de l'espace de recherche [7]. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories distinctes : celles des approches dérivées d'échantillonnage systématiques ou directes, celles des techniques de dynamiques moléculaire et celles des méthodes stochastiques ou hasardeuses.

Dans la recherche systématique, le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles. Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs ancrés sont définies. Dans un premier lieu, un [8] [9] [10] ou plusieurs [11] [12] fragments qui doivent être rigides sont placés au sein du site et donc mis en interaction avec la cible, puis le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de torsion.

Les méthodes basées sur les techniques de simulations par mécanique moléculaire ou dynamique moléculaire sont séduisantes, mais elles sont coûteuses du point de vue computationnel et leur capacité à franchir des barrières d'énergie libre élevées est très limitée [13]. Néanmoins, la recherche peut être améliorée en abaissant ces barrières, via une

réduction des composantes répulsives des interactions électrostatique et de van der Waals [14] [15].

Les méthodes stochastique ou hasardeuses sont des méthodes d'optimisation très générales et sans fondement physique mais ont l'avantage de pouvoir explorer l'espace de recherche en ignorant les barrières d'énergie.

Concernant la recherche stochastique, nous pouvons citer : La méthode Monté Carlo (MC), algorithme génétique (AG).

Ces méthodes essaient d'échantillonner l'espace conformationnel en performant un changement hasardeux au niveau du ligand, suivi d'une acceptation ou annulation (rejet) de la conformation qui en résulte en utilisant une fonction de probabilité prédéfinie.

Si le ligand (c'est-à-dire la conformation obtenue) est accepté, il sera utilisé comme point de départ pour un nouveau changement hasardeux.

1)- La méthode de Monté Carlo :

Dans la méthode Monté Carlo, le ligand est placé au sein du site d'interaction d'une manière aléatoire, où l'interaction sera évaluée par une fonction objective (fonction de score), on pourrait dire que cette conformation est scorée. Une nouvelle conformation est générée selon des changements aléatoires au niveau des liaisons rotatables du ligand et sa position spatiale (translation et rotation). Après chaque changement, le ligand est minimisé et son énergie est calculée (scoré) [16]. Alors, si la nouvelle configuration (nouvelle solution) est meilleurs que la précédente, elle sera immédiatement acceptée. En d'autres termes, si cette dernière solution n'est pas un nouveau minimum, une fonction dite fonction ou distribution de Boltzmann de type $\exp(-\Delta E_i/kT)$ qui est une fonction probabilistique, est appliquée.

Donc si cette conformation succède au test de probabilité par la fonction de Boltzmann, elle sera acceptée (conservée par le programme), sinon rejetée ; c'est ce qu'on appelle le critère de Métropolis [17].

Le critère ou algorithme de Métropolis sert à déterminer si la nouvelle configuration est acceptée ou non. Celui-ci peut être exprimé ainsi : à partir d'une configuration i , on tire au hasard une autre configuration j . Cette dernière configuration est acceptée avec une probabilité $B = \exp(-\Delta E_i/kT)$, qui est la probabilité que le système puisse aller d'un état d'équilibre i vers un autre j . La différence d'énergie entre les deux configurations (écart énergétique) est calculée. Alors si cette dernière configuration j possède une énergie inférieure

à celle de la configuration i de départ, elle sera acceptée. Dans le cas contraire, un nombre entre 0 et 1 est tiré, si ce nombre est inférieur à B , la nouvelle configuration est directement acceptée, sinon la configuration de départ est gardée.

La méthode de Monté Carlo ne trouve pas un minimum d'énergie mais échantillonne un ensemble d'états moléculaires avec des états énergétiques croissant avec la température.

2)- Algorithmes évolutionnaires :

Les algorithmes évolutionnaires sont des méthodes d'optimisation génériques et itératives. Elles se reposent sur un processus adaptatif similaire à celui de l'évolution naturelle. Ces méthodes sont capables de gérer plusieurs solutions simultanément, regroupées dans une population. Voir Figure ci dessus

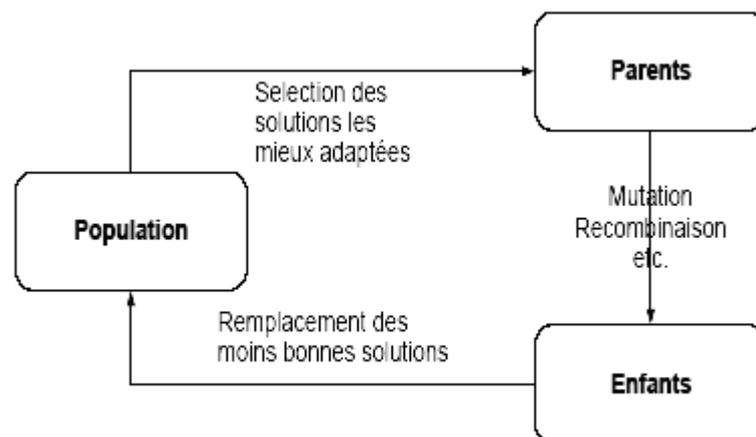


Figure : représentation schématique du cycle évolutionnaire d'un algorithme évolutionnaire

Alors, cette population est exposée à une pression de sélection, implémentée dans une fonction objective (fonction de score) qui elle-même décrit le problème à optimiser, où plusieurs degrés de liberté interviennent, qui leurs tour permettent de définir une solution appelé « génome ».

La sélection des solutions les plus performantes d'après la fonction de score est appelée « parents » est contrebalancée par la génération de nouvelles solutions « enfants », ceci est pour maintenir une diversité de population. Les enfants, donc sont générés par modification du génome parental par des opérateurs classés, classés suivant le nombre de parents sur lesquels ils s'appliquent. Une fois les enfants créés, ils prennent la place des plus mauvaises

solutions de la population. Et donc le processus itératif commence, cette dernière population (nouvelle population) est de nouveau exposée à la pression de sélection implémentée par la fonction de score. L'évolution continue par une nouvelle itération ou bien génération. Au cours du processus itératif les solutions les mieux adaptées s'émergent, jusqu'à convergence de la population ou après un nombre déterminé de génération. Dans le docking moléculaire, l'algorithme évolutionnaire cherche à décrire les interactions entre le ligand et la cible protéique où les degrés de liberté (ddl) correspondent aux positions, orientations et conformation du ligand et du récepteur [18] [19].

IV- Fonctions de score ou fonctions objectives :

Une fois les conformations du ligand générées sont acceptées selon les différentes approches, leurs affinités pour le récepteur doivent être évaluées [20] [21]. C'est ce qu'on appelle fonctions de score ou fonctions objectives, car elles évaluent les résultats de la recherche et attribuent la meilleure énergie (meilleur score) à la conformation du ligand la plus correcte (d'après la recherche). Pour cela, le rôle de la fonction de score est critique dans tout protocole de docking. Néanmoins, l'utilisation d'une fonction de score très précise n'est pas possible cause du coût computationnel. En conséquence, quelques simplifications et approximations sont posées afin de réduire la complexité du problème et atteindre au moins une balance entre vitesse de calcul et exactitude du résultat. Une fonction de score doit être efficace et sélective, elle doit diriger la recherche en fournissant un gradient d'énergie, et identifier le mode d'interaction correcte parmi un ensemble de leurs.

Les fonctions de score utilisées peuvent être classées en quatre catégories :

- A- Celles qui sont basées sur les champs de forces.
- B- Fonctions de score empiriques.
- C- Celles qui sont basées sur les données (knowledge-based).
- D-Celles qui sont basées sur des consensus.

Les fonctions de score qui peuvent être rapidement évaluées à être appliquées dans le docking moléculaire ou bien dans le criblage virtuel (Virtual screening), peuvent être

uniquement des mesures très grossières de l'énergie libre des complexes formés. Toutes les méthodes ont un critère commun, le fait que l'énergie est décomposée en une somme de termes décrivant les différentes contributions d'énergies. Dans un sens physique, ce n'est pas permis, puisque l'énergie libre est une fonction d'état tandis que les termes énergétiques formant la sommation ne le sont pas [22]. De plus, les modes additifs simples, ne peuvent pas décrire des effets de coopérations subtiles [23].

Néanmoins il est utile d'interpréter les interactions protéine-ligand en une manière additive [24] [25], et estimer que l'énergie libre est valable avec un cout computationnel léger.

A- Fonction de score se basant sur les champs de force :

Le champ de force est une fonction mathématique qui exprime l'énergie d'un système par la somme de divers termes issus de la mécanique moléculaire. L'utilisation de champ de force dans le calcul de l'énergie libre d'un système comme fonction de score est le résultat des travaux du Prof. Irwin Kuntz à l'université de Californie à San Francisco aux USA[26], qui a été suivi par d'autres comme le groupe de recherche de Shoichet [28] et celui de Abagyn [28].

Ce type de fonction de score est similaire aux fonctions de score empiriques du fait qu'elles estiment l'énergie libre d'interaction d'un complexe récepteur-ligand par addition de plusieurs contributions individuelles des différents types d'interactions. La fonction de score « champ de force » utilise des fonctions d'énergie dérivées de la mécanique moléculaire [30], et en général, quantifie cette somme en deux termes, l'énergie d'interactions entre le récepteur et le ligand (interactions intermoléculaires) et l'énergie interne du ligand.

La première composante qui représente l'énergie intermoléculaire, est elle-même le résultat d'une sommation de plusieurs termes énergétiques : terme de van der Waals (décrit par un potentiel de Lennard-Jones), un terme électrostatique (décrit par une formulation coulombienne avec une fonction diélectrique dépendante de la distance qui réduit les contributions des interactions charge - charge) [31] [32]. D'un autre coté, les fonctions qui décrivent l'énergie interne du ligand sont usuellement similaires aux termes décrivant les interactions intermoléculaires [elles contiennent des termes de VDW et électrostatique].

Ces fonctions de score sont généralement sensibles aux petites variations de coordonnées atomiques, ce qui limite leur champ d'application [33]. Cet inconvénient peut être résolu en adoucissant le potentiel de VDW, où la contribution de la composante répulsive

sera limitée afin d'autoriser quelques clashes stériques sans trop pénaliser le mode d'interaction correspondant.

Les fonctions de score qui se basent sur les champs de force sont par exemple : D-score [34] (basée sur le champ de force Tripos), Goldscore [35] [36]. De même les plus rigoureux comme AMBER [37] [38], CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) [39] [40], GROMOS (GRoningen MOlecular Simulation System) [41] et OPLS (Optimized Potentials for Liquids simulation) [42] peuvent eux aussi être utilisés quoiqu'ils représentent un cout computationnel énorme.

B- Fonctions de score empiriques :

L'idée fondamentale des fonctions de score empiriques est que l'énergie d'interaction d'un complexe récepteur ligand peut être interprétée comme une sommation d'interactions chimiques localisées [43]. En d'autres termes, l'énergie d'interaction est partitionnée en plusieurs composantes de reconnaissance. Ces méthodes essaient d'estimer l'énergie d'interaction en réunissant d'une manière intuitive les termes que l'expérience a définie comme fondamentaux. Les fonctions de score empiriques contiennent usuellement des termes décrivant les interactions ioniques, interactions hydrophobiques, les ponts ou liaisons hydrogène et les interactions engendrées par le changement d'entropie (pénalité d'entropie).

Ceci dit, ces fonctions de score somment ces différents termes en les pondérant à des termes décrivant les différents types d'interactions moléculaires [44] [45].

C- Fonctions de score basées sur des données ou fonctions statistiques :

Ces fonctions de score qui représentent des potentiels d'interaction, dérivent des données statistiques qui ont été obtenues par analyse expérimentale des fréquences d'interactions entre atomes au sein d'un complexe protéine - ligand.

Ces fonctions statistiques sont dérivées selon deux principes fondamentaux. Dans un premier lieu, un complexe protéine - ligand est supposé être dans son état d'équilibre, donc stable thermodynamiquement ce qui lui confère un minimum global d'énergie (Enthalpie libre du complexe). Deuxièmement, la distribution des molécules à l'état microscopique suit et obéit la distribution de Boltzmann. Donc ça nous mène à dire qu'il y a une corrélation entre

l'état thermodynamique du complexe qui forme un système et la probabilité de trouver ce complexe dans un état microscopique donné. Alors, si ces fréquences sont converties en enthalpie libre (énergie) grâce à une distribution de Boltzmann, les potentiels sont donc nommés potentiels de force moyenne (Potential of Mean Force : PMF).

Ce dernier a été utilisé dans l'étude par simulation, des repliements des protéines ; et par la suite dans l'étude des interactions protéine - ligand [46] [47].

Il y a deux aspects importants pour la construction du PMF, d'abord, il faut définir l'état de référence. Celui-ci correspond à l'état où il n'y a pas d'interactions entre les deux entités chimiques (protéine et ligand). Il n'est pas toujours facile de définir cet état de référence, car la plus part des complexes protéine - ligands ne se trouvent pas dans des états non liés, ce qui impose des approximations à ce niveau. Dans ce cas cet état, est donné à partir d'une valeur spécifique empirique ou d'un potentiel calculé à partir de toutes les données disponibles et avec une correction appropriée. Enfin, le deuxième point important est la façon dont sont collectées les statistiques d'interactions. Elles sont dépendantes des distances et donc doivent permettre de bien dissocier l'état entre deux atomes où l'interaction existe et où elle n'existe pas.

Afin de prendre en compte les distances d'interaction entre deux atomes, deux approches sont mises au point. La première, qui peut être considérée comme grossière, consiste à prendre une distance limite entre deux atomes, et considérer qu'il y a interaction en dessous de cette distance, et non pas au-delà. La deuxième approche consiste à évaluer le potentiel d'interaction de manière continue le long de la distance interatomique, cette approche est plus fine que la précédente.

Ces fonctions statistiques, dépendent de leurs groupes d'apprentissage (expérience), elles ne peuvent pas modéliser que les interactions qui existent dans leurs bases de données expérimentales. Par conséquent, avec ce type de fonctions, modélisent les interactions qui ne dévient pas trop de leur modèle.

L'un des potentiels les plus simples st le PLP (Piecewise Linear Potential) [48]. Il est basé sur quatre types d'atomes et prend en compte les interactions stériques et les ponts hydrogènes.

SMoG96 (Small Molecular Groth) est un potentiel qui est utilisé pour la conception de novo de ligand [69]. Les distances interatomiques sont prises en compte en dessous de 5 Å°.

De même l'état de référence est définie comme étant un complexe entre les deux entités chimiques n'interagissent pas (au hasard où il n'y a pas d'interaction)

D- Fonctions de score consensus :

Les fonctions de score consensus [50] [51], combinent les informations obtenues à partir des différents score, 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 [52] [53] [51]. Un exemple de fonction de score consensus est X-CSCORE [54] qui combine un PMF [55] [56] [57], et ChemScore [58].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] [http://en.wikipedia.org/wiki/Docking_\(molecular\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Docking_(molecular))
- [2] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank., *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 235-242.
- [3] D. Weininger, SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 28 (1988) 31-36.
- [4] M. von Grotthuss, G. Koczyk, J. Pas, L.S. Wyrwicz, L. Rychlewski, Ligand. Info small-molecule Meta-Database., *Comb Chem High Throughput Screen* 7 (2004) 757-761.
- [5] I.D. Kuntz, J.M. Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin, A geometric approach to macromolecule-ligand interactions., *J Mol Biol* 161 (1982) 269-288.
- [6] Z. Zsoldos, D. Reid, A. Simon, B.S. Sadjad, A.P. Johnson, eHiTS: an innovative approach to the docking and scoring function problems., *Curr Protein Pept Sci* 7 (2006) 421-435.
- [7] KITCHEN D. B., DECORNEZ H., FURR J. R., BAJORATH J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications., *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2004, 3 : 935-49.
- [8] EWING T. J., MAKINO S., SKILLMAN A. G., KUNTZ I. D., DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases., *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 2001, 15 : 411-428.
- [9] CLAUSSEN H., BUNING C., RAREY M., LENGAUER T., FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations., *J. Mol. Biol.*, 2001, 308 : 377-95.
- [10] LEWIS R. A., Automated site-directed drug design: a method for the generation of general three-dimensional molecular graphs., *J Mol Graph*, 1992, 10 : 131-143.
- [11] WELCH W., RUPPERT J., JAIN A. N., Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites., *Chem. Biol.*, 1996, 3 : 449-462.
- [12] BUDIN N., MAJEUX N., CAFLISCH A., Fragment-Based flexible ligand docking by evolutionary optimization., *Biol. Chem.*, 2001, 382 : 1365-72.
- [13] CHO A. E., WENDEL J. A., VAIDEHI N. et al, The MPSim-Dock hierarchical docking algorithm: application to the eight trypsin inhibitor cocrystals., *J. Comput. Chem.*, 2005, 26 : 48-71.
- [14] WU G., ROBERTSON D. H., BROOKS C. L., VIETH M., Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER-A CHARMM-based MD docking algorithm., *J. Comput. Chem.*, 2003, 24 : 1549-62.

- [15] VIETH M., HIRST J. D., KOLINSKI A., BROOKS C. L., Assessing energy functions for flexible docking., *J. Comput. Chem.*, 1998, 19 : 1612-1622.
- [16] J.Y. Trosset, H.A. Scheraga, Reaching the global minimum in docking simulations: a Monte Carlo energy minimization approach using Bezier splines., *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 8011-8015.
- [17] Metropolis N., Rosenbluth AW., Rosenbluth MN., Teller AH., Teller E. 1953. Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* 21 : 1087-1092.
- [18] Jones, G., Willett, P. and Glen, R.C., Leach, A. R. and Taylor, R., *ibid*, 1997, 267, 727-748.
- [19] Yang, J. M. and Kao, C. Y., *J. Comput. Chem.*, 2000, 21, 988-998.
- [20] M.A. Ajay, J. Murcko, Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes., *J Med Chem* 38 (1995) 4953-4967.
- [21] H.J. Böhm, M. Stahl, Rapid empirical scoring functions in virtual screening applications., *Med Chem Res* 9 (1999) 445-462.
- [22] A.E. Mark and W.F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.*, 1994, 240, 167.
- [23] D. Williams and B. Bardsley, *Persp. Drug Disc. and Design*, 1999, 17, 43.
- [24] P.R. Andrews, D.J. Craik and J.L. Martin, *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1648.
- [25] T.J. Stout, C.R. Sage and R.M. Stroud, *Structure*, 1998, 6, 839.
- [26] I.D. Kuntz, J.M. Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin, A geometric approach to macromolecule-ligand interactions., *J Mol Biol* 161 (1982) 269-288.
- [27] B.Q. Wei, L.H. Weaver, A.M. Ferrari, B.W. Matthews, B.K. Shoichet, Testing a flexible-receptor docking algorithm in a model binding site., *J Mol Biol* 337 (2004) 1161-1182.
- [28] M. Totrov, R. Abagyan, Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates., *Proteins Suppl* 1 (1997) 215-220.
- [29] U. Rester, Dock around the clock - Current status of small molecule docking and scoring, *Qsar & Combinatorial Science* 25 (2006) 605-615.
- [30] D.B. Kitchen, H. Decornez, J.R. Furr, J. Bajorath, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications, *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 935-949.
- [31] C. Bissantz, G. Folkers, D. Rognan, Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations., *J Med Chem* 43 (2000) 4759-4767.
- [33] FERRARA P., GOHLKE H., PRICE D. J., KLEBE G., BROOKS C. L., Assessing scoring functions for protein-ligand interactions., *J. Med. Chem.*, 2004, 47 : 3032-47.

- [34] B. Kramer, M. Rarey, T. Lengauer, Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking., *Proteins* 37 (1999) 228-241.
- [35] G. Jones, P. Willett, R.C. Glen, A.R. Leach, R. Taylor, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking., *J Mol Biol* 267 (1997) 727-748.
- [36] M.L. Verdonk, J.C. Cole, M.J. Hartshorn, C.W. Murray, R.D. Taylor, Improved protein-ligand docking using GOLD., *Proteins* 52 (2003) 609-623.
- [37] P.K. Weiner, P.A. Kollman, AMBER—assisted model building with energy refinement—a general program for modeling molecules and their interactions., *J Comput Chem* 2 (1981) 287-303.
- [38] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen, D.A. Case, An all-atom force field for simulations of protein and nucleic acids., *J Comput Chem* 7 (1986) 230-252.
- [39] B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, CHARMM—a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations., *J Comput Chem* 4 (1983) 187-217.
- [40] L. Nilsson, M. Karplus, Empirical energy functions for energy minimization and dynamics of nucleic acids., *J Comput Chem* 7 (1986) 591-616.
- [41] W.F. van Gunsteren, H.C. Berendsen, Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry., *Angew Chem Int Ed* 29 (1990) 992-1023.
- [42] W.L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin., *J Am Chem Soc* 110 (1988) 1657-1666.
- [43] Protein-Ligand interactions: from Molecular Recognition to Drug Design.pdf.
- [44] HOLLOWAY M. K., A priori Prediction of Activity for HIV-1 Protease Inhibitors Employing Energy Minimization in the Active Site, *J. Med. Chem.*, 1995, 38 : 305-317.
- [45] PEREZ C., PASTOR M., ORTIZ A. R., GAGO F., Comparative binding energy analysis of HIV-1 Protease inhibitors: incorporation of solvent effects and validation as a powerful tool in receptor-based drug design, *J. Med. Chem.*, 1998, 41: 836-852.
- [46] Jernigan RL., Bahar I. 1996. Structure-Derived Potentials and Protein Simulations *curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 195-209.
- [47] Russ WP., Ranganathan R. 2002. Knowledge-based Potential Functions in protein design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 447-452.
- [48] Verkhivker G., Appelt K., Freer S.T., Villafranca J.E. 1995. Empirical Free Energy Calculations of Protein-ligand Crystallographic Complexes. I. Knowledge-based Ligand-

protein Interaction Potentials applied to the Prediction of Human Immunodeficiency Virus 1 Protease Binding affinity. *Prot. Eng.* 8: 677-691

[49] DeWitte R.S., Shakhnovich E.I. 1996. SmoG de Novo Design Method based on Simple, Fast, and Accurate Free Energy Estimates. 1 Methodology and Supporting Evidence. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 11733-11744

[50] I. Halperin, B. Ma, H. Wolfson, R. Nussinov, Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions., *Proteins* 47 (2002) 409-443.

[51] P.S. Charifson, J.J. Corkery, M.A. Murcko, W.P. Walters, Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins., *J. Med. Chem* 42 (1999) 5100-5109.

[52] C. Bissantz, G. Folkers, D. Rognan, Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations., *J. Med. Chem* 43 (2000) 4759-4767.

[53] G.E. Terp, B.N. Johansen, I.T. Christensen, F.S. Jørgensen, A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities., *J. Med. Chem* 44 (2001) 2333-2343.

[54] R.X. Wang, L.H. Lai, S.M. Wang, Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction, *J. Comput. Aided. Mol. Des* 16 (2002) 11-26.

[55] I. Muegge, PMF scoring revisited., *J. Med. Chem* 49 (2006) 5895-5902.

[56] I. Muegge, Y.C. Martin, A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach., *J. Med. Chem* 42 (1999) 791-804.

[57] I. Muegge, Effect of ligand volume correction on PMF scoring, *J. Comput. Chem.* 22 (2001) 418-425.

[58] M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, R.P. Mee, Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes., *J. Comput. Aided. Mol. Des* 11 (1997) 425-445.

Chapitre VI

Résultats et discussion

Notre démarche consiste d'abord de confirmer les résultats déjà connus dans la littérature par la technique de Docking moléculaire. Nous allons en premier lieu reconstruire deux complexes de l'acétylcholinestérase : le 1EA5 qui est formé entre l'enzyme et le substrat naturel l'acétylcholine (ACh), et le 1ACJ celui qui inclue la TACRINE (symbolisée par THA) comme ligand au sein de la protéine. Ensuite nous allons appliquer cette technique sur des molécules Chalcone.

Comme il est mentionné dans le chapitre III, plusieurs inhibiteurs sont connus dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. La TACRINE est un inhibiteur compétitif de l'acétylcholinestérase vis-à-vis son substrat naturel. Nous avons choisi cet inhibiteur comme référence à cause de sa taille comparable à celle des ligands que nous utiliserons.

Afin de représenter et visualiser les acides aminés les plus importants du site actif, nous avons attribué à chacun d'eux les couleurs suivantes :

Ser200 (rouge), **His440** (bleu), **Glu327** (vert), **Trp84** (jaune), **Phe330** (violet) et le **Trp279** (orange).

NB : nous avons omis quelques résidus dans quelques figures pour la clarté des images.

1- Interaction : Acétylcholine-Acétylcholinestérase :

Le premier ligand étudié est l'Acétylcholine, substrat naturel de la cible (voir figure 01).

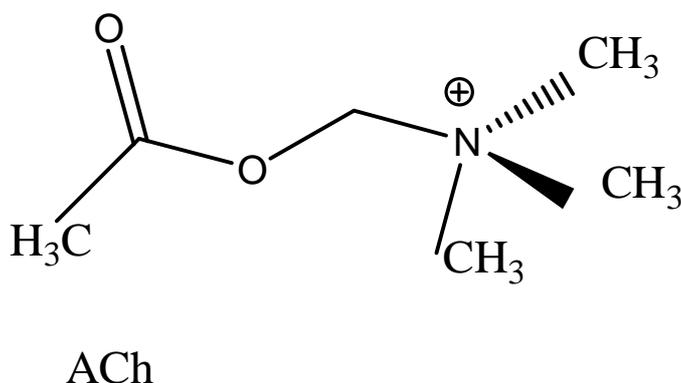


Figure 01

Après simulation et plusieurs itérations de calculs, nous avons obtenu un complexe d'énergie de : -5,76963 Kcal /mol. Cette énergie sera aussi utilisée comme énergie de référence avec les autres ligands.

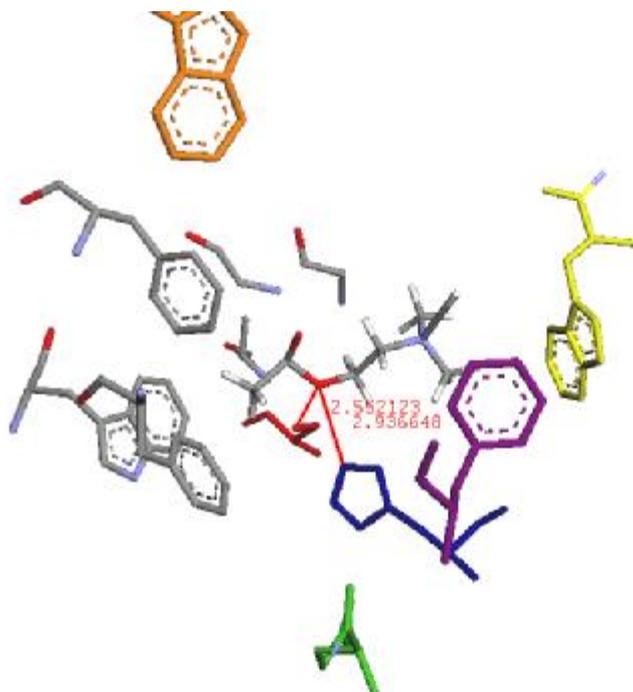


Figure02 : interaction AChE-ACh

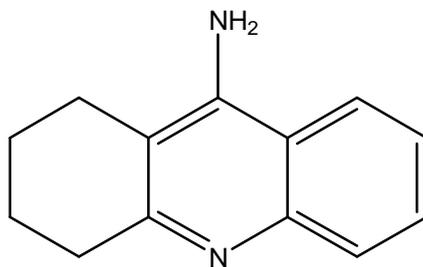
Dans cette figure nous avons montré que le ligand pénètre bien dans le site actif de la protéine en formant deux liaisons hydrogène représentées en rouge. Le tableau suivant résume ces deux liaisons hydrogène :

N° H-Bond	Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance	Group du ligand
2	Ser200	O	2,552123Å°	C-O-CH2
	His440	O	2,936648Å°	C-O-CH2

Aucune interaction hydrophobique n'a été observée lors de la simulation. Il est très remarquable que le nitrogène quaternaire du substrat chargé positivement, est toujours stabilisé via des interactions π – charge avec la Trp84 et Phe330, ceci confirme les interaction AChE- substrat trouvées dans la littérature (voir chapitre III).

2- Interaction TACRINE-Acétylcholinestérase :

Le deuxième ligand étudié est la TACRINE (voir figure a)



TACRINE

Figure a : représentation de la TACRINE, inhibiteur de TcAChE.

En réalisant une simulation de docking avec le code Arguslab, ce dernier nous a permis d'avoir un complexe formé par les deux entités TACRINE et AChE, stable par rapport au complexe obtenu avec le substrat. L'énergie d'interaction est de : -11,50 Kcal /mol avec une déviation de la structure cristalline -mentionnée par le RMSD (Root Mean Squar Deviation)- de : 3,897652A°.

Par la suite nous avons analysé toutes les conformations possibles engendrées par le code Arguslab tout en calculant à chaque fois la déviation. Il est à souligner que la 12^{me} conformation représente la meilleure solution en terme de RMSD (RMSD =0,830488A°) avec une énergie correspondante de -9,09 Kcal/ mol. Ce qui est toujours supérieure à l'énergie trouvée dans le premier complexe.

Pour former le complexe TACRINE- AChE, le ligand a formé une liaison hydrogène et plusieurs interactions hydrophobiques.

La seule liaison hydrogène formée est d'une distance de 2,852453A° entre NH₂ du ligand et O du résidu Tyr334. (Voir figure b)

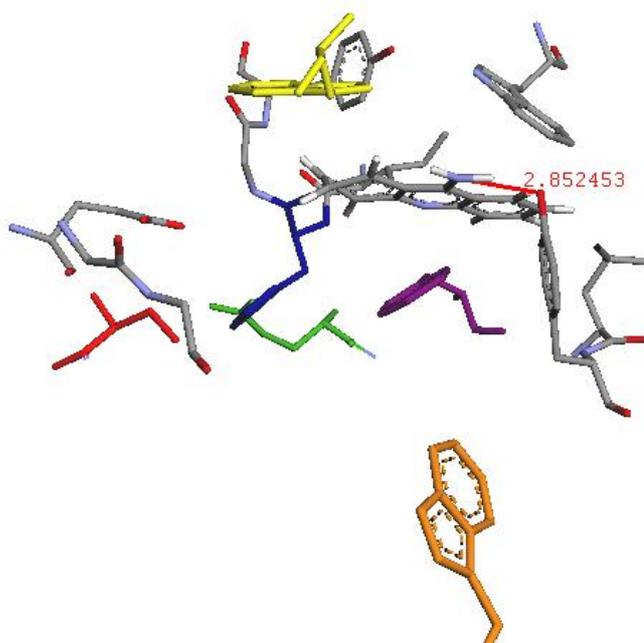


Figure b : représentation de la liaison hydrogène trouvée dans le complexe de la TACRINE.

Dans le tableau suivant nous avons résumé les paires d'atomes interagissant dans les différentes interactions :

Atome du ligand	Atome de la cible	Distance A°	Type d'interaction
C	C Tyr 334	2,135	Hydrophobique
C	C Leu 333	2,486	Hydrophobique
C	C Trp 432	2,494	Hydrophobique
C	O His440	2,336	Hydrophobique
C	C Met 436	2,179	Hydrophobique
C	C Met 436	2,240	Hydrophobique

La figure suivante visualise ces interactions :

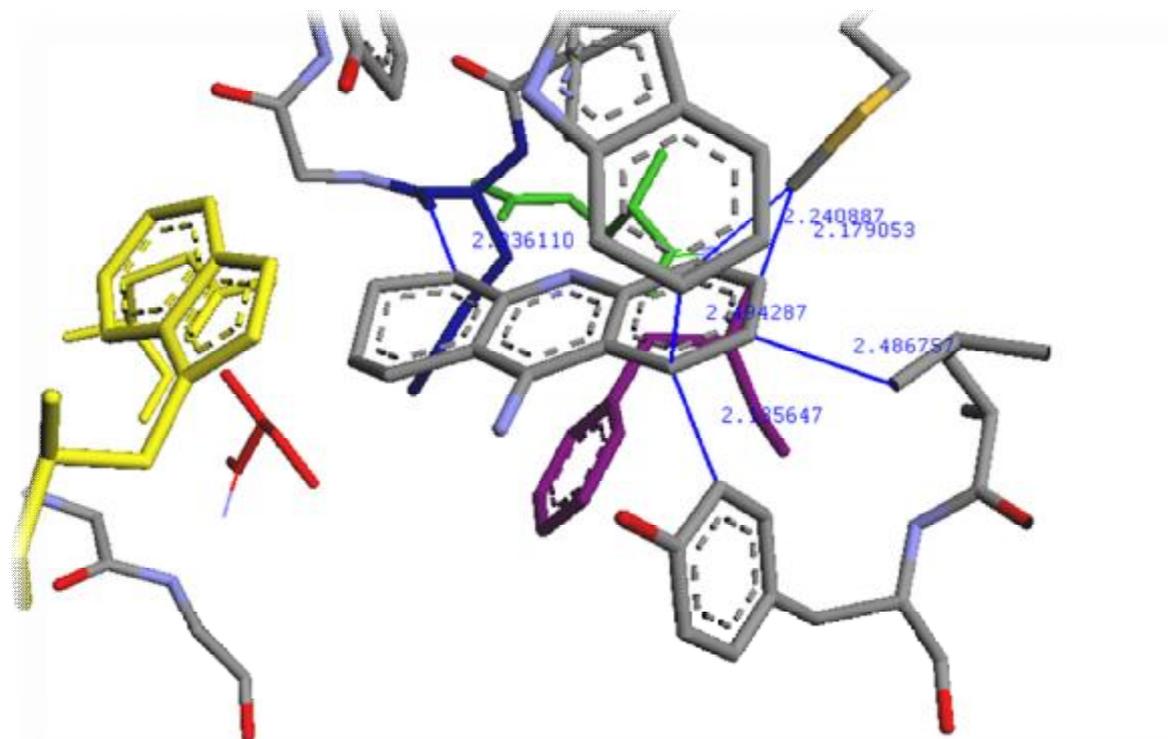


Figure c : représentation des interactions hydrophobiques trouvées dans le complexe de la TACRINE.

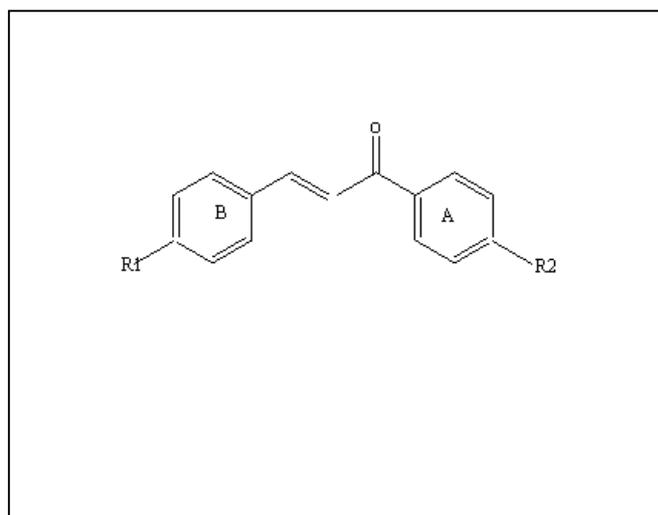
Il est primordial de remarquer et noter que le complexe est stabilisé aussi via des interactions hydrophobiques de type π - π entre le ligand et les cycles benzéniques des acides aminés Trp84, Phe330 et Trp432.

Si nous comparons ces résultats par ceux de l'ACh, nous remarquons très bien qu'il y a une augmentation dans le nombre d'interactions, ce qui confère une stabilité de plus dans le deuxième complexe.

3- Interaction de 1,3-biphényl-2-propen-1-on et ses dérivés- AChE :

Les molécules chalcones ou encore dites 1,3-diaryl-2-propen-1-one sont des composés α,β -cétones insaturées naturelles ou synthétiques, appartenant à la famille des flavonoïdes. Ces molécules possèdent un large spectre d'activité biologique qui leur donne une importance dans l'industrie pharmaceutique. Elles possèdent des propriétés : antibactériennes, antiulcéreuses, antivirales, anticancéreuses, et autres [1]. Les molécules ont été synthétisées dans notre laboratoire de chimie des matériaux-option électrochimie – université de Constantine, sous la direction de Mme L. Bencharif.

La figure suivante représente l'aspect des différentes molécules utilisées dans notre étude :



A : R1 =R2 = H

B : R1 =R2 = MeO

C : R1 = Me, R2 = MeO

D : R1 = H, R2 = NO₂

E : R1 = H, R2 = MeO

Fig : représentation du squelette moléculaire des différentes molécules étudiées.

L'activité et la nature des interactions avec l'acétylcholinestérase sont étudiées selon la démarche suivante :

1- Optimisation de géométrie :

Elle a été d'abord réalisée dans le cadre du champ de forces UFF [2], puis affinée par la méthode semi - empirique AM1[3]. Les valeurs obtenues sont portées sur le tableau :

Molécule	E (ua)	ΔH°_f (Kcal /mol)	μ (D)
Chalcone A	-88,3628	- 32,7373	2,8150
Chalcone B	-123,3189	-31,4595	4,2624
Chalcone C	-111,5792	-13,5606	2,2078
Chalcone D	-118,0940	-37,4005	5,9651
Chalcone E	-105,8418	0,0449	4,03047

2- Simulation du docking moléculaire:

Dans cette étape nous avons retenu les paramètres de la simulation par défauts. Après quelques tests, les dimensions de l'espace de simulation où s'effectue le placement du ligand ont été fixées à 25 *25 *25 Å³. Cette dimension est nécessaire pour tenir compte de l'ensemble des atomes du site actif.

Le nombre de conformations possibles et favorables pour chaque molécule Chalcone varie de 41 à 78 (78 pour A, 61 pour B, 60 pour C, 41 pour D et 57 pour E). De chaque famille de solutions, la meilleure configuration choisie est celle qui présente la plus basse énergie.

Afin de représenter et visualiser les acides aminés les plus importants du site actif, nous avons attribué à chacun d'eux les couleurs suivantes :

Ser200 (rouge), **His440** (bleu), **Glu327** (vert), **Trp84** (jaune), **Phe330** (violet) et le **Trp279** (orange).

NB : nous avons omis quelques résidus de quelques figures pour la clarté des images.

Etude des interactions avec l'AChE :

Les différentes valeurs du ' Scoring ' obtenues sont résumés sur le tableau suivant :

Les cinq molécules Chalcone présentent un caractère inhibiteur vis-à-vis à l'acétylcholinestérase. Leurs énergies d'interaction sont inférieures à celles du substrat (Ach) et la TACRINE.

Molécule	Score_arguslab Kcal /mol
Chalcone A	-12,2259
Chalcone B	-11,2782
Chalcone C	-12,2722
Chalcone D	-11,8331
Chalcone E	-11,9623

En comparant les différentes conformations obtenues pour les trois molécules C, E et B dans lesquelles le cycle A est substitué par le groupement méthoxy, celui-ci est orienté vers la triade catalytique du site actif pour les molécules B et C, en créant des liaisons hydrogène avec His 440 et Tyr130 respectivement, comme schématiser sur les figures 01 et 02. Dans le cas de la molécule E ce groupement a adopté une orientation contraire à la précédente où il a formé deux liaisons hydrogène avec Arg289 et Phe288 (voir figure 03).

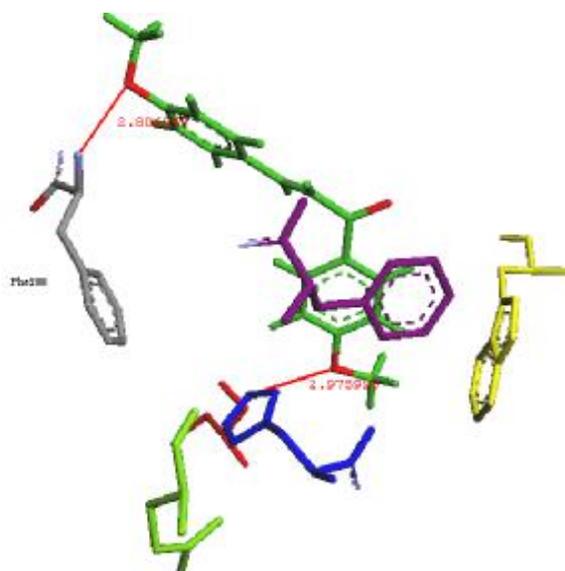


Figure 01 : Représentation des liaisons hydrogène formées par la molécule B.

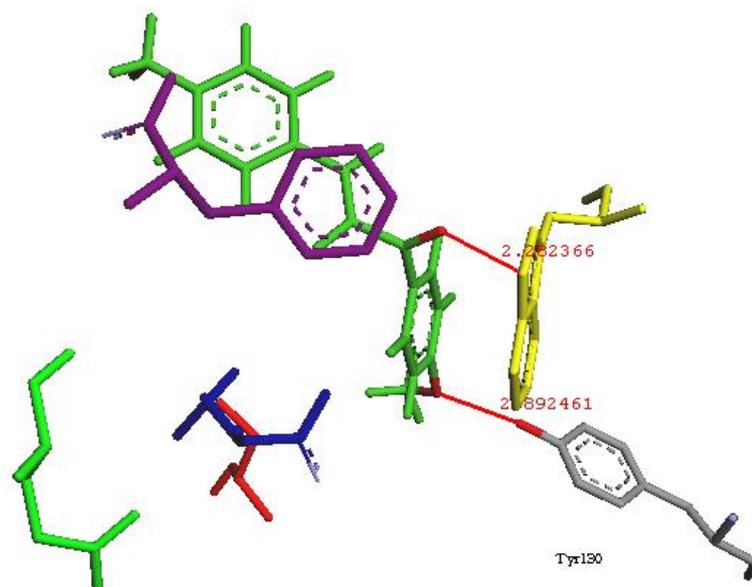


Figure 02 : Représentation des liaisons hydrogène formées par la molécule C.

En ajoutant un deuxième méthoxy au cycle A de la molécule B, celui-ci favorise l'apparition d'une deuxième liaison hydrogène avec la Phe288. Ces résultats sont obtenus aussi dans le cas du ligand E. Ainsi nous pouvons souligner le rôle du méthoxy qui favorise la formation des liaisons hydrogène.

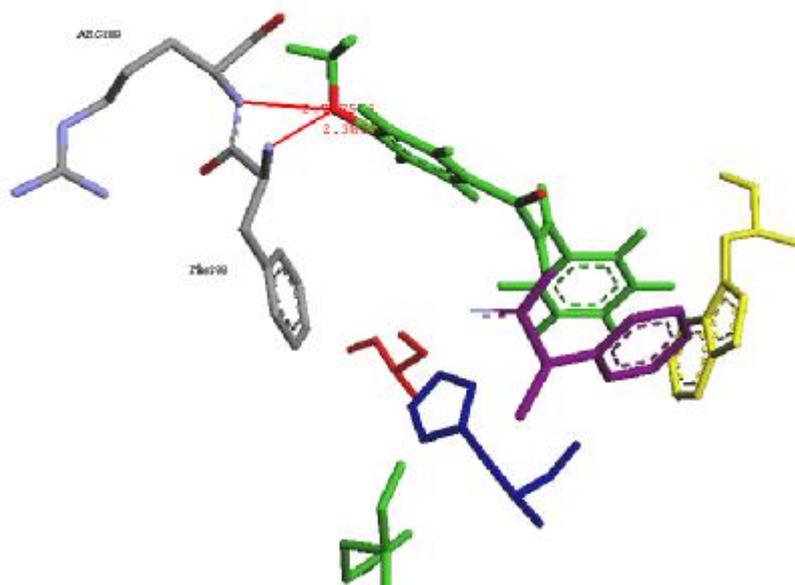


Figure 03 : Représentation des liaisons hydrogène formées par le méthoxy dans la molécule E.

Les longueurs des différentes liaisons hydrogène obtenues pour les trois molécules B, C et E sont résumées sur le tableau suivant :

Molécule	N° d'H-Bonds	Résidu impliqué	Groupe ment du ligand	Distance A°
B	2	NH ₂ -Phe288	O-CH ₃	2,806
		NH ₂ -His440	O-CH ₃	2,976
C	2	O=C-Tyr130	O-CH ₃	2,892
		HN-Trp84	O=C	2,283
E	2	NH ₂ -Arg289	O-CH ₃	2,768
		NH ₂ -Phe288	O-CH ₃	2,381

En comparant les forces des différentes liaisons hydrogène, nous devons nous attendre à un caractère inhibiteur plus prononcé pour le ligand E que pour les deux autres. Nos calculs indiquent au contraire que le ligand C est plus favorable que B et E. Ainsi les interactions hydrogène ne sont pas seules responsables dans l'inhibition de l'AChE. Le rôle des interactions hydrophobiques est aussi important dans l'explication du mécanisme d'inhibition de l'AChE.

Les acides aminés Phe330 et Phe331 sont responsables des diverses interactions hydrophobiques dans les molécules C et E comme traduit sur les tableaux 01 et 02. Le méthoxy du cycle B (de la molécule B) a provoqué un encombrement stérique responsable de

l'absence des interactions hydrophobiques sur ce cycle. Seule l'interaction du méthoxy du cycle A avec le carbone aromatique de l'His440 à été observée à une distance de 2,331 Å°, schématisée sur la figure 04.

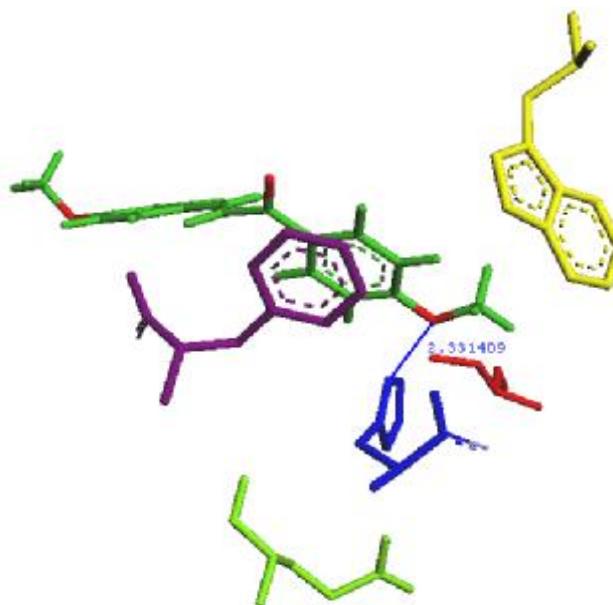
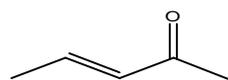


Figure 04 : Représentation de l'interaction hydrophobique observée lors de l'interaction de la molécule B avec l'AChE.

Concernant le complexe formé par la molécule C et l'enzyme, l'acide aminé Phe330 a pu former cinq interactions hydrophobiques où la plus part d'entre elles sont localisées sur la moitié de la molécule du côté du cycle B. La plus courte distance observée est de 2,133Å°. De même l'acide aminé Phe331 a été à l'origine de l'apparition de deux interactions hydrophobiques avec des distances de 1,844 Å° et 2,158 Å°. Il est clair que le fragment [



] de la molécule C est responsable en premier lieu de la formation de ces interactions particulièrement sur l'atome d'oxygène et sur le carbone α de la double liaison du ligand comme représenté sur la figure 05.

La molécule E présente une conformation dans le complexe qui défavorise l'intensité des interactions hydrophobiques constatées dans le cas du ligand C (voir figure 06).

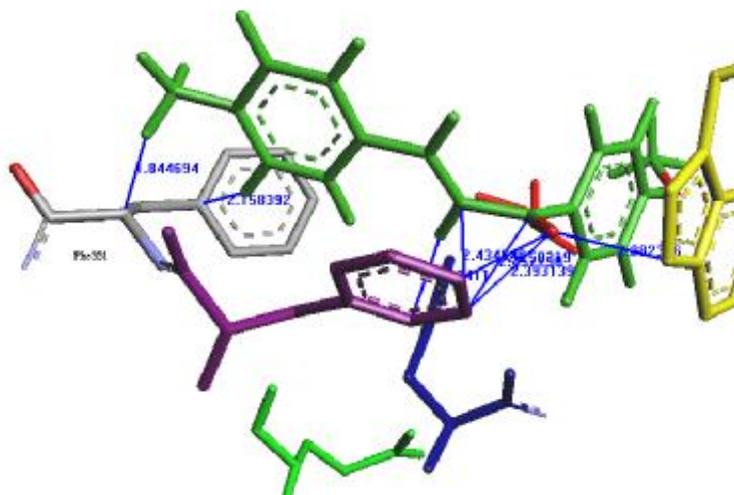


Figure05 : Représentation des interactions hydrophobiques trouvées lors de l'interaction de la molécule C et l'AChE.

Atome du ligand	Atome de la cible	Distance Å°	Type d'interaction
H	C Phe331	1,844	Hydrophobique
H	C Phe331	2,1584	Hydrophobique
H	C Phe330	2,1334	Hydrophobique
C	C Phe330	2,4346	Hydrophobique
C	C Phe330	2,4578	Hydrophobique
O	C Phe330	2,3931	Hydrophobique
O	C Phe330	2,1583	Hydrophobique

Tableau 01 : Représentation des interactions hydrophobiques trouvées avec la molécule C et l'AChE.

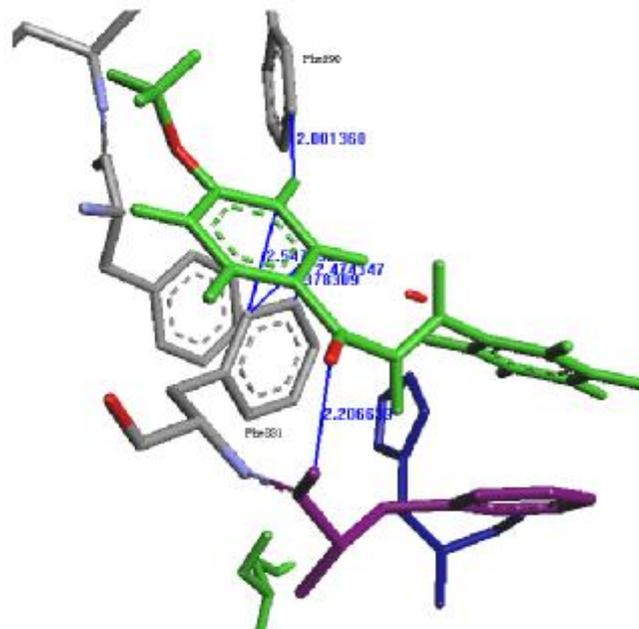


Figure06 : Représentation des interactions hydrophobiques trouvées lors de l'interaction de la molécule E et l'AChE.

Atome du ligand	Atome de la cible	Distance Å°	Type d'interaction
H	C Phe290	1,999	Hydrophobique
C	O Phe331	2,404	Hydrophobique
C	C Phe331	2,498	Hydrophobique
O	O Phe330	2,205	Electrostatique

Tableau 02 : Représentation des interactions hydrophobiques trouvées avec la molécule E et l'AChE

Les techniques que nous possédons actuellement ne nous permettent pas de confirmer la nature et le rôle des interactions de type $\pi - \pi$ entre la Trp84 et le ligand C. Ceci fait l'objet de la perspective de ce travail.

Concernant l'interaction de la molécule A avec l'enzyme, il n'a été observé aucune liaison hydrogène. Seules les interactions de type hydrophobiques ont été observées. Ce qui est remarquable, est que ce ligand adopte la même orientation que celle du ligand E où le cycle B de la Chalcone se dirige vers la triade catalytique en formant qu'une seule interaction hydrophobique avec l'oxygène de **1His440** (O=C-His440) (voir figure 07).

La stabilité du complexe formé à partir de la Chalcone simple A est l'AChE est gouvernée uniquement par des interactions hydrophobiques avec les acides aminés Phe330, Trp84 et His440 comme représentées sur le tableau suivant :

Atome du ligand	Atome de la cible	Distance Å°	Type d'interaction
C	C=O Phe330	2,377907	Hydrophobique
C	C=O His440	2,259974	Hydrophobique
C	C Trp84	2,463979	Hydrophobique
C	C Trp84	2,435032	Hydrophobique
C	C Trp84	2,426394	Hydrophobique
C	C Trp84	2,291371	Hydrophobique
C	C Trp84	2,123272	Hydrophobique
C	C Trp84	1,970558	Hydrophobique
C	C Phe330	2,050239	Hydrophobique
C	C Phe330	2,365304	Hydrophobique
C	C Phe330	2,105773	Hydrophobique
C	C Phe330	2,301713	Hydrophobique

Tableau récapitulatif des différentes interactions générées par le code Arguslab dans le cas de la molécule A.

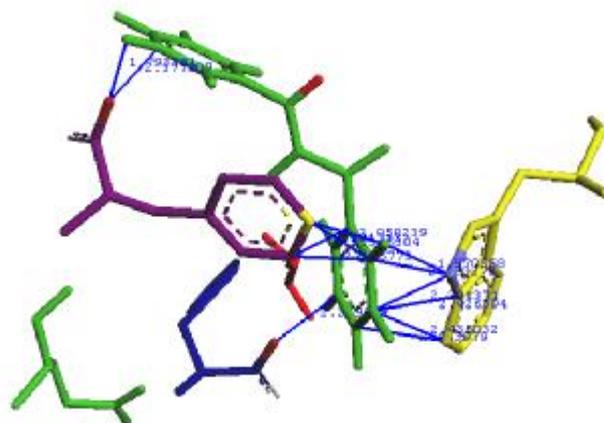


Figure 07 : Représentation des interactions hydrophobiques trouvées lors de l'interaction de la molécule A avec l'enzyme.

Trois liaisons hydrogène sont observées dans le cas de la molécule D (figure 08), qui adopte la même orientation spatiale que la molécule C. il s'agit des liaisons de type :

$C=O \cdots H_2 N-Trp84$ où $d = 2,651 \text{ \AA}$

$N-O \cdots HO-Tyr130$ où $d = 2,059 \text{ \AA}$

$N-O \cdots H_2 N-Gly117$ où $d = 2,55 \text{ \AA}$

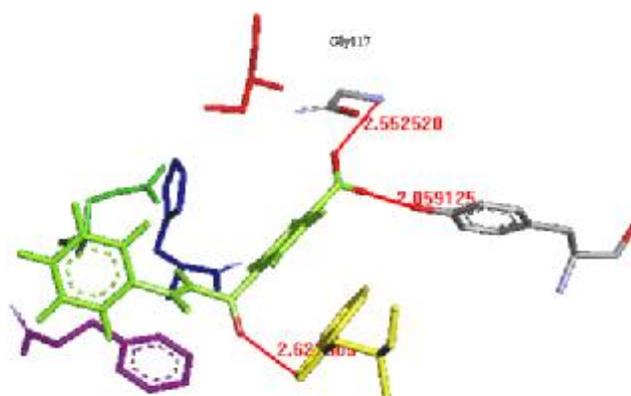


Figure 08 : Représentation des liaisons hydrogène formées par la molécule D.

Des interactions hydrophobiques ont été observées lors de l'interaction de la molécule D avec le site actif de l'enzyme. Une interaction entre un oxygène du groupement nitro de D et un carbone de l'acide aminé Tyr 130 à une distance de 2,261Å°, et deux autre entre deux atome d'hydrogène du cycle B de la molécule est l'acide aminé Phe330 (voire figure 09).

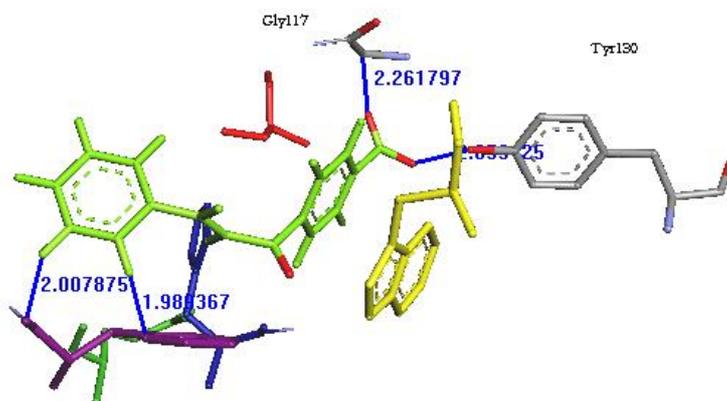


Figure 09 : Représentation des interactions hydrophobiques trouvées lors de l'interaction de la molécule D avec l'enzyme.

Il a été bien montré que le ligand C représente le meilleur inhibiteur parmi les cinq molécules, cependant l'activité biologique ne représente qu'une seule étape parmi plusieurs autres afin d'élucider cette activité biologique. C'est dans le paragraphe suivant que nous allons entamer les propriétés pharmacocinétiques des cinq molécules.

4- Prédiction des propriétés pharmacocinétiques :

Même si l'optimisation de l'activité biologique d'un ligand avec une cible protéique est importante pour la confection de nouveaux traitements, elle demeure cependant qu'une étape parmi plusieurs autres, comme l'ADME-Tox, QSAR, SAS etc..... Cette démarche est basée essentiellement sur les cinq règles de Lipinski [4]. Ces critères sont admis comme conditions générales pour une bonne biodisponibilité.

Critères de Lipinski :

- Masse moléculaire (MM) inférieur à 500 g/ mol.
- Nombre de donneurs de ponts H (ND) inférieur à 5.
- Nombre d'accepteurs de ponts H (NA) inférieur à 10.
- Surface polaire accessible (PSA) inférieur à 140 Å².
- Lipophilie (LogP) inférieure à 5 (avec un optimum entre 0 et 3).

Ces indices ont été calculés dans le cadre du code 'Molinspiration' [5] et leurs valeurs sont représentés sur le tableau qui suit. La surface polaire accessible et le coefficient de partition logP ont été déterminés à partir des contributions de fragments [6].

Composé	MM < 500	LogP < 5	PSA < 140Å ²	NA < 10	ND < 5
A	208,26	3,811	17,071	1	0
B	268,312	3,925	35,539	3	0
C	252,313	4,316	26,305	2	0
D	253,257	3,77	30,56	4	0
E	238,286	3,868	26,305	2	0

Nous constatons que les limites de Lipinski sont respectées avec absence de donneurs.

Les propriétés d'absorption sont attendues pour nos composés même si la gamme de valeurs optimales (entre 0,0 et 3,0) est dépassée.

Le composé C représente le meilleur inhibiteur avec un coefficient de partage de **4,316**. Des travaux sont en cours pour confirmer la corrélation entre l'activité biologique et la valeur de LogP.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Kumar, S. K.; Hager, E.; Pettit, C.; Gurulingappa, H.; Davidson N. E.; Khan, S. R. J. Med.Chem. 2003, 46, 2813.

- [2] A. K. [RAPPE](#), C. J. CASEWIT, K. S. COLWELL, W.A. GODDARD III et W. M. SKIFF, Journal of the American Chemical Society , 114, 100024-10035 (1992): "UFF, a full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations".
- [3] Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F. and Stewart J. J. P., Journal of the American Chemical Society, 107, 3902, (1985)
- [4] <http://fr.wikipedia.org/wiki/LogP>
- [5] <http://www.molinspiration.com/>
- [6] Dey, F.; Caflisch, A. Fragment-Based de Novo Ligand Design by Multiobjective Evolutionary Optimization

الملخص:

إن دراسة التفاعلات الموجودة بين هدف بروتيني معين المركبات الكيميائية Interaction protéine-ligand يعتبر أداة جديدة في ميدان الكيمياء النظرية والكيمياء الصيدلانية. توجد عدة برامج متوفرة حاليا قادرة على دراسة هذا النوع من التفاعلات معطينا عدة معلومات ذات أهمية في هذا المجال.

إن دراستنا تعتمد على دراسة مختلف التفاعلات الموجودة بين إنزيم الاسيتيل كولين استراز Acétylcholinestérase وبعض المركبات من عائلة الشالكونات Chalcones و لكي نحقق هذا العمل قمنا باستعمال البرنامج ارغوسلاف ARGUSLAB كبرنامج لي الرص الجزيئي .

بحساب و مقارنة الطاقة الحرة لمختلف المعقدات المتحصل عليها وجدنا من هو المركب الأكثر مثبت للإنزيم le meilleur inhibiteur . هذا المركب هو المثيل ميثوكسي شلكون و قد تمكن من تكوين معقد ذو طاقة حرة تساوي $-12.2722 \text{ Kcal / mol}$ وهذه الأخيرة تمثل ادني طاقة من بين الطاقات المتحصل عليها.

كما قد ببين أن مختلف هذه المركبات تتفاعل بشكل خصوصي بين الحمضين الامينيين , Phe330 و Trp84 .

التفاعلات الرئيسية المتحصل عليها و الملحوظة من خلال برنامج الرص هي دو طبيعة هيدروفوبيك و روابط هيدروجينية Interactions hydrophobiques et liaisons hydrogène .

المصطلحات :

برنامج الرص، تفاعلات protéine-ligand، مثبت الإنزيم، الشلكونات، الاسيتيل كولين استراز ، الطاقة الحرة للتفاعل.

Résumé :

L'étude des interactions protéine – ligand et le Docking moléculaire représentent des techniques performantes dans la modélisation de l'activité biologique. Le Docking moléculaire « in silico » vise à prédire la structure d'un complexe à partir de molécules isolées.

Dans ce contexte, Arguslab a été utilisé afin d'évaluer l'activité biologique (inhibition) de l'acétylcholinestérase (AChE), cible potentielle dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, par cinq molécules Chalcone. L'évaluation de l'énergie d'interaction de ces molécules, a permis de dégager l'effet inhibiteur de la 4,4'-méthylméthoxychalcone. La valeur de son énergie d'interaction est de -12,2722 Kcal / mol. Nous avons montré que ces molécules interagissent au niveau du site anionique de l'AChE. Les interactions qui gouvernent la stabilité des différents complexes sont de type hydrophobiques et liaisons hydrogènes. Ces interactions sont prononcées avec la Trp84 et la Phe330.

La biodisponibilité de ces molécules Chalcone a été vérifiée tout en calculant leurs propriétés pharmacocinétiques à partir des règles de Lipinski.

Mots clés :

Interaction protéine–ligand ; Docking moléculaire ; Energie d'interaction ; Activité biologique ; Acétylcholinestérase ; Chalcone, Site anionique ; Interaction hydrophobique ; Liaison hydrogène ; Biodisponibilité.

Abstract :

Protein-ligand interactions and Molecular Docking represent powerful technics in the modelisation of the biological activity. The aim of molecular Docking « in silico » is to predict the complexe structur based on own isolated molecules.

In this context, Arguslab was used in order to evaluat the biological activity (inhibition) of acetylcholinesterase (AChE), wich represent a potential target in the treatment of Alzheimer Disease (AD), by five Chalcon molecules. The evaluation of interaction's energies of these five molecules, showed that 4,4'methylméthoxychalcone exhibited the best inhibition effect with an energy of -12,2722 Kcal / mol. It is shownen also that all these molecules interact in the anionique site of AChE activ site.

All complexes were gouverned by hydrophobic interactions and hydrogen bonds. The main interactions wer observed with Trp84 and Phe330.

The biodisponibility of these molecules were checked by calculating their pharmacokinetic properties by Lipinski's rules.

Key words :

Protein-ligand interactions ; Molecular docking ; energy of interaction ; biological activity ; Acetylcholinesterase ; Chalcone ; Anionic site ; Hydrophobic interactions ; hydrogen bonds ; biodisponibility.