



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature
et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence /

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Roumisa NAGHAG et Zoubida NOUIDJI

Le: lundi 28 juin 2021

Thème

Activités biologiques de Taxol

Jury :

Pr.	LAIADI Ziane	Pr	Université de Biskra	Président
M.	DEHIMAT Abdelouahab	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	BENABEDELLEH Fatima	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020 - 2021

Remerciement

Remerciements En premier lieu, nous tenons à remercier *ALLAH*. Nous remercions notre encadreur Dr. *Abdelouahab Dehimat* pour avoir accepté de nous encadrer et de nous diriger pour la confiance qu'il nous a accordée en réalisant ce travail. Nos créateurs pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail. Au terme de ce travail nous tenons à remercier Dr : *Belaidi .S, Almi. I* et *Ben Dahman.A*, pour leur aide précieuse, pour leurs remarques pertinentes et surtout pour le temps qu'ils nous ont accordé et ceci malgré leurs nombreuses charges. Nous tenons à remercier les membres de jury qui ont bien voulu nous faire l'honneur de participer à ce jury. Nous remercions également tous les enseignants du département chimie pour leur contribution à cette formation. Merci à tous ceux qui nous ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance

A mes frères et sœurs : Lakhder, *Asia*, *Naoual*, *Hadjer*, *Najwa*, *Afaf*, et *Seif Eddine* qui m'ont toujours soutenus, et mon fiancé *Diar. A*

Et ma grande famille : *Naghag*

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université: *Nadia*, *Hafida*, *Amel*, *Imane*, *Lamia*, *Kounouz*.

A mon binôme *Zoubida*.

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

Roumissa

Je dédie ce travail

En premier lieu à mes parents, qui me sont très chers en témoignage
à leur soutient pendant toute ma vie et leurs prières tout au long de mes études,

Car aucun mot ne pourra exprimer ma haute gratitude

Et profonde affection.

A mes frères et sœur : *Khaled, Souhile et Fatima*. Pour leurs encouragements

Permanents et leur soutien moral.

A toutes les familles : *Nouidji*. et *benzaid*

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments *Nadia, Hafida,*

Hanane, Khaoula.

A mon binôme *Roumissa*.

A Tous mes amis de la promotion avec lesquels j'ai partagé mes

Moments de joie et de bonheur.

A tous mes enseignants durant les années des études.

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

A tous ceux qui, m'ont donné la force de continuer.

Zoubida

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Sommaire	
Liste des Tableaux	I
Liste des Figures	II
Liste des Abréviations	III
Introduction	1

Premier Partie

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1: Paclitaxel

1.1. Généralités.....	3
1.2. Structure chimique.....	5
1.3. Synthèse totale du Paclitaxel.....	6
1.4. Hémissynthèse du paclitaxel	6

Chapitre 2 : Maladie d'Alzheimer

2.1. Maladie d'Alzheimer	9
2.2. Caractéristique physiopathologie.....	9
2.2.1. Atrophie cérébrale	9
2.2.2. Lésions neuronales	10
2.2.2.1. Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)	10
2.2.2.2. Les plaques séniles	11
2.3. Enzyme Cholinestérase	12
2.3.1. Acétylcholinestérase	13
2.3.1.1. Structure tridimensionnelle	13
A. Le site actif	13
B. Le site périphérique.....	14
2.3.2. Butyrylcholinestérase	14
2.4. Le traitement de la Maladie d'Alzheimer	14
2.4.1. Les antiglutamates	15

2.4.2. Les anticholinestérasiques	15
---	----

Deuxième Partie PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3: Matériel et Méthode

3.1. Microordinateur	17
3.1.1. Logiciel de Docking moléculaire.....	17
3. 2. Banques de données	18
3.2.1. Protein Data Bank (PDB).....	18
3.2. 2.PubChem	18
3.3. Méthodes	18
3.3. 1. Préparation des structures	18
3.3.3. 1.Structure du ligand	18
3.3.1.2. Structures des enzymes	19
A. Acétylcholinestérase	20
B. Butyrylcholinestérase.....	20
3.4. Docking moléculaire	21
3.4.1. Détection des cavités	24
3.4.2. Fonction de score	26
3.4.2.1. Fonctions de score basé sur les champs de force.....	26
3.4.2.2. Fonctions de score empiriques.....	26
3.4.2.3. Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based ».....	27

Chapitre 4: Résultats et discussion

4.1. Etude des interactions entre PTX et AChE	28
4.2. Visualisation les interactions PTX-l'ACHE	30
4.3. Etude des interactions entre PTX et BuChE	31
4.4. Visualisation les interactions PTX- BuChE.....	32
4.5. Comparaison entre ligand Paclitaxel et ligands référence	34
Conclusion.....	35
Bibliographie	35

Annexes

Résumés

Liste des Tableaux

Tableau 1. Principaux formats d'extensions des fichiers utilisés	18
Tableau 2. Illustration propriétés des deux enzymes par MVD	21
Tableau 3. Les cavités détectées pour chaque enzyme cholinestérase (4B82, 7AMZ)	25
Tableau 4. Energies d'interaction (Kcal mol) des cinq poses obtenues pour chaque cavité d'AChE (4B82).	29
Tableau 5. Présentation les différentes liaisons hydrogènes.	29
Tableau 6. Energies d'interaction (Kcal-mol-1) des 05 poses obtenus pour chaque cavité de BuChE (7AMZ).	31

Liste des Figures

Figure 1. L'if du pacifique (<i>Taxus brevifolia</i>) (Yann ,2015)	3
Figure 2. Taxol et dérivés	4
Figure 3. Structure chimique du Paclitaxel (Rousset, 1996)	5
Figure 4. Découverte du 10-déacétylbaccatine III dans les aiguilles de <i>Taxus baccata</i> (Pierre, 2009)	6
Figure 5. Héli synthèse du paclitaxel (Vallata, 2009).....	7
Figure 6. Comparaison entre un cerveau d'un sujet sain et d'un malade d'Alzheimer	10
Figure 7. Désintégration des microtubules et accumulation des protéines.....	11
Figure 8. Plaques séniles.....	12
Figure 9. Hydrolyse de l'acétylcholine	12
Figure 10 . Structure 2D du ligand Paclitaxel par MVD	19
Figure 11 . Préparation de l'enzyme AchE.....	20
Figure 12 . Illustration de la structure 3D de la BuChE (4B82) par MVD.	21
Figure 13. Principe général de Docking (Boucherit , 2012).....	22
Figure 14. Les étapes du Docking moléculaire par logiciel MVD.	23
Figure 15. Paramètre utilisé pour la détection des cavités	24
Figure 16. Illustration des 5 cavité du chaque enzyme détectées (en vert) par MVD	25
Figure 17. Les liaisons hydrogènes entre PTX et les résidus du site d'interaction par MDV.	30
Figure 18. Le type liaison hydrogène et stérique entre PTX et ACHE produisant par le logiciel MVD.....	31
Figure 19. Le type liaison hydrogène et stériques entre PTX et ACHE, produisant par le logiciel MVD.....	32

Liste des Abréviations

2 D : Deux dimensions

3D : Tridimensionnel

A β : Peptide β - amyloïde

Ach: Acetylcholine

AchE: Acétylcholinesterase

Å: Angstrom

MVD: Molegro Virtual Docker

BuChE: Butyrylcholinestérase

ICH : Inhibiteurs de la Cholinesterase

MA : Maladie Alzheimer

NCI: National Cancer Institute

FDA: Food and Drug Administration

TESC: Reactif Chlorure de Triéthylsilyle

USBA: US Department of Agriculture

A β : peptide β -amyloïde

TMA: Tétraméthyl Ammonium

P X T : Paclitaxel

FFMA : Forme précoce de la Maladie d'Alzheimer

NCBI : National center for biotechnology information

PS : Site Périphérique

PAS : Site anionique

PDB : Protein Data Bank

RMN: Résonance magnétique nucléaire

PMF: Potential of Mean Force

RX : Rayons X

Ser: Serine

Glu: Glutamine

His: Histidine

Gly: Glycine

Ala: Alanine

Trp : Tryptophane

Phe : Phénylalanine

Cys : Cystéine

Leu : Leucine

Ile : Isoleucine

Tyr : Tyrosine

Met: Methionine

Val: Valine

PMF: Potential of Mean Force

Introduction

Depuis l'Antiquité, la nature constitue la source et la base de la médecine traditionnelle. Les premiers rapports faisant état de l'utilisation de plantes dans un but médicinal proviennent de Mésopotamie. Le paclitaxel (PTX) est issu du *Taxus brevifolia* (Gaucher, 2009), un petit conifère qui croît dans les forêts du nord-ouest des Etats-Unis. Au cours des années 1960, des chercheurs ont trouvé que l'écorce de cet arbre exerçait une cytotoxicité *in vitro*. Ce n'est qu'en 1969 cependant que le PTX fut isolé de l'écorce en quantités suffisantes afin de permettre l'identification de sa structure chimique. C'est donc tout naturellement que la diversité chimique offerte par le monde végétal s'est révélée une aide précieuse dans la lutte contre un des grands fléaux de notre époque : "l'Alzheimer".

Maladie d'Alzheimer est caractérisée par une perte de neurones cholinergiques. La réduction de l'activité cholinergique qui en résulte est corrélée au degré de déficience cognitive et diminue la quantité d'acétylcholine (ACh) qui intervient de cette cognitive. Les enzymes cholinestérase fait inhibition synaptique de l'ACh s'est avérée préférable au traitement par agoniste direct des récepteurs, car les inhibiteurs de la cholinestérase (ICh) amplifient le schéma spatial et temporel naturel de la libération d'ACh, plutôt que de stimuler de manière tonique ou globale les récepteurs nicotiniques ou muscariniques de l'ACh. L'AChE et la butyrylcholinestérase (BuChE) semblent agir simultanément dans l'hydrolyse synaptique de l'ACh, en mettant fin à son action neurotransmetteur et en corégulant les niveaux d'ACh. Les IChE ont amélioré les symptômes cognitifs et neuropsychiatriques et stabilisé le fonctionnement pendant au moins 6 mois lors d'essais cliniques chez des patients atteints de MA légère à modérée. Bien qu'appartenant à la même classe de médicaments que les cholinestérases, ils sont structurellement différents. Le donépézil et la galantamine possèdent une sélectivité relative pour l'AChE, tandis que la tacrine et la rivastigmine inhibent à la fois l'AChE et la BuChE (Roger *et al.*, 2004).

Certaines recherches se sont concentrées sur l'obtention expérimentale d'inhibiteurs à partir de multi-cibles et produits naturels. Tandis que d'autres se sont concentrées sur des simulations *in silico*. Dans ce dernier groupe, les inhibitions de cibles impliquées dans la MA (Pascoin *et al.*, 2018) telles que la paclitaxel a été étudiée à l'aide d'outil tels que le docking moléculaire.

L'objectif du présent travail était donc de mettre au point l'activité de paclitaxel sur les enzymes cholinestérase AChE et BuChE à partir la modélisation moléculaire du docking qui étudie les modes interactions et les acide aminées interagissent entre Paclitaxel et

l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase respectivement qui on comparée par les ligands référencé (Pyrazinamide ; 3,4 – dihydroquinazoline (8b, 8d) , Borneol).

La présentation générale de notre travail sera la suivante :

Dans une première partie et consacrée à une étude bibliographique mettant l'accent sur deux chapitres : nous consacrerons un premier chapitre à une étude bibliographique sur la structure chimique de Paclitaxel ainsi ces Synthèse totale du Paclitaxel et la Hémisynthèse du paclitaxel.

Dans deuxième chapitre sera consacrée sur Maladie Alzheimer et Caractéristique

Physiopathologie, Atrophie cérébrale, Lésions neuronales et Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) .Ensuite, nous présenterons Enzyme Cholinestérase, la structure tridimensionnelle de l'acétylcholinestérase .Cette partie est terminée par une présentation Le traitement.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à une partie expérimentale qui comprend chapitre troisième nous avons présenté les différents matériels et méthodes utilisés dans cette étude.

Le dernier chapitre de ce mémoire est consacré pour les résultats que nous avons obtenus avec une discussion.

Enfin une conclusion générale résume l'ensemble du travail réalisé.

.

Premier Partie :
Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Paclitaxel

1.1. Généralités

Au début des années 1960, un vaste programme de recherche de nouveaux anticancéreux par criblage systématique d'extraits de plantes est lancé aux Etats-Unis par le *National Cancer Institute (NCI)* et par l'*US Département of Agriculture (USDA)*. Dans le cadre de ce programme, En 1962, un extrait brut récolté du *Taxus brevifolia* montrait une activité cytotoxique importante sur les cellules KB. Quatre ans plus tard, le principe actif de cet extrait a été isolé de l'écorce séchée de L'IF du Pacifique (Stéphamie, 2005).

Paclitaxel est un conifère à croissance lente que l'on trouve principalement sur les côtes nord-ouest des Etats-Unis. Cet arbre peut atteindre une hauteur de 15 m tandis que le tronc n'excède que rarement 50 cm de diamètre. Les feuilles, d'une couleur verte foncée, mesurent 3 cm de longueur pour 2 à 3 mm de largeur. L'arbre produit des arilles, enveloppes charnues de couleur rouge (**Figure 1**) avec un rendement de 0,02 %. Cette substance a été identifiée sous le nom de taxol ; cependant, sa structure exacte a seulement été élucidée en 1971 (Yann, 2015).



Figure 1. L'if du pacifique (*Taxus brevifolia*) (Yann, 2015).

Les extraits de l'écorce de l'if du pacifique sont envoyés au Research Triangle Institute pour une évaluation de leurs propriétés cytotoxiques. Les Drs. Monroe Wani et Mansukh Wall isolent alors de ces extraits d'écorce un nouveau di terpène qu'ils nommeront taxol (**Figure 2**). Ils déterminent sa structure par des figures de diffraction aux rayons X de la chaîne latérale et du noyau tétra cyclique. Du fait de sa faible solubilité et disponibilité, cette

molécule reste oubliée jusqu'à ce qu'une biologiste mandatée par le *National Cancer Institute* (NCI), Susan Horowitz, découvre en 1979 le mécanisme d'action du Taxol, mécanisme unique à l'époque de sa découverte car différent de tous les autres poisons.

Du fuseau connus jusqu'alors. Ce mode d'action original en fait un candidat potentiel en tant qu'agent anticancéreux, et dès 1983 des tests cliniques sont menés sur différents types de cancers. Finalement en 1992 la Food and Drug Administration (FDA) donne son accord pour l'utilisation du Taxol dans le traitement du cancer des ovaires, puis en 1994 dans le traitement du cancer du sein. Depuis, l'utilisation clinique du Taxol s'est étendue au sarcome de Kaposi, à certains cancers du poumon, de la tête et du cou, ainsi qu'à d'autres variétés de cancers. Il est également utilisé en 1998 dans traitement d'Alzheimer depuis 1999 en association avec le cis platine. Il est devenu l'anticancéreux le plus vendu au monde, avec des ventes allant jusqu'à un milliard de dollars en 1998.

Afin de remédier à la faible disponibilité du taxol dans l'écorce d'if, une collaboration est établie en 1986 entre Rhône-Poulenc Santé et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette. Cette alliance permet la découverte du taxotère, préparé par héli synthèse à partir de la 10-déacétylbaccatine III qui est extraite des aiguilles de l'if européen (*Taxus Baccata*. L) et qui est présente de manière beaucoup plus abondante que le Taxol (**Figure 2**). De plus le taxotère se révèle plus actif que le Taxol, et ses premiers essais cliniques débutent en 1990. Il est approuvé par la FDA en 1996 (David *et al.*, 1994).

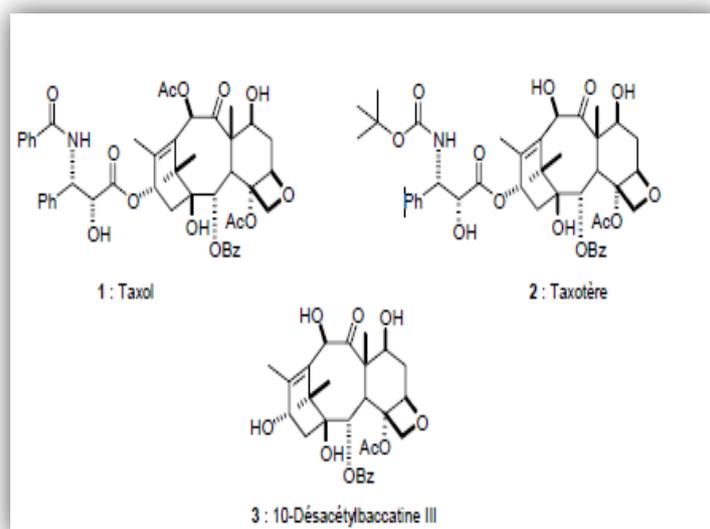


Figure 2. Taxol et dérivés (Stéphanie, 2005).

1.2. Structure chimique

Le Paclitaxel est un métabolite secondaire de terpénique appartenant à la sous-classe des taxoïdes. La formule chimique du taxol est : 5 bêta, 20-époxy-1,2 alpha, 4,7 bêta, 13 alpha-hexahydroxytax-11-ene-9-one 4,10-di acétate benzoate de (2R, 3S) -N-benzoyl-3-phénylisosérine, il est comporté 11 centres asymétriques. Sa formule brute est C₄₇H₅₁N₀O₁₄, et sa formule développée est illustrée par la Figure 3 (David *et al.*, 1994).

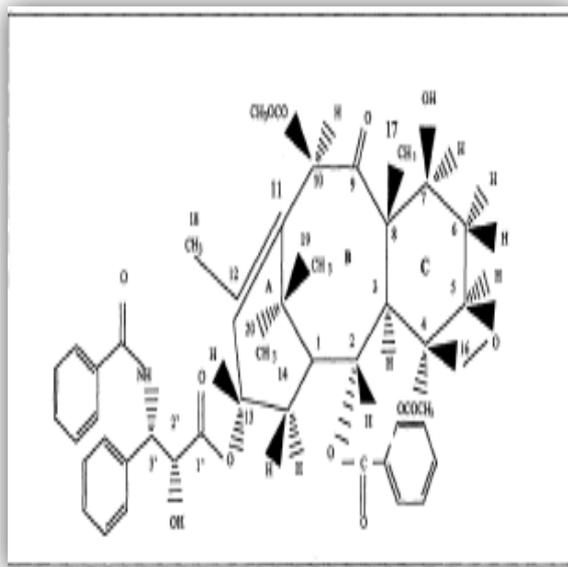


Figure 3. Structure chimique du Paclitaxel (Rousset, 1996) .

La structure du Paclitaxel repose sur la liaison d'un anneau complexe texane à un anneau oxétanne en C-4 et C-5, estérifié en C-13. La masse moléculaire relative est de 853,9 daltons (Rousset, 1996) .Après isolement et purification, le Paclitaxel est une poudre blanche à blanc-crème, peu hygroscopique. Insoluble en milieu aqueux, le Paclitaxel est soluble dans certains solvants organiques comme le Méthanol, l'Éthylacétate, l'Acétonitrile (Mahier, 2017)

Il n'est pas ionisable et ne possède donc pas de pKa ni de capacité tampon. En raison de son insolubilité en milieu aqueux, le pH n'a pu être déterminé. En revanche, le coefficient de partage n-octanol/tampon pH 4, réalisé à 24 °C, donne une valeur au Log de P de 3,7, confirmant la très grande lipophile de cette molécule.

1.3. Synthèse totale du Paclitaxel

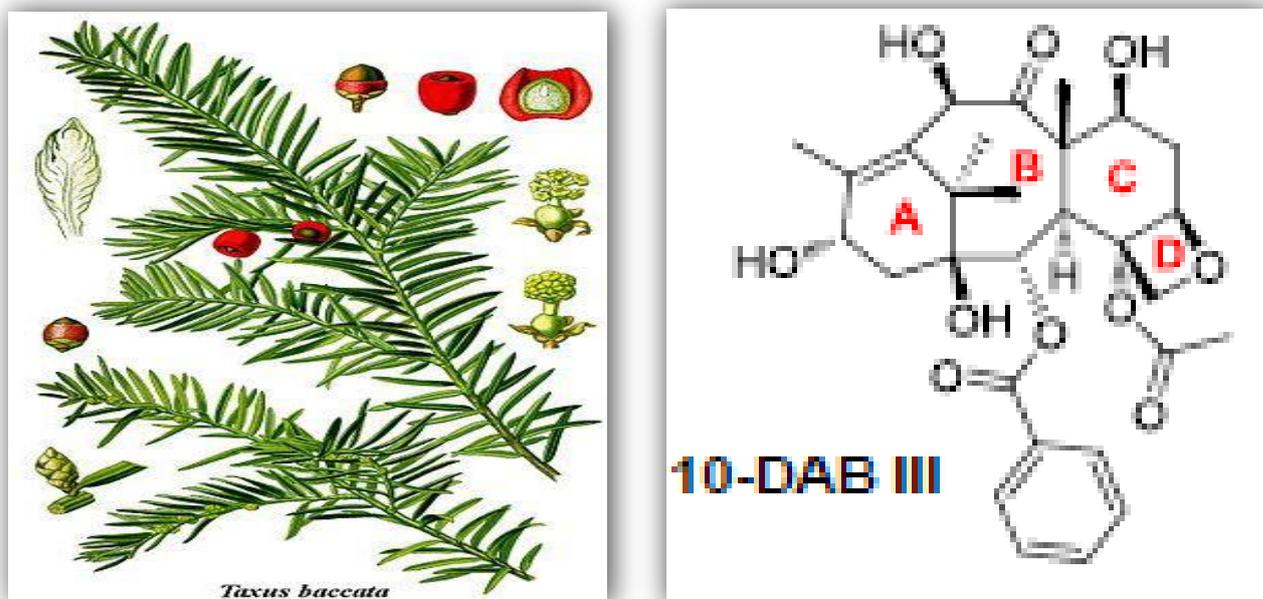
La synthèse totale du Paclitaxel a représenté l'un des challenges de la chimie médicinale les plus difficiles à relever en raison de la complexité structurale de la molécule et du nombre de centres stéréogènes présents sur ce composé.

Les deux premières synthèses totales furent publiées, de manière quasi simultanée, par les groupes de Holton et de Nicolaou en 1994 (Kingston, 2011).

Par la suite, les groupes de Danishefsky, de Wender (synthèse totale la plus courte en 37 étapes), de Mukaiyama, de Kuwajima et de Takahashi relevèrent le challenge avec succès. Il est évident que ces synthèses totales ne sont pas exploitables à une échelle industrielle dans le but d'assurer la production du Paclitaxel. Toutefois, elles ont permis de développer de nouvelles méthodologies et stratégies applicables en synthèse organique. Ces travaux ont facilité la conception et la synthèse d'analogues du squelette Taxanes (Lamotte, 2015).

1.4. Hémisynthèse du paclitaxel

La 10-décacétylbaccatine III est un produit naturel non cytotoxique, qui possède déjà la partie terpénique complexe des Taxanes et qui peut donc être utilisé comme précurseur ; extrait des aiguilles de l'if européen (*Taxus baccata*). Un kilogramme d'aiguilles fraîches contient en moyenne un gramme de ce précurseur (**Figure 4**).



L'hémisynthèse du paclitaxel est fondée dans un premier temps sur une étape de protection des fonctions alcool libres en C7 et C10 de la 10-déacétylbaccatine III. En effet la structure de la 10-déacétylbaccatine III présente quatre hydroxyles libres (C1; C7; C10 et C13) (Vallata, 2009) .

Les hydroxyles en position C1 et C13 sont beaucoup moins réactifs que ceux en C7 et C10 et ceci en raison de leur encombrement stérique. Ainsi une protection sélective de C7 et C10 est réalisable. Une réaction d'acylation de l'hydroxyle en C13 à l'aide de précurseurs des chaînes latérales, suivie d'une étape de déprotection d'un ou des deux hydroxyles en position 7 et 10 (Vallata, 2009).

Il a été montré que le réactif Chlorure de Triéthylsilyle (TESCl) était capable de protéger temporairement et sélectivement l'hydroxyle en C7 sans toucher la position C10. En fait, la présence du groupement Triéthylsilyloxy en C7 gêne l'approche du réactif vers la position 10. Cela a donc permis d'introduire des groupes protecteurs distincts en C7 et C10. Pour le Paclitaxel, la première étape consiste à protéger, à l'aide de TESCl, l'hydroxyle C7 et dans un second temps à acyler l'hydroxyle en C10 avec de l'anhydride acétique. Après avoir protégé les deux hydroxyles les plus réactifs, la position C13 devrait être fonctionnalisée. Pour pallier le fort encombrement autour de l'hydroxyle en C13, il a été nécessaire de faire réagir l'acoolate correspondant avec le -lactame, précurseur cyclique de la chaîne latérale. Finalement une étape de désilylation en C7 et sur la chaîne latérale en milieu acide conduit au paclitaxel (Lamotte, 2015). Ce mécanisme réactionnel de l'hémi synthèse du paclitaxel est illustré dans la (Figure 5).

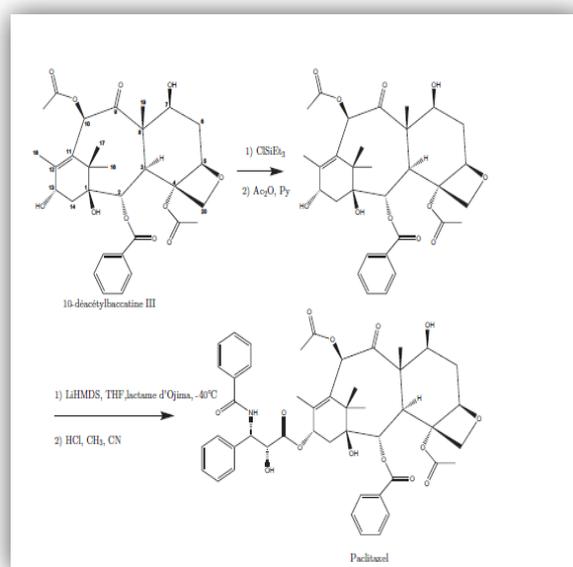


Figure 5. Hémisynthèse du Paclitaxel (Vallata, 2009)

Chapitre 2 :

Maladie d'Alzheimer

2.1. Maladie d'Alzheimer

Avec le vieillissement de la population, la maladie d'Alzheimer (MA) est devenue un problème majeur de santé publique, est la maladie neurodégénérative la plus fréquente affectant 13 millions de la population générale âgée de plus de 65 ans. Cette pathologie dont l'étiologie n'est toujours pas connue, est caractérisé par des lésions histopathologiques bien précises qui sont les plaques séniles (dues à l'accumulation du $A\beta$: peptide β -amyloïde) et les dégénérescences neurofibrillaires (Remya *et al.*, 2013).

Les personnes atteintes de cette maladie présentent un niveau faible en acétylcholine (ACh) le neuromédiateur qui permet notamment le stockage des informations, en particulier au niveau des neurones de l'hippocampe. Il est désormais définitivement établi que les deux cholinestérases (l'acétylcholinestérase : AChE et butyrylcholinestérase : BuChE) des substances caractéristiques de la MA (Mahmud *et al.*, 2009).

2.2. Caractéristique physiopathologie

2. 2.1. Atrophie cérébrale

Chez les malades d'Alzheimer une atrophie corticale pourra être observée, avec une perte d'environ de 8% de son poids tous les 10 ans contrairement à un sujet sain qui ne perd que 2%. Au cours du vieillissement chez le sujet sain, l'atrophie touchera les lobes frontaux, alors que chez les malades d'Alzheimer cette perte sera surtout localisée au niveau de l'hippocampe. Puis ces lésions se propageront aux autres aires du cerveau comme celle du langage, de la réalisation des gestes et celle du raisonnement. Ces différentes lésions seront distinguées grâce à la technique de l'IRM ou du scanner. Deux classifications décrivent l'atteinte progressive des différentes régions du cerveau : la classification de Braak ou la classification de Delacourte (**Figure 6**).

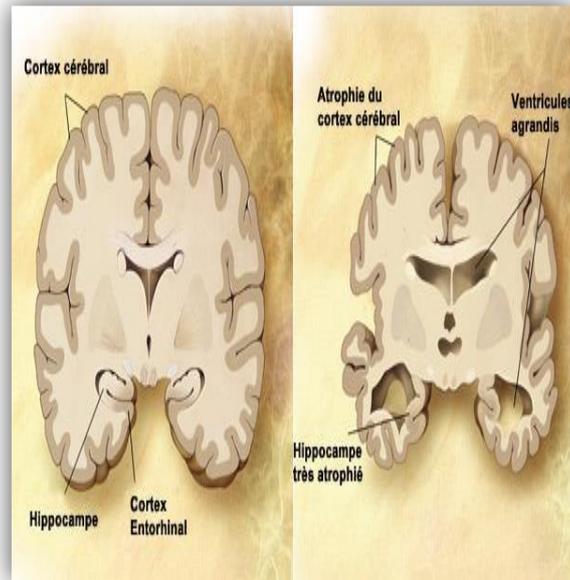


Figure 6. Comparaison entre un cerveau d'un sujet sain et d'un malade d'Alzheimer (Marie, 2013).

2.2. 2. Lésions neuronales

Le début de la physiopathologie est encore mal connu à ce jour, les spécialistes commencent à connaître le mécanisme qui induit les démences. Il y aurait deux causes principales qui apparaissent environ 10 ans avant l'arrivée des premiers symptômes : les dépôts amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (Vandendriessche, 2016) .

2.2.2.1. Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

La dégénérescence neurofibrillaires (DNF) est constituée d'amas fibrillaires de protéine Tau phosphorylée (Tau stabilise les microtubules), en cours de dégénérescence, au sein du neurone. Elle entraîne un dysfonctionnement du corps cellulaire neuronal (blocage du transport intracellulaire) par rigidification. Cette anomalie a une extension topographique (Fontanet, 2019).

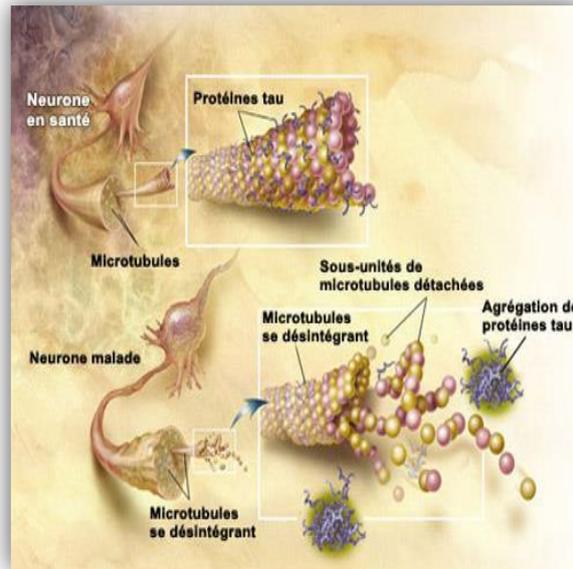


Figure 7. Désintégration des microtubules et accumulation des protéines (Lucie, 2013).

2.2.2.2. Les plaques séniles

Les plaques séniles rassemblent les deux types de lésions vues précédemment, c'est-à-dire que dans le cerveau des malades d'Alzheimer, nous observons des «plaques» qui présentent en leur centre des dépôts β -amyloïde et en leur périphérie des lésions neurofibrillaires. En plus de ces deux lésions, il y a une inflammation neuronale due à la présence de protéines inflammatoires, de cytokines pro-inflammatoires et des cellules microgliales en surnombre (Lucie, 2013).

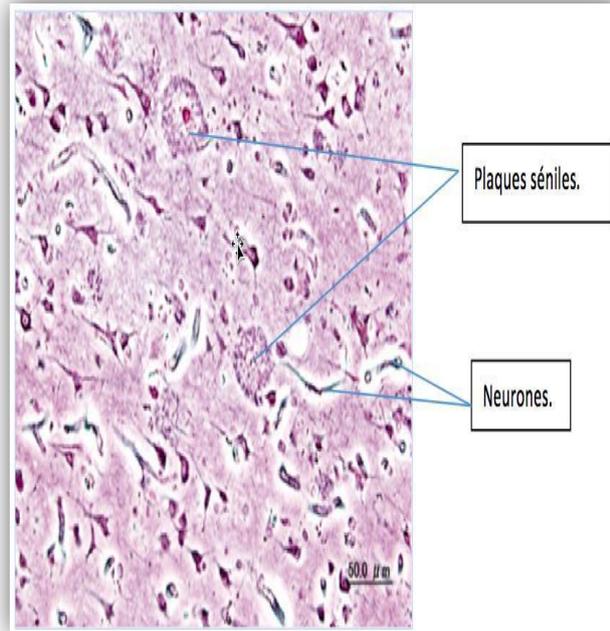


Figure 8. Plaques séniles (Site web 1).

2.3. Enzyme Cholinestérase

Le terme de Cholinestérase a été proposé en 1932 pour décrire une enzyme capable d'hydrolyser (**Figure 9**) à une vitesse moindre de l'acétylcholine et d'autres esters de la choline. Il existe chez l'homme deux Cholinestérases différant par leur origine, leur lieu des synthèses, leur structure, leur spécificité d'action, leur fonction physiologique et l'indication de la mesure de leur activité (Colletier, 2006) .

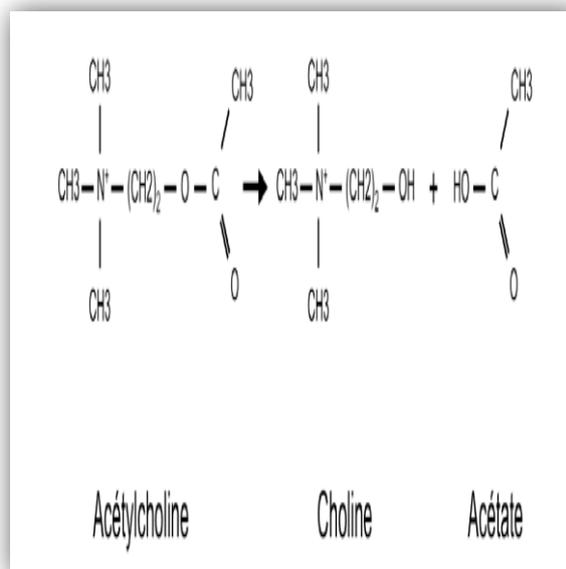


Figure 9. Hydrolyse de l'acétylcholine (Colletier, 2006)

2.3.1. Acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme naturellement présente chez l'homme qui entraîne la destruction de l'acétylcholine. Elle est synthétisée dans le globule rouge (où son rôle n'est pas connu) et le tissu nerveux. Elle est présente essentiellement au niveau des synapses dans le tissu nerveux et à la jonction neuromusculaire, dans la substance grise, les poumons et la rate. Une synapse cholinergique fonctionne schématiquement en quatre temps (Lauwerys, 1999).

Le neurotransmetteur, l'acétylcholine (ACh), est d'abord libéré, diffuse à travers la fente synaptique, se lie réversiblement au récepteur nicotinique et est finalement hydrolysé. C'est lors de cette dernière étape qu'intervient l'AChE. Elle remplit sa fonction cholinergique en assurant la terminaison de la transmission de l'influx nerveux au sein des jonctions neuromusculaires et des synapses cholinergiques. Cette action est réalisée par l'hydrolyse de son substrat, l'acétylcholine (ACh), en acétate et choline, elle libère la fente synaptique en vue d'une éventuelle nouvelle transmission, permettant ainsi le passage des informations. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont une classe de substances qui empêchent la rupture de l'acétylcholine. Ils agissent en inhibant l'enzyme acétylcholinestérase qui est présente dans les régions autour des neurones pour contrôler les niveaux d'acétylcholine dans le cerveau (Lauwerys, 1999).

2.3.1.1. Structure tridimensionnelle

L'AChE est une sérine hydrolase dont l'implication est très importante dans la régulation de la neurotransmission cholinergique dans toutes les régions du cerveau. Les études de diffractions aux rayons X ont montré que l'AChE humaine (hAChE) est composée de deux sites suivants :

A. Le site actif

Le site actif c'est la machinerie catalytique de l'AChE se trouve au fond d'une gorge profonde et étroite. On distingue deux sous-sites : le site anionique et le site estérasique (Sansou, 2009) .

Le site stéarique correspond au locus au niveau duquel la portion acétyl de la molécule d'ACh se fixe et forme l'intermédiaire tétraédrique. L'ACh est alors clivée, libérant ainsi la choline et l'intermédiaire enzyme acylée. Ensuite a lieu la dé acétylation, qui régénère l'enzyme libre en libérant l'acétate. La triade catalytique est formé des résidus Ser200, Glu327 et His440 .C'est au niveau de la sérine catalytique que se fixe la portion carbonyle de

la molécule d'ACh. L'His440 se comporte comme un catalyseur acido-basique pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique. Grâce à son noyau imidazole, elle établit deux liaisons hydrogènes avec la Ser200 et le Glu327 qui jouent, dans cette triade catalytique, le rôle de donneur et d'accepteur final de proton, respectivement (Bocquené, 1996).

Substrat sera stabilisée est plutôt aromatique qu'anionique ; il est constitué des résidus Trp84, Glu199 et Phe330. La charge positive du ligand sera effectivement stabilisée par l'attraction électrostatique du résidu Glu199, mais le sera beaucoup plus effectivement par son interaction avec les électrons des noyaux aromatiques environnant. Ce sous-site anionique est capital pour la catalyse : on estime que plus de 50% de l'énergie de stabilisation du substrat lui est directement imputable. Grâce à la présence des résidus Trp84 et Phe330 qui seront assistent à stabilisation d'énergie (Jacques, 2006).

B. Le site périphérique

Le site périphérique est constitué des résidus Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 et Tyr334 d'AChEs. Le résidu le plus important dans la constitution de ce site est le Trp279, ce dernier permet grâce à des expériences de mutagenèse dirigée ainsi que grâce aux mesures d'affinités et de compétition avec le substrat de ligands spécifiques du site périphérique reconnaissance caractérisation biochimique du site périphérique (Eicher *et al.*, 1994).

2.3.2. Butyrylcholinestérase

Elle a une affinité beaucoup plus large ; elle peut hydrolyser un grand nombre d'esters synthétiques et naturels, y compris l'acétylcholine et la Succinylcholine. Elle est retrouvée dans le plasma ou le sérum, dans le foie (siège de sa synthèse), le pancréas, l'intestin et d'autres tissus. Son rôle physiologique n'est actuellement pas connu. Bien qu'il soit généralement envisagé en association avec l'acétylcholinestérase (AChE) (Thabet *et al.*, 2009).

2.4. Le traitement de la Maladie d'Alzheimer

Dans l'état actuel des connaissances de la médecine, aucun traitement curatif ne permet de guérir de la maladie d'Alzheimer, encore moins pour la prévenir. Cependant, certains médicaments ont la capacité de ralentir parfois la progression des symptômes de la maladie, tels que la perte de mémoire, les problèmes de langage et de raisonnement et les difficultés motrices. Ces traitements peuvent améliorer la qualité de vie durant plusieurs années. Leur efficacité est très variable d'une personne à l'autre et les effets secondaires peuvent également

être importants. Certaines personnes ne réagissent pas du tout à ces médicaments. A l'heure actuelle, il existe une dizaine de médicaments commercialisés à travers le monde appartenant à deux grandes familles à savoir : les antiglutamates et les anticholinestérasiques.

2.4.1. Les antiglutamates

Cette classe thérapeutique, apparue en 2002, ne contient qu'un seul médicament : la mémantine. Il est indiqué chez les patients plus avancés, des stades modérément sévères à sévère de la maladie d'Alzheimer. Les antiglutamates visent à bloquer les récepteurs du glutamate, molécule responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ils ont pour effet de retarder la perte des fonctions cognitives allant parfois jusqu'à les améliorer chez certains patients. On note aussi des effets positifs sur les activités quotidiennes et les troubles du comportement. La mémantine est par ailleurs bien tolérée par les malades (Laurent , 2011)

2.4.2. Les anticholinestérasiques

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par des lésions du cerveau. Ces lésions sont accompagnées d'une diminution de l'Acétylcholine. Ce dernier est un neurotransmetteur qui permet aux neurones de la mémoire de communiquer. Les anticholinestérasiques ont pour action d'empêcher la dégradation de cette molécule. Indiqués dans les formes légères à modérément sévères, les anticholinestérasiques ont montré leur efficacité dans les domaines de la cognition. L'entourage du patient note généralement une amélioration globale, tant au niveau du comportement que dans les gestes quotidiens. En revanche, il n'y a pas d'amélioration significative en termes de mémoire. Les anticholinestérasiques regroupent trois molécules alcaloïdes d'origine végétatives mais de même efficacité : Galantamine et Huperzine A, physostigmine. Ils présentent toutefois des effets indésirables fréquents au niveau digestif (nausées, perte d'appétit, diarrhées) .C'est à cette famille de médicaments que nous nous intéressons dans le présent travail en contribuant à la conception in silico de nouveaux anticholinestérasiques par criblage virtuel (Laurent , 2011) .

Deuxième Partie

PARTIE

EXPERIMENTALE

Chapitre 3 :

Matériel et Méthodes

Dans le but essentielle de note travail de master de développer de nouveaux inhibiteurs de la protéine Cholinestérase impliquée dans la maladie d'Alzheimer, À l'aide de la technique du Docking moléculaire, nous avons étudiée le mode D'interaction le plus probable paclitaxel dans le site actif des enzymes de Cholinestérase Pour ce faire, nous avons utilisé le matériel suivant :

3.1. Microordinateur

Dans notre étude nous avons utilisé un micro-ordinateur ayant une mémoire vive de 2 Go. Tous les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7.

3.1.1. Logiciel de Docking moléculaire

Dans cette étude, nous avons utilisé le programme Molegro Virtuel Docker 5.5, la procédure de docking par ce logiciel se décompose.

Toutes les simulations du docking moléculaires effectués dans cette étude on été réalisé par Molegro Virtual Docker (MVD 2012.5.5.0, Molegro APS) comme logiciel Docking moléculaire. Ce programme possède une interface utilisateur conviviale et il a la possibilité de réaliser un paramétrage fin à tous les niveaux du processus tels que : le Docking, le Scoring, la flexibilité des résidus et des ligands qui est modulable¹, limitant ainsi son a Ce programme possède une meilleure performance pour étudier et prédire le mode d'interaction ligand-récepteur en comparaison avec d'autres logiciels fréquemment utilisés tels que Autodock, Super flex, Flex and Gold (Arpigny *et al.*,1999) .

MVD permet une meilleure visualisation des interactions hydrophobes qui résultent des simulations du docking. Les résultats obtenus par MDV, sont stockés et traités par la suite avec le logiciel Ligplot4. Ce logiciel est un programme de visualisation moléculaire à deux dimensions (2D) pour l'affichage animé et l'analyse des systèmes biomoléculaires de grandes tailles à l'aide d'une interface graphique et de la conception de scripts (Kern *et al* ,1990).

Les différents formats d'extensions avec les quels sont importés le ligand et le récepteur (protéine cible) sont résumés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Principaux formats d'extensions des fichiers utilisés

Format	Utilisation	Reference et documentation
Pdb	Macromolécules ,ligands, complexes	Protein Data Bank http://www.pdb.org
MOL	Ligand (1 molécule, 2D-3D)	MDL Molfile (MDL Informations Systems, Symyx, Accelrys)

3. 2. Banques de données

3.2.1. Protein Data Bank (PDB)

Protein Data Bank c'est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) des macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.

3.2. 2.PubChem

C'est une banque de données de molécules chimiques gérée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI), branche de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis sous l'autorité de la National Institutes of Health (NCI).

La chimio thèque PubChem répertorie plusieurs millions de composés gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres : Chimique, Biochimique, Pharmacologique, Production, Toxicologie, Environnemental etc.

3.3. Méthodes

3.3. 1. Préparation des structures

3.3.3. 1.Structure du ligand

La structure 2D du ligand utilisé dans ce travail est importé sous forme PDB de la banque de donnée PubChem (**Site web 2**) sous le code **CID 133640187 (Figure 10)**. Après apparaitre la fenêtre de file, nous choisisons notre ligand télécharge et qui été optimisée l'énergie de notre ligand.

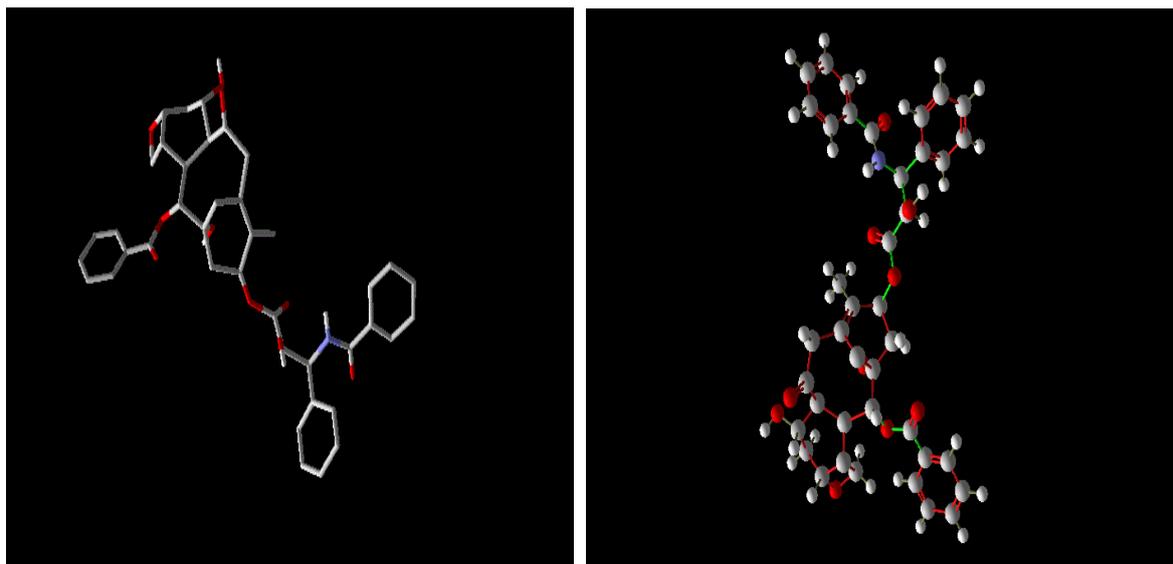
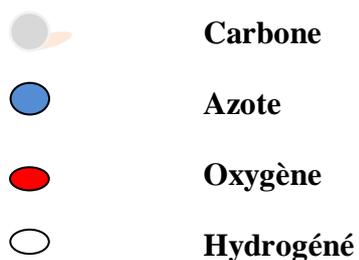


Figure 10 . Structure 2D du ligand Paclitaxel par MVD.



3.3.1.2. Structures des enzymes

Toutes les structures tridimensionnelles des cholinestérases testées dans cette étude ont été téléchargées à partir de la base de données RCSB (**Site web 3**)

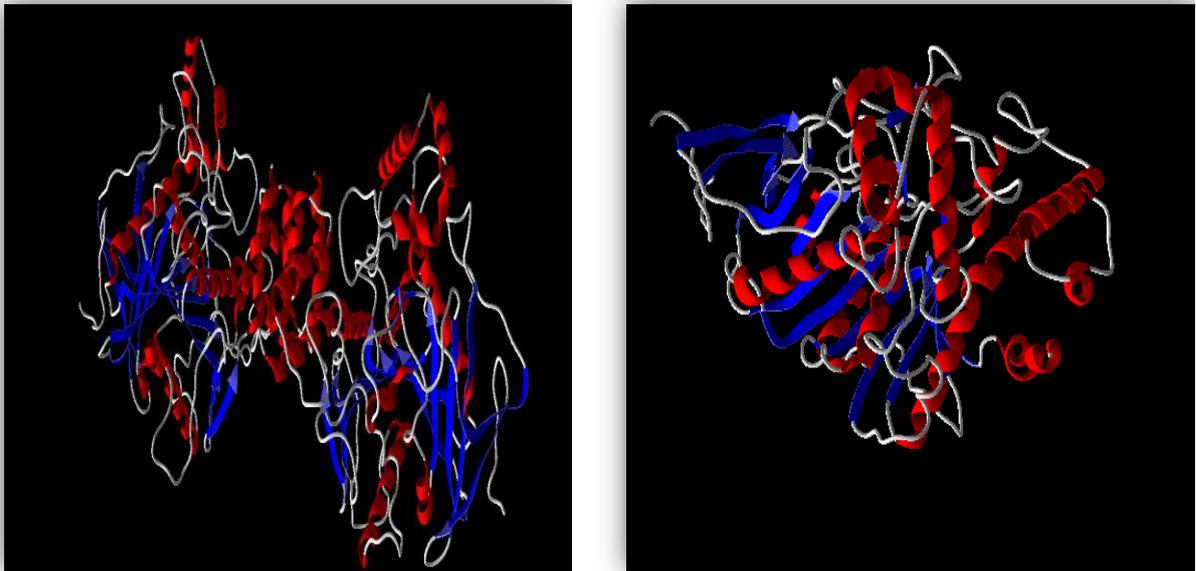
PDB présente une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (3D) de macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement obtenues soit par cristallographie (rayons X), soit par RMN (Bouchagra, 2018).

Les enzymes utilisés dans cette étude sont : l'acétylcholinestérase (4B82) et le butyrylcholinestérase (7AMZ).

A. Acétylcholinestérase

La structure tridimensionnelle choisie dans cette étude pour Ache identifiée par le code (BDP ID : 4B82) est constituée d'un dimère de chaîne (A et B), avec une résolution de 2,10 Å.

Notre étude est basée sur la simplification d'enzyme comme une étape clé et essentielle pour accélérer et simplifier les calculs. Pour cela on élimine une des deux chaînes liées avec les molécules de Co -cristallisation, les molécules d'eau, et le cofacteur (**Figure 11**).



A

B

Figure 11 . Préparation de l'enzyme AChE

(A) : Structure tridimensionnelle de l'AChE (4B82) par VDM ; (B) : Modèle simplifié de la structure tridimensionnelle de l'AChE.

B. Butyrylcholinestérase

La structure tridimensionnelle au format pdb de butyrylcholinestérase est disponible dans la banque des données des protéines ce le code (**PDB ID : 7AMZ**) qui présente dans le **Figure 12**, avec une résolution 2,25 Å.

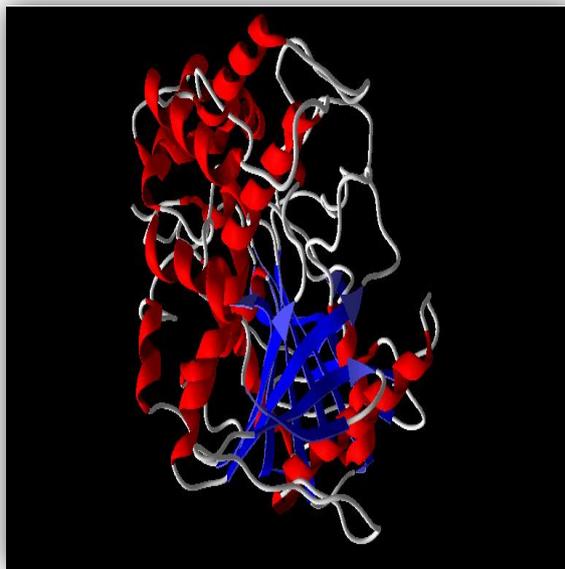


Figure 12 . Illustration de la structure 3D de la BuChE (4B82) par MVD.

En rouge : Chaîne Alpha ; En bleu : Chaîne Béta

Les deux enzymes sont caractérisées par des propriétés qui sont citées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Les propriétés des deux enzymes par MVD

Enzyme	Nombre des acides amines	Nombre d' atoms	Nombre d'atomes lourds	Nombre des bonds	Masse Molaire g/mol
AChE (4B82)	535	8243	4177	8369	59022,3
BuChE(7AMZ)	527	8311	4203	8433	59402,9

3.4. Docking moléculaire

Docking est le nom donné aux simulations moléculaires dans les quelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interactions entre deux molécules (Boucherit, 2012). C'est un outil important dans la conception de médicaments où on utilise une simulation assistée par ordinateur (Press, 2008).

Dans la plus part des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire (cible de docking) dont la structure tridimensionnelle est connue et d'une petite molécule (ligand).

Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le Docking proprement dit et le scoring (**Figure15**).

La première (le Docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables (Boucherit, 2012).

La deuxième (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées (Boucherit, 2012).

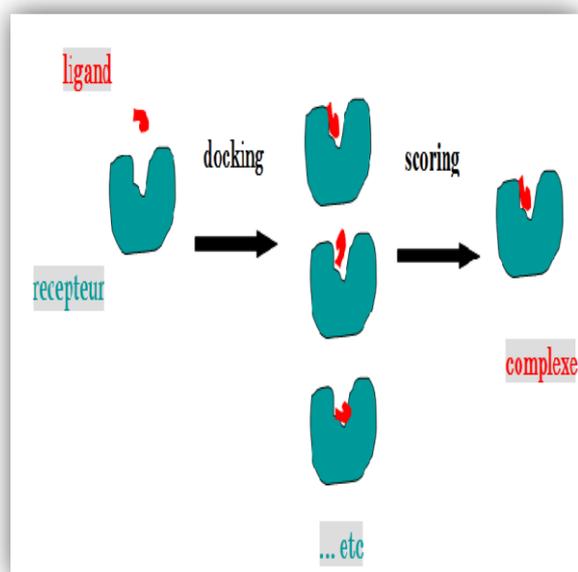


Figure 13. Principe général de Docking (Boucherit, 2012) .

Généralement, les techniques docking moléculaire permettent de prédire, par des méthodes de calcul, les structures du complexe ligand-protéine en partant d'un ensemble variable de conformations et d'orientations du ligand (flexible ou non flexible) et parfois du récepteur (chaînes latérales, résidus et « backbone » flexible ou non). Le processus global se déroule en différentes étapes présentées ici comme consécutives, mais ce n'est pas toujours le cas (selon le logiciel utilisé).

La première étape consiste à importer et à préparer le ligand et le récepteur dans l'espace de recherche. Les fonctions de préparation générées automatiquement et qui sont intégrées dans le programme MVD, permettent de préparer le récepteur et le ligand dans l'espace de travail «work space». Dans l'espace de recherche le récepteur est considéré comme un corps rigide et le ligand sera flexible.

La seconde étape permet de détecter les cavités présentes dans le récepteur en utilisant l'étape permet de détecter les cavités présentes dans le récepteur en utilisant l'algorithme intégré pour la détection de cavité (creat cavities) .Dans cette étape l'utilisateur peut identifier des sites de liaison potentiels (site active) au récepteur qui ont une région active pour se lier au médicament (ligand).

La troisième étape dite d'amarrage moléculaire (docking wizard) permet de produire les complexes protéines-ligands et ceci à partir des différents algorithmes présents dans le logiciel. Ces algorithmes permettent à la fois de générer des conformations de complexes et aussi de les faire évoluer en utilisant une fonction de score. Cette dernière qui doit être toujours minimisé pour effectué une optimisation de géométrie est d'obtenir une structure correspondant (ou similaire) à sa géométrie naturelle. La quatrième phase de cette étape de préparation, consiste à sélectionner/trier et regrouper les scores. Cette étape est connue sous le nom «clustering». Il s'agit de faire ressortir des conformations représentatives, appelée : poses. Résumé de tous les étapes citées sous dessus montre dans le **Figure 14**.

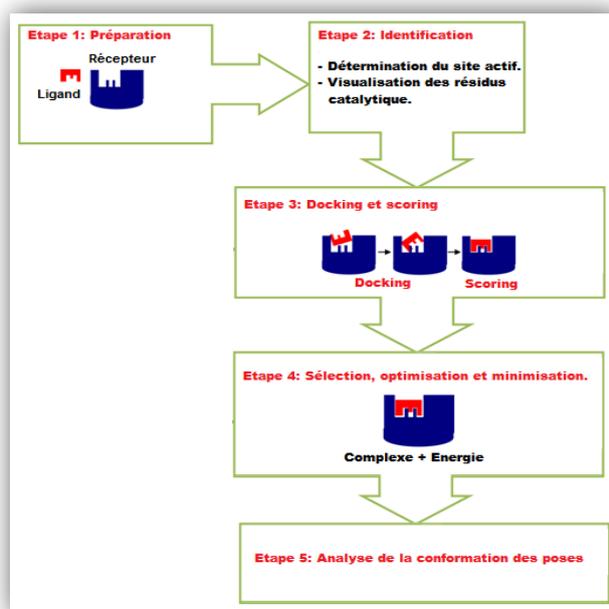


Figure 14 : Les étapes du Docking moléculaire par logiciel MVD.

3.4.1. Détection des cavités

MVD comprend un outil pour la détection de cavités dans la protéine (**Figure 15**).

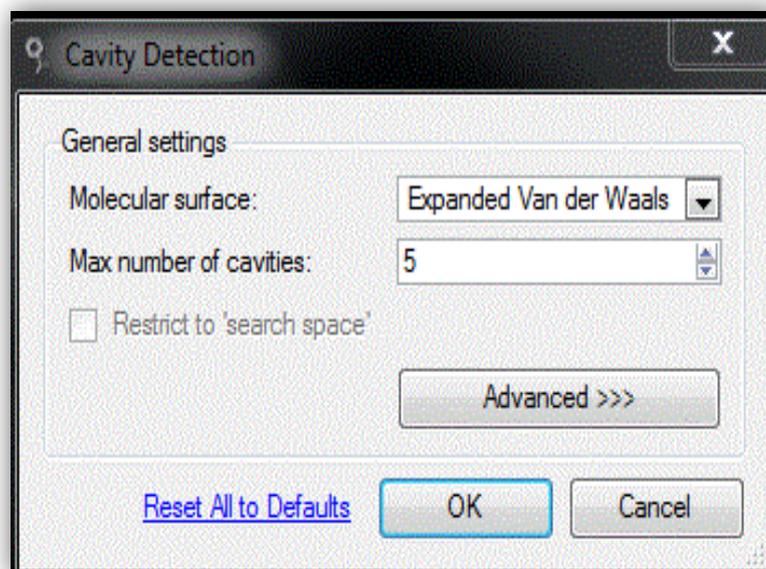


Figure 15. Paramètre utilisé pour la détection des cavités.

Cet outil se base sur un système de grille fonctionne comme suit :

D'abord une grille tridimensionnelle d'espacement fixée à $0,8\text{\AA}$, ayant les mêmes dimensions maximales de la protéine selon les axes X Y Z est construite suivant la structure de la molécule. Pour chaque point de la grille si la distance entre la protéine et l'atome lourd le plus proche (hydrogène) est inférieur ou égale $1,2\text{\AA}$, le point est placé comme occupé dans le cas contraire le point sera classé comme libre. Ensuite les points libres sont effacés en partant de l'extérieur de la grille vers la surface de la protéine jusqu'à ce le nuage de point restant ait une largeur maximale prédéfini par l'utilisateur. Chaque nuage de point non effacé représente une cavité pour reproduire au mieux les dimensions du site actif dans la simulation (Basilio, 2009).

Dans notre travail, nous avons détecté par le biais de cet algorithme, cinq cavités pour la 4B82, 7MAZ, qui sont illustrés respectivement par les **Figure 16**.

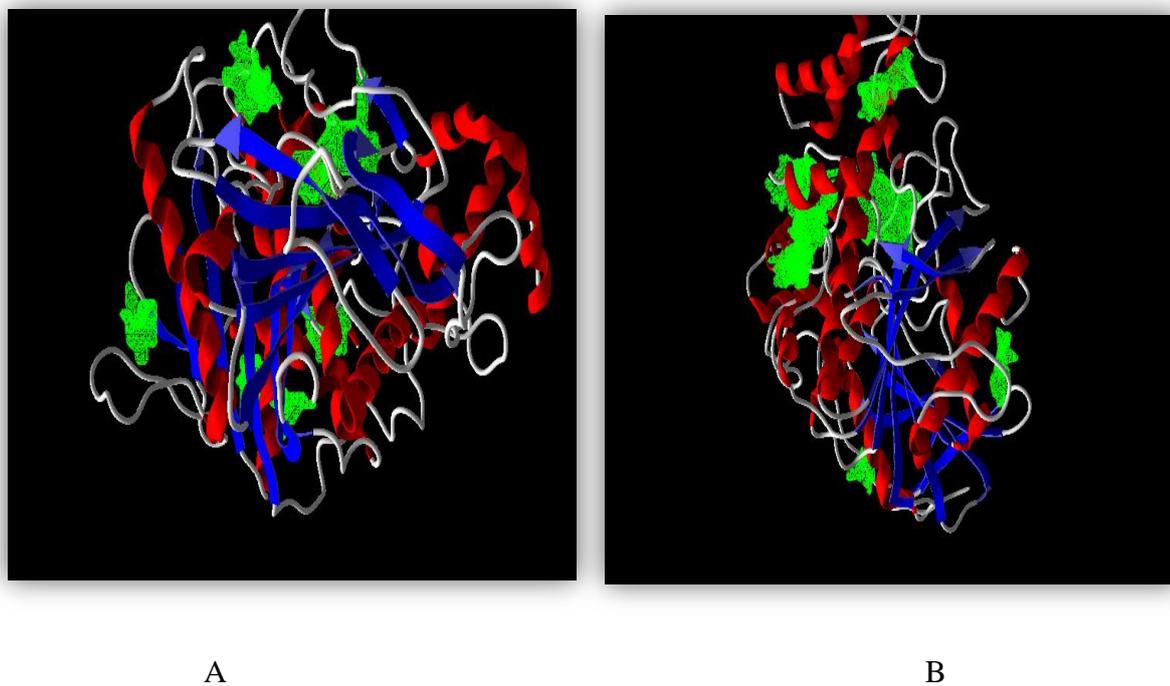


Figure 16. Illustration des 5 cavités de chaque enzyme détectées (en vert) par MVD
 A : Cavités détectées (en vert) dans l'enzyme ACHE (4B82) ; B : Cavités détectées (en vert) du BuChE (7AMZ).

Les cavités détectées pour les deux enzymes sont classées selon leur volume dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Les cavités détectées pour chaque enzyme cholinestérase (4B82, 7AMZ)

Cavité	4B82		7AMZ	
	Volume (Å ³)	Surface (Å ²)	Volume (Å ³)	Surface (Å ²)
Cavité 1	281,624	587,52	438,272	1310,72
Cavité 2	133,632	367,36	426,4	846,08
Cavité 3	97,28	300,8	72,192	282,88

Cavité 4	64	202,24	38,4	157,44
Cavité 5	37,888	154,88	32,768	101,12

3.4.2. Fonction de score

Fonctions de score Les méthodes de « scoring » permettent d'évaluer l'énergie de liaison du complexe formé et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra d'une part de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées, mais également de classer la meilleure pose de différents ligands pour identifier les meilleurs d'entre eux. Dans les programmes de docking, on trouve différents types de fonction de score : celles utilisant un champ de force de mécanique moléculaire, celles reposant sur les connaissances actuelles et les méthodes empiriques et knowledge-based (Boucherit, 2012) .

3.4.2.1. Fonctions de score basé sur les champs de force

Les fonctions de score basées sur un champ de force calculent, par mécanique moléculaire, l'énergie d'interaction du complexe récepteur-ligand (interactions intermoléculaires) et l'énergie interne du ligand. Les interactions entre récepteur et ligand comprennent souvent des termes de Van der Waals et électrostatiques. L'énergie interne du ligand est généralement écrite de manière similaire .Les fonctions de score qui se basent sur les champs de force sont par exemple : Gold score, DOCK et Autodock (Kitchen *et al.*, 2004).

3.4.2.2. Fonctions de score empiriques

Tentent d'ajuster le résultat à des données expérimentales (telles que les énergies de liaison, des informations structurales par rayons X) elles même approximées par une somme de termes non corrélés. Cette méthode offre.

L'intérêt d'un calcul plus simple, mais dépendant des données utilisées. D'autres part, les termes d'interactions non liées peuvent être traités de manières très différentes : par exemple, distingue des termes de liaisons hydrogène neutres ou ioniques alors que d'autres (comme Chem Score) ne font pas de différence. Certaines fonctions traitent les effets de solvation et désolvation, comme la fonction de Fresno par Exemple (B rut, 2009).

3.4.2.3. Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based »

Ces fonctions de score sont construites à partir de règles fondées sur une analyse statistique des complexes protéine-ligand résolus expérimentalement. La fonction PMF (Potential of Mean Force) fait partie de cette classe de fonction (Chikhi, 2007).

Chapitre 4:

Résultats et discussion

Maladie d'Alzheimer est une pathologie neuro-dégénérative, constituant la forme la plus fréquente des démences. Le processus neurodégénératif entraîne des anomalies de la neurotransmission a été associée aux deux cholinesterase (ChEs), plusieurs études ciblant l'inhibition de ces deux enzymes.

Le fait que les deux ChEs ont des caractéristiques structurales différentes et que le site anionique et le site catalytique de l'enzyme sont tous les deux différents, à cause de le dernier ChEs ont des caractère structurales différents et que le site catalytique de l'enzyme sont tous les deux différentsn.n plus le ligand interagit du différents composés lesquels ce sont le paclitaxel et pyrazinamide à l'aide de docking moléculaire pour comparer l'affinité de l'interaction entre les enzymes cholinergique ses AChE et BuChE ligands Paclitaxel et ligands référence .

Début, docking moléculaire est basé sur l'importation de la cible enzymatique ainsi que le ligand, dans l'espace de recherche du MVD. Cette procédure vient après une étape de préparation préliminaire, qui permet de vérifier et de s'assurer que les propriétés structurales de chaque espèce sont prises en compte par le logiciel.

L'inhibiteur sera orienté vers la cavité qui est déjà localisée, à partir du protocole MDV. Ce résultat permet de classer les meilleures poses en se basant sur leurs énergies d'interactions obtenues par le «MolDock score». Après que le logiciel prédit les poses en utilisant la fonction MolDock score plusieurs termes d'énergie supplémentaires peuvent être calculés. Tous ces termes sont par la suite stockés pour une étude ultérieure.

Chacun des complexes optimisés en utilisant la fonction de score Rerank Score présente dans le logiciel MVD. La plupart des poses sélectionnées correspondent à des poses fortes. On note que les scores MolDock et Rerank sont les meilleurs scores (**Tableau 4**) pour la même pose pour lesquels les calculs semblent stable.

4.1. Etude des interactions entre PTX et AChE

L'analyse les résultats de cette étude la meilleure pose montre que la meilleure énergie est obtenu quand Paclitaxel est docker dans la cavité 1 de l'AChE (**Tableau 4**), avec une affinité de -110,103 kcal mol⁻¹ et 106,444 kcal mol⁻¹ basé sur les deux fonctions de score : MolDock Score et Rerank, respectivement. Il convient de noter que cette cavité est située au voisinage du site actif.

Tableau 4. Energies d'interaction (Kcal mol) des cinq poses obtenues pour chaque cavité d'ACHÉ (4B82).

Cavité	Mol Dock score	Rerank score	H-bond	Interaction
Cavité 1	-110,103	106,444	-5,65802	-250,303
Cavité 2	-94,7753	46,0111	-5,87273	-248,225
Cavité 3	-89,0918	149,039	-3,29067	-223,066
Cavité 4	-68,4932	137,19	-3,27064	-211,585
Cavité 5	-59,3387	154,23	-5,58798	-199,51

Le programme Molegro virtuel Docker confirme parfaitement ce résultat en fournissant une énergie d'interaction égale à -110, 103 Kcal/Mole. Cette énergie résulte de la mise en place de cinq liaisons hydrogène (**Figure 17**). L'obtention des résultats a été illustrée dans le **Tableau 5** qui présente les longueurs et les orientations spatiales des différentes liaisons hydrogène.

Tableau 5. Présentation des différentes liaisons hydrogènes.

N° liaison hydrogène	Résidus impliqué	Groupe du ligand	Distance Å°
1	Ser 125	OH (14)	3,40
2	Glu 202	OH (12)	3,06
3	Tyr 337	OH (15)	3,27
4	Tyr 124	OH (13)	2,63
5	Ph 295	OH (14)	2,28

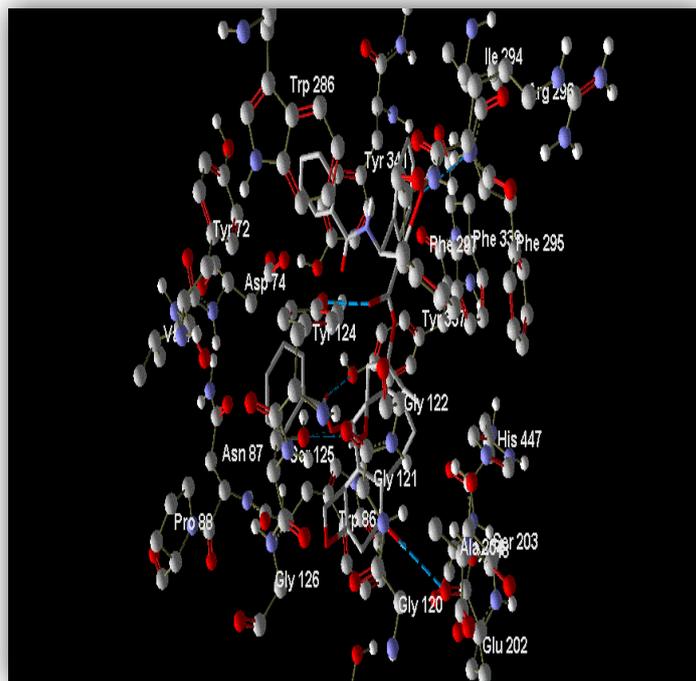


Figure 17. Les liaisons hydrogènes entre PTX et les résidus du site d'interaction par MVD.

..... : Interaction de type hydrogène

4.2. Visualisation les interactions PTX-l'ACHE

L'observation visuelle mise en évidence les plus importante liaisons hydrogène (**Figure 18 A**) entre la fonction hydroxyle de Paclitaxel en position 30 et la fonction amine du résidu Ser 125 et Glu 202. Ces liaisons sont présentées par les deux des acides aminés de la triade catalytique. Ces derniers induits des changements conformationnel au niveau spatial des résidus catalytiques, notamment dont l'orientation change. Ce résultat conforte l'idée que la fixation de l'inhibiteur sur ce résidu est bien responsable de l'inhibition de l'enzyme. Le complexe formé (**Annexe 1**) est stabilisé au sein de la **cavité 1** de l'**AChE** par des interactions stériques (**Figure 18 B**) par les résidus suivants : His 447, Tyr 337, Tyr 341, Tyr 124, Phe338, Phe 297, Phe 295, Gly 120, Gly 121 , Gly 122, Trp 86 , Glu 202 .

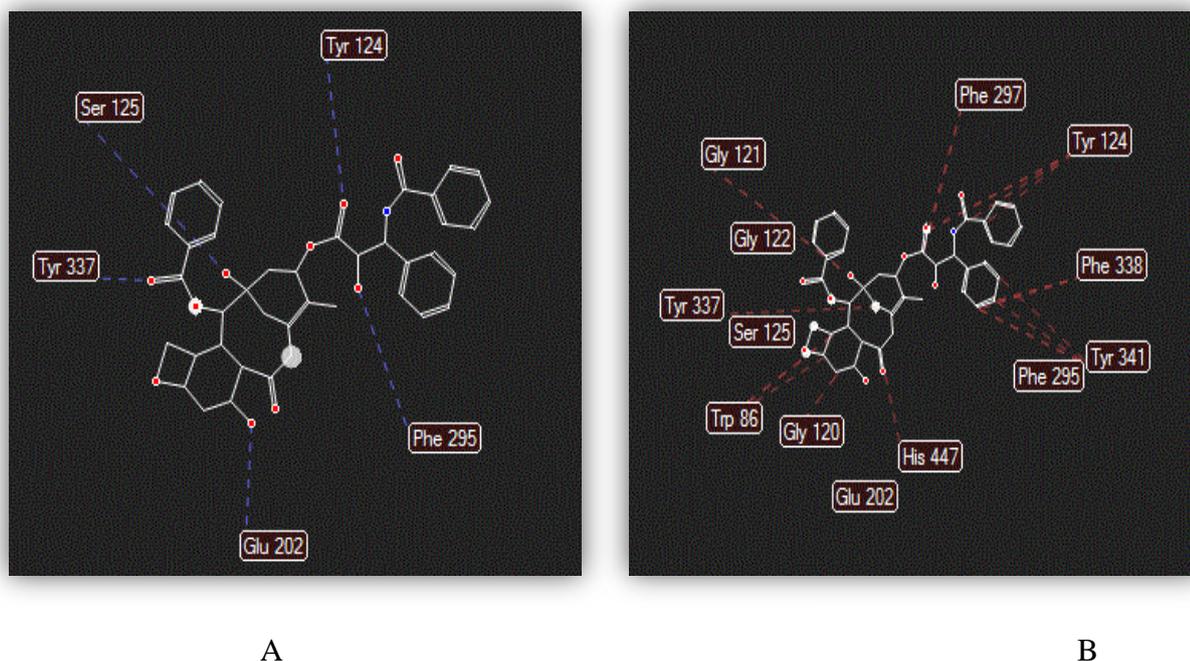


Figure 18. Le type liaison hydrogène et stérique entre PTX et ACHE produisant par le logiciel MVD.

A : Les liaisons hydrogène présentent par un trait bleu discontinue.

B : Les liaisons stériques présentent par un trait rouge discontinue.

4.3. Etude des interactions entre PTX et BuChE

Le tableau suivant présente de la meilleure pose montre que la meilleure énergie est obtenue quand PTX est docké moléculaire dans la cavité 1 située au voisinage du site actif de la BuChE (**Tableau 6**), avec une affinité de $-50,8089$ kcal mol⁻¹ et $42,0218$ kcal mol⁻¹ basé sur les deux fonctions de score : MolDock Score et Rerank, respectivement.

Tableau 6. Energies d'interaction (Kcal-mol⁻¹) des 05 poses obtenus pour chaque cavité de BuChE (7AMZ).

Cavité	Mol Dock score	Rerank score	H-bond	Interaction
Cavité 1	-50,0833	42,0218	42,0218	-202,873
Cavité 2	-46,5122	40,3987	40,3987	-194,618
Cavité 3	-39,4566	57,5108	57,5108	-172,879
Cavité 4	-33,9706	42,0108	42,0108	-178,693

Cavite 5	-26,1843	79,8458	79,8458	-153,971
----------	----------	---------	---------	----------

On couche sur le logiciel ‘show only top » pour obtenir meilleur énergie de score.

4.4. Visualisation les interactions PTX- BuChE

La visualisation de résultat du Docking moléculaire réalisée montre que cet inhibiteur (Paclitaxel) interagit sélectivement avec les résidus du site actif du BuChE (**Annexe 2**). Ce complexe formé est stabilisé au sein de BuChE par des interactions hydrogènes entre l’inhibiteur et les acides aminés : Glu 238 (2,6 Å°), Tyr 396 (3,13 Å°), Ser 287 (2,45 Å°), Thr 284 (2,63 Å°), Ala 229 (3,05 Å°) Ala 232 (2,8Å°), Val 233 (3,32 Å°). Paclitaxel établit également deux interactions stérique par les acide amine suivant : Pro 230 et Leur286 (**Figure19**).

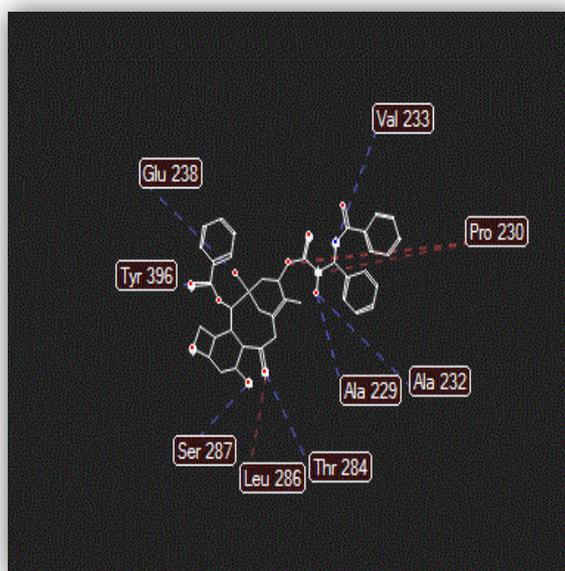


Figure 19. Le type liaison hydrogène et stériques entre PTX et BuChE, produisant par le logiciel MVD.

..... : Interaction de type hydrogène : Interaction de type stérique

Selon l'article de (Daoud *et al.*, 2015) une étude d'inhibition *in silico* des deux enzymes ChEs par un alcaloïde « Pyrazinamide » a été réalisée selon les étapes suivantes :

Après la détection des cavités du site de liaison et la simulation de docking ont été réalisées à l'aide d'un logiciel de docking, à savoir Molegro Virtual Docker (MVD) superpositions du Cholinestérase humaine AChE (**PDB ID : 1EVE**), et BuChE (**PDB ID : 1P0P**).

Le docking doit être des ligands flexible qui été sélectionnés pour effectué dans le site actif des ChEs. Cinq poses supérieures pour chaque ligand ont été retournées dans la simulation, parmi lesquelles une meilleure pose pour chaque ligand a été sélectionnée sur la base de MolDock Score qui on obtenue -179,586 Kcal /mol pour complexe AChE (1EVE) - Pyrazinamide (L3) et pour BuChE (1POP) et pyrazinamide on a mené -155,428 Kcal/mol (Daoud *et al.*, 2015).

Les résultats montrent que les résidus du site actif prouvent qu'un certain nombre de liaisons hydrogène sont impliquées dans l'interaction entre les ligands sélectionnés (L3) de pyrazinamide avec le récepteur des ChEs . Il est révélé que le L3 réalise quatre interactions par liaison hydrogène au niveau de la gorge du site actif de l'enzyme (1EVE). On trouve quatre liaisons inter-hydrogène formées entre les acides aminés Tyr121 (3.09Å), Ser 200 (2.85Å), His440 (3.07Å), Gly118 (2.75Å) et L3.

On remarque que les valeurs obtenues des distances des liaisons hydrogène entre le L3 et les résidus du site actif appartiennent à l'intervalle $2,5\text{Å} \leq x \leq 3,1\text{Å}$. Ces résultats indiquent que la forte affinité de L3 sur 1EVE pourrait conduire à l'inhibition puissante de l'activité catalytique de l'enzyme (Daoud *et al.*, 2015).

Le L3 réalise deux interactions par liaison hydrogène au niveau de la gorge du site actif de l'enzyme (**1POP**). Nous avons trouvé quatre liaisons inter-hydrogène formées entre les acides aminés Tyr332 (2.93Å), His438 (2.92Å) et L3. De même nous avons noté que les distances des liaisons hydrogène appartiennent à l'intervalle $2.5\text{Å} \leq x \leq 3.1\text{Å}$, ceci confirme que L3 possède une forte interaction avec le site actif de **1POP**.

Selon l'article de (Byeongyeon *et al.*,2017) l'étude les dérivés de la 3,4-dihydroquinazoline (8b, 8d) inhibent les activités acétylcholinestérase et Butyrylcholinestérase a mol Le score MolDock de 8b et 8d avec hAChE (**4EY7**) s'est avéré être -152,4 et -160,4 kcal/mol, respectivement, et était inférieur à celui le score MolDock de 8b et 8d avec hBuChE (**4TPK**) a été trouvé à -195,4 et -199,5 kcal/mol, respectivement, deux valeurs supérieures à celle (-133,8 kcal/mol). En tant qu'agent sélectif inhibiteur de hAChE, suggérant une plus faible affinité de liaison de ces composés à l'enzyme hAChE que BuChE.

La ChE a été calculée à l'aide de l'utilitaire Pose Viewer de MVD. Les interactions globales entre les acides aminés dans la gorge du site actif de chaque ChE avec la pose proposée pour chaque composé. Le site catalytique de l'AChE se compose de deux sous-sites : le site estératique et le site anionique. Dans le site estératique, une triade catalytique

constituée de Glu 334, His 447 et Ser 203 forme un réseau planaire. Dans le site anionique, le Trp86 se lie au groupe triméthylammonium de l'ACh. Dans l'ensemble site catalytique, le substrat est bien placé pour être hydrolysé en acide acétique et en choline.

Dans le cas de l'AChE, le composé 8b a présenté des interactions stériques avec Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286, Phe295, Phe297, Phe338 et Tyr341 dans le site actif de l'AChE. Ça aussi formé cinq liaisons hydrogène entre l'atome d'azote du cycle 3,4-dihydroquinazoline avec Tyr124 (2,17 Å). Le composé 8d a montré stérique interactions avec Tyr72, Asp74, Leu76, Tyr124, Trp286, Ser293, Phe295, Phe297, Phe338, Tyr341, et His447 (triade catalytique) dans le site actif de l'AChE. Il a également formé cinq liaisons hydrogène entre l'atome d'oxygène de l'amide avec Tyr341 (3,29 Å) et (2,60 Å), Phe295 (3,00 Å). En ce qui concerne Docking avec l'enzyme BChE, le composé 8b a présenté des interactions stériques avec Asp70, Trp82, Thr120, Gly116, Pro285, Met437 et Tyr332 dans le site actif de BChE. Il a également formé deux liaisons hydrogène (2,15 Å et 3,52 Å respectivement). Le composé 8d présentait l'interactions stériques avec Asn68, Asn83, Trp82, Thr120, Pro285, Leu286 et His438 (triade catalytique) dans le site actif de l'enzyme, His438 (triade catalytique, 2,61 Å). Le type de liaisons hydrogène entre les deux enzymes acétylcholinestérase et 8b et 8d sont des interactions moyennes.

Dans l'article publié par (Srikanth *et al.*, 2021) qui étudie la cible de la maladie d'Alzheimer est l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. Les coordonnées cristallines aux rayons X de l'AChE (PDB ID : 4bdt) et de la BChE (PDB ID : 6eqq) ont été obtenues auprès de la Protein Data Bank. La plante médicinale a été extraite de la base de données des composés PubChem au format mol. Les standards Donepezil, Rivastigmine, Galantamine, Mémantine ont été obtenus à partir de la banque de médicaments au format mol pour la comparaison. Il a été analysé à partir des paramètres d'ancrage que les constituants phyto du Panaxginseng ont montré une basse activité anti-Alzheimer par rapport à celle des médicaments standard. Logiciel Molegro Pour l'AChE, le score de Moldock de Boreol montre -44,82 Kcal/mol. Pour le BuChE, le Borneol présente un score Moldock de -48,53 Kcal/mol.

4.5. Comparaison entre ligand Paclitaxel et ligands référence

les résultats obtenus montre que meilleur énergie de complexe AChE - L3 (-179,586 Kcal / mol) et complexe AChE - dérivés 8b et 8d sont avéré être (-152 Kcal /mol et -160,4 Kcal / mol) respectivement ensuite énergie de complexe entre AChE - PTX (-110,103 Kcal / mol) donc le L3 est le meilleur inhibiteur que dérivés 8b et 8d et Paclitaxel par contre le

complexe BuChE (4TPK) avec dérivé 8b et pour 8d est (-199,5 kcal / mol) c'est le meilleur énergie pour BuChE et ligands par rapport l'énergie de liaison BuChE- L3 (-155.428 Kcal / mol) vers au BuChE - Paclitaxel (-50,8098 Kcal / mol) après cela mené (-48.53 Kcal / mol) pour complexe borneol – BuChE . En ce qui concerne la liaison d'hydrogène. Ce résultat montre que le Paclitaxel possède une énergie de liaison capable fait une inhibition important pour AChE humaine.

Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence d'une nouvelle molécule thérapeutique dans le domaine de la pathologie de la maladie d'Alzheimer, en utilisant le moyen de simulations bioinformatiques. Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à l'inhibition de deux enzymes de cholinestérase nommée acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BuChE) qui sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer, et pour cela on a utilisé Paclitaxel isolés à partir de *Taxus brevifolia*. Pour étudier la capacité de ce produit, nous avons utilisé le Docking moléculaire pour expliquer les interactions et le type d'inhibition. Les résultats du docking montrent que Le Paclitaxel s'avère être le meilleur inhibiteur car il forme le complexe le plus stable avec l'acétylcholinestérase que le butyrylcholinestérase qui nous avons obtenues les valeurs d'énergies de score suivants -110,103 Kcal/mol et -50,8098 kcal/mol. les acides aminés qui obtenues après l'interactions entre paclitaxel-AChE (4B82) sont Tyr124 Tyr 337 , Glu 202,Phe 295 à des liaisons hydrogènes ,en ce que concerne le paclitaxel-BuChE(7AMZ) on trouve les acides aminés suivants : Glu 238 , Arg 242 , Thr 284 ,Trp 231 à des liaisons hydrogènes.

La base de ces résultats préliminaires, nous envisageons d'approfondir notre étude, en faisant appel à d'autres programmes d'étude de docking et de simulation *in silico* de molécule Paclitaxel. Notre étude ici n'étant qu'initiale, une étude expérimentale complémentaire *in vitro* et/ou *in vivo* devra permettre de vérifier les résultats théoriques obtenus *in silico*.

Bibliographie

Arpigny J., Jaeger K. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochemical Journal* 343: 177-183.

B rut M. 2009. Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques. Thèse Doctorat 44p .

Basilio E. 2009. Simulations moléculaires appliquées à l'acétylation de flavonoïdes catalysée par des lipases. Thèse Doctorat .104 p.

Bocquené G. 1996. l'acetylcholinesterase, marqueur de neurotoxicite. application a la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes lluants chez les organismes. Thèse doctorat. 26 p .

Bouchagra S. 2018. Modelisation Des Interactions proteine petites molecules : etude de la relation structure-fonction dans le cas des lipases. Thèse doctorat, université badji mokhtar-annaba.

Boucherit H. 2012. etude theorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la methionine aminopeptidase de mycobacterium tuberculosis par diverses molecules . Thèse magistère, 11 pages .

Chikhi A. 2007. Calculs et modélisations des interactions peptide deformylase – substances antibactériennes a l'aide de techniques de « docking » (arrimage) moléculaire. Thèse doctorat ,Université Mentouri Constantine, Algérie, 90 p.

Colletier P. 2006. Etude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acetylcholinesterase. Thèse doctorat ,université josph Fourie, 5 p.

Daoud I ., Bouarab S., Ghalem S . 2015. Docking, dynamic simulation and quantum mechanics studies of pyrazinamide derivatives as novel inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Der Pharma Chemica* 7(9) : 307-321.

David ., Kohler P., Goldspiel D . 1994. paclitaxel (Taxol). *photochemistry* , 14 (1): 3-34.

Fontanet M. 2019. le repérage de la maladie d'Alzheimer en médecine général. Thèse de doctrat, marseille.

Gaucher G. 2009. Mise au point de nanoparticules polymères pour l'administration parentérale d'agents anticancéreux hydrophobes. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutique, université de Montréal, 4p.

Jacques P. 2006. etude des relation structure- dynamique fonction au sein de l'acetylcholinesterase. Thèse doctorat, universites Joseph Fourier ,Grenble, 11 p.

Kingston ., Davide G.I . 2011. Taxol, a molecule for all seasons. *The Royal Society of Chemistry* , 867–880.

- Kitchen D. B., Decornez. H ., Furr J ., Bajorth J . 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery : methods and applications. *Drug discovery* . 3 : 935-949.
- Kern P., Ong JM., Saffari B., Carty J. 1990. The effects of weight loss on the activity and expression of adipose-tissue lipoprotein lipase in very obese humans. *The New England Journal of Medicine* 322: 1053-1059.
- Laurent L . 2011. la prise en charge Thérapeutique de la maladie d'Alzheimer des démences apprennées .Thèse doctorat.
- Lucie M . 2013. les difficultés rencontrées lors du développement de nouvelles molécules thérapeutiques dans l'indication de la maladie d'alzheimer. Thèse doctorat ,université de lorraine, 30 p.
- Marie C. 2013. Caractérisation des oligomères β -amyloïdes cérébraux et vasculaires impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Thèse doctorat Neurosciences ,université de bordeaux, 47 p.
- Pascoin A ., Federico B ., Areas F ., Camps I . 2018. In silico development of new acetylcholinesterase inhibitors. *Biomolecular Structure and Dynamics* , 1-16.
- Pierre, V. 2009. intérêt pharmaceutique du genre Taxus et des Taxanes ; culture in vitro et dosage. Thèse doctorat, université henri poincaré, nancy, 39 p.
- Press H. 2008. *Methods in molecular biology* , Vol .433 , Springer. *Molecular Modeling of Proteins* , Springer. 365 p.
- Roger M ., Lane M ., Steven G ., Albert E . 2004. Acetylcholinesterase and Its Inhibition in Alzheimer Disease. *Clin Neuropharmacol* 27:141-149.
- Sanson B. 2009. La dynamique structurale de l'acétylcholinestérase:étude réalisée par cristallographie aux rayons X et une méthode spectroscopique complémentaire. Thèse doctorat ,Université Joseph-Fourier - Grenoble I, France, 21 p.
- Srikanth J ., Geetha T.,Logesh K ., Keerthi . 2021. Comparative Molecular Docking Analysis of Phytoconstituents against Alzheimer's Disease Targets- An In-Silico Approach. *Research in pharmaceutical sciences* , 1579-1589.
- Stéphanie S. 2005. Approches de synthèse du tricyclic du taxol . Thèse doctorat , France ,17 p .
- Lauwerys R . 1999. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles : Insecticides organophosphorés. 4^{ème} édition, Paris: Masson, pp. 774-782.
- Vallata P. 2009. intérêt pharmaceutique du genre taxus et des taxanes ; culture in vitro et dosage. Thèse doctorat ,université henri poincaré, nancy ,37 p.

Vandendriessche X. 2016. Maladie d'Alzheimer : Rôle du pharmacien d'officine dans la prise en charge, université de Lille, France, 75 p.

Yann L. 2015. Synthèse et évaluation biologique de mimes du Paclitaxel dérivés de la proline . Thèse doctorat , 75 p .

Site web:

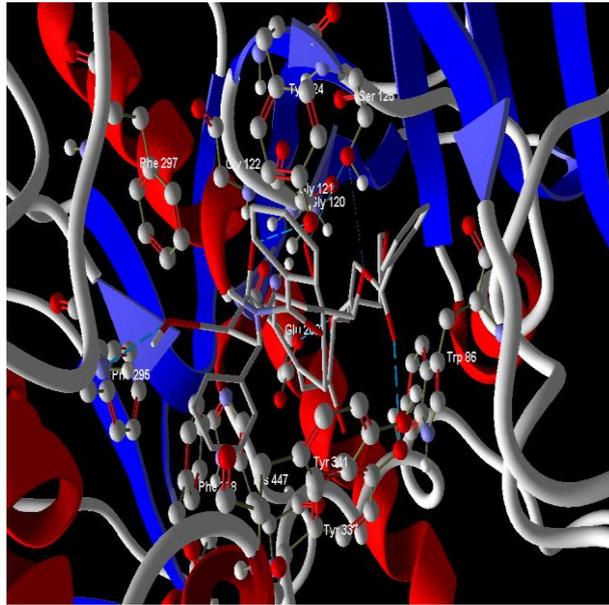
Site web 1: <https://memoireltp.wordpress.com/la-maladie-dalzheimer/>

Site web 2: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

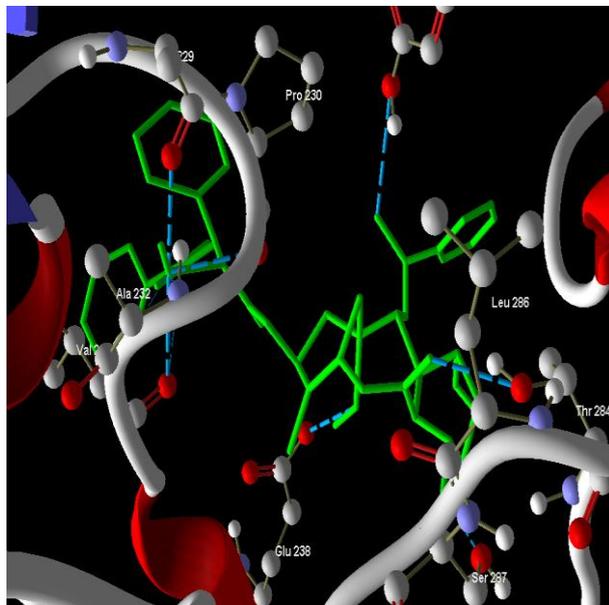
Site web 3: <https://www.rcsb.org/>

Annexes

Annexe 1. Le complexe PTX - AChE .



Annexe 2. Le complexe PTX - BuChE.



Résumé

الملخص

باكليتاكسيل هو أحد شركتي تكساس اللتين تم تسويقهما. في عام 1971 تاركسوس بريفيفوليا تم عزله من لحاء طقسوس المحيط الهادئ ، هذا المركب ذو الأصل القلوي الذي يظهر في نشاط الجسم الحي ضد مرض الزهايمر ، بما في ذلك بشكل أساسي نقص الأسيتيل كولين بسبب إنزيمين كولينستراز أسيتيل كولينستراز (4B82) و بوتيريل كولينستراز (7AMZ). من أجل دراسة نشاط باكليتاكسيل مجهول الهوية على الكولينسترازات المعالجة باستخدام باكليتاكسيل بمساعدة البرمجيات السيليكو . تظهر نتائج الإرساء أن باكليتاكسيل هو أفضل مثبط لأنه يشكل المركب الأكثر ثباتًا مع أستيل كولينستراز أكثر من بوتيريل كولينستراز. التي جلبناها إلى النتيجة التالية قيم الطاقة 110.103- كيلو كالوري / مول و 50.8098- كيلو كالوري / مول. يتم تثبيت هذا المركب المتكون داخل AChE عن طريق تفاعلات الهيدروجين بين المانع والأحماض الأمينية التالية: Ser 125 ، Glu 202 ، Tyr 337 ، Tyr 124 ، Phe 295 . ، فيما يتعلق بـ Paclitaxel-BuChE ، نجد الأحماض الأمينية التالية: Glu 238 ، Arg 242 ، Thr 284 ، Trp 231 في روابط الهيدروجين ، هذه الدراسة التجريبية الإضافية في المختبر و / أو في الجسم الحي يجب أن تجعل من الممكن التحقق من النتائج النظرية التي تم الحصول عليها في السيليكو.

الكلمات المفتاحية: باكليتاكسيل ، ألزهايمر ، السيليكو ، أستيل كولينستراز ، بوتيريل بوتيريل كولينستراز

Résumés

Le Paclitaxel est un des deux texanes commercialisés. En 1971, il est isolé à partir de l'écorce de l'if du Pacifique, *Taxus brevifolia*, Ce composé d'origine alcaloïde a démontré une activité *in vivo* contre maladie d'Alzheimer . Dans le but d'étude l'activité anonymement de Paclitaxel sur les Cholinestérase pour traitées Alzheimer basé sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (4B82), et butyrylcholinestérase (7AMZ). à l'aide *in silico* le logiciel Docking moléculaire. Les résultats du Docking montrent que le Paclitaxel que s'avère être le meilleur inhibiteur car il forme le complexe le plus stable avec l'acétylcholinestérase que le butyrylcholinestérase. qui nous avons amené les valeurs d'énergies de score suivants -110,103 kcal/mol et -50,8098 kcal/mol. Ce complexe formé est stabilisé au sein de AChE par des interactions hydrogènes entre l'inhibiteur et les acides aminés suivent : Ser 125, Glu 202, Tyr 337, Tyr 124, Phe 295, en ce que concerne le Paclitaxel-BuChE on trouve les acides aminés suivants : Glu 238, Arg 242, Thr 284, Trp 231 à des liaisons hydrogènes, cette étude expérimentale complémentaire *in vitro* et/ou *in vivo* devra permettre de vérifier les résultats théoriques obtenus *in silico*.

Mots clés : Paclitaxel, Alzheimer, *in silico*, Acétylcholinestérase, Butyrylcholinestérase

Abstract

Paclitaxel is one of the two Texanes marketed. In 1971, it is isolated from the Pacific IF Bark, *Taxus Brevifolia*, this alkaloid compound demonstrated *in vivo* activity against Alzheimer's disease. In order to study the anonymous activity of paclitaxel on the cholinesterase for treated Alzheimer based on the inhibition of acetylcholinesterase (4B82), and butyrylcholinesterase (7amz). Using *in silico* molecular docking software. The results of the docking show that the paclitaxel that proves to be the best inhibitor because it forms the most stable complex with acetylcholinesterase than butyrylcholinesterase. Who we brought the following score energy values -110,103 kcal / mol and -50,8098 kcal / mol. This trained complex is stabilized within ACH by hydrogen interactions between the inhibitor and amino acids follow: Ser 125, GLU 202, TYR 337, TYR 124, PHE 295, in that the Paclitaxel-Bache are the acids. The following amino: GLU 238, ARG 242, THR 284, TRP 231 At hydrogen bonds, this complementary experimental study *in vitro* and / or *in vivo* will have to verify the theoretical results obtained *in silico*.

Key words: paclitaxel, Alzheimer, *in silico*, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.

