

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN

Faculté des Sciences -Département De Chimie

Laboratoire Des Substances Naturelles et Bioactives

THESE

Présentée par : **M^{me} HASSANI Née ABDELLI Imane**

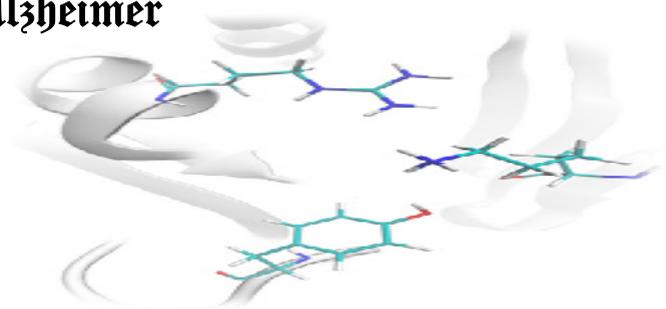
En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

en Chimie Physique

Option : Chimie Théorique et Modélisation Moléculaire

Thème

Etude de la Structure de la β -Secretase et de ses Interactions avec des inhibiteurs par Modélisation Moléculaire : Cas de la Maladie d'Alzheimer



Soutenue le : Le / / 2012, devant le jury composé de :

Président :	M. Boufeldja TABTI	Professeur Université ABOU BEKR BELKAID, TLEMCEN
Examineurs :	M. Mohamed KAMAL	Professeur Université ROI ABDULAZIZ, JEDDAH
	M. Chawki ZIANI-CHERIF	Professeur Université ABOU BEKR BELKAID, TLEMCEN
	Mme. Meriem BENYAROU	MCC. Université ABOU BEKR BELKAID, TLEMCEN
	M. Mohamed BEGHALIA	MCC. CENTRE UNIVERSITAIRE, RELIZANE
Directeur de thèse :	M. Said GHALEM	Professeur Université ABOU BEKR BELKAID, TLEMCEN

Année universitaire 2011/2012

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) et au Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales CERMAV- CNRS Grenoble - France.

Je remercie le Professeur Redouane BORSALI, directeur du CERMAV- CNRS de m'y avoir accueilli, ainsi que pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions avec enthousiasme et diligence. Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse, votre patience, et vos précieux conseils.

J'aimerais également témoigner de ma gratitude envers Alexandra NURISSOU et Alain RIVET, pour leur contribution à mes travaux de doctorat. Je désire, de plus, souligner à quel point j'ai apprécié leur compagnie et leur soutien en tant que chercheuse au même CNRS.

*C'est avec beaucoup de reconnaissances que je souhaite remercier mon directeur de recherche, **Professeur Saïd GHALEM** Directeur du Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), pour la formation scientifique de qualité qu'il m'a donnée. Sa grande rigueur scientifique et sa passion pour la science m'ont beaucoup appris. Je voudrais aussi le remercier pour le temps qu'il m'a accordé tout au long de ces années ainsi que d'avoir cru en mes capacités.*

Je tiens à remercier Monsieur le Prof. Boufeldja TABTI Université de Tlemcen, je vous suis très reconnaissante aussi d'avoir accepté la présidence du jury de cette thèse. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier Monsieur le Prof Mohamed KAMAL Université Roi Abdulaziz-Jeddah, Monsieur le Prof Chawki ZIANI-CHERIF, Madame le Dr Meriem BENYAROU, Maître de conférences à Université de Tlemcen et Monsieur le Dr Mohamed BEGHALIA Maître de conférences au Centre Universitaire-Relizane, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateurs de cette thèse, me permettant ainsi de bénéficier de leur expertise. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré à juger ce travail et je tiens à leur exprimer ma respectueuse considération.

Je souhaite aussi remercier mes collègues : S.SARI, N. MERAD, N.KHEBICHAT, M. MESMOUDI, I. DAOUD, K. NEGAZ pour m'avoir encouragé durant ces années de recherches et de préparations. Merci d'avoir été là pour me soutenir à tout moment.

Je ne serais jamais parvenue à cette étape majeure de mon cheminement personnel et professionnel, le dépôt de ma thèse de doctorat, sans le support de ma famille et de mes proches.

Liste des Abréviations

AA: Acide aminé

A β : β -amyloïde

AICD: APP Intracellulaire Domaine

Arg: Arginine

APP: La protéine précurseur de l'amyloïde

AS: Aurone synthase

Asn: Asparagine

Asp: Aspartate ou acide aspartique

ATP: Adénosine triphosphate

BACE1: β -site APP Cleaving Enzyme),

CHI: Chalconeisomerase

CHS: Chalconesynthase

DM: Dynamique moléculaire

DFR: Dihydroflavonol 4-reductase

FHT: Flavanone 3-hydrolase

FLS: Flavonolsynthase

FNSI/FNSII: Flavonesynthase

Gln: Glutamine

Glu: Glutamate ou acide glutamique

Gly: Glycine

IC₅₀: Concentration Inhibitrice

IFS: Isoflavonesynthase

LCR: Leucoanthocyanidinreductase 6

LDE: lowestDockedEnergy (énergie minimale du docking)

LDOX: Leucoanthocyanidindioxygenase

Lys: Lysine

MA: Maladie d'Alzheimer

MDE: MeanDockedEnergy (énergie moyenne du docking)

MQ: Mécanique quantique

MM: Mécanique moléculaire

N in C: Num in Clusters

OMS : Organisation mondiale de santé

PDB: Protein Data Bank

PEN-2: La protéine Presenilin enhancer-2

Phe: Phénylalanine

PS1: La protéine Préséniline 1

RIP: Protéolyse Intramembranaire Régulée

ROS: ReactiveOxygenSpecies

Ser: Sérine

SOD: Superoxydedismutase

Thr: Thréonine

Tyr: Tyrosine

ε4: Le gène de l'apolipoprotéine E

(ROO•): Peroxydes

(RO•): Alcoxydes

(O2•-): Superoxydes

(HO•): Hydroxydes

%: Pourcentage

μM: Micro mole/litre

nM: Nano mole/litre

mg : Milligramme

L : Litre

Sommaire

Remerciements

Liste des abréviations

Introduction générale.....01

REFERENCES.....05

I. CHAPITRE I: MALADIE D'ALZHEIMER07

I-1- Généralités sur la maladie d'Alzheimer07

I-2- Statistiques de la maladie d'Alzheimer08

I-3- Historique de la maladie08

I-4- Les 10 signes de la maladie d'Alzheimer.....10

I-5- Les deux formes de la MA.....13

I-5-1- La forme sporadique de la MA13

I-5-1-1- L'âge, le facteur de risque le plus important13

I-5-1-2- L'allèle ApoE413

I-5-1-3- Les autres facteurs de risques14

I-5-2- La forme familiale de la MA14

I-5-2-1-Quatre gènes sont impliqués14

I- 6- Le processus protéolytique d'APP.....16

I- 6-1- La protéine précurseur de l'amyloïde16

I- 6-1-2-APP peut être clivée selon deux voies catalytiques16

I- 7- Le rôle de la cascade amyloïde.....18

I-8- Le complexe γ -sécrétase.....20

I-9-La β -sécrétase, l'enzyme limitant lors de la production d'amyloïde.....	20
I-9-1 L'inhibition de BACE1 représente un potentiel thérapeutique important.....	21
I-9-2 Structure cristallographique de BACE1	22
REFERENCES.....	24
II. CHAPITRE II : FLAVONOÏDES.....	29
II-1- Structure et origine des flavonoïdes.....	30
II-2- Les différentes classes de flavonoïdes.....	33
II-3 - Biodisponibilité des flavonoïdes.....	36
II-4- Implications biologiques des flavonoïdes.....	38
II-5- Application reliées aux activités des flavonoïdes et à leurs esters....	38
II-6- Choix des flavonoïdes.....	40
REFERENCES.....	41
III. CHAPITRE III : METHODES DE MODELISATION MOLECULAIRE DES INTERACTIONS ENZYME-LIGAN.....	46
III-1- Mécanique moléculaire.....	46
III-1-1- Champ de force.....	47
III-1-2- Différents champs de force en mécanique moléculaire	48
II-2- Docking moléculaire.....	50
REFERENCES.....	54
IV. CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES.....	58
IV-1- LES LIGANDS.....	58
IV-2- SYBYL	59
IV-3-LA CIBLE ENZYMATIQUE.....	59
IV-4- AUTODOCK 3.05.....	60

REFERENCES.....	62
V. CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	64
V-1- La démarche à suivre	66
V-1-1- Téléchargement de la β -sécrétase	66
V-2- La procédure AUTODOCK.....	68
V-2-1- Préparation des fichiers	68
V-2-2- Définition des pivots flexibles du ligand.....	69
V-2-3- Calcul des grilles de potentiels.....	69
V-2-4- Recherche des solutions d'amarrage.....	70
V-2-5- Analyse des résultats.....	71
V-3- Résultats du docking moléculaire.....	71
V-3-1- Histogrammes résultants du docking moléculaire.....	71
V-3-2- Les interactions de liaison hydrogène entre les acides aminés du site actif et les ligands (flavonoïdes).....	82
V-4- Les Energies d'interactions (minimales) des complexes des ligands- β -sécrétase.....	99
V-5- Les valeurs des IC_{50} des ligands	101
V-6- Résultats des dimensions de la cavité enzymatique	103
V-7- Calcul de densité électronique.....	105
REFERENCES.....	108
Conclusion générale.....	111

INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle.

La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques, toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles, et, s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments.

Les flavonoïdes sont des composés naturels [1], qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et légumes consommés quotidiennement par l'être humain [2].

En plus de leur rôle dans la pigmentation des végétaux, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêts, telles que des actions anti-radicalaires et antioxydantes.

Leur grande variété de structure (9000 composés identifiés [3-4-5]) et d'activités biologiques (antioxydante, anti-allergique, anti-virale, anti-inflammatoire et inhibitrice) font des flavonoïdes un objet d'étude particulièrement complexe.

Des études ont suggéré que le stress oxydatif a un rôle critique dans la maladie d'Alzheimer (MA) est responsable à la neurotoxicité de β -Amyloïde [6].

Atténuation du stress oxydatif par les molécules anti-oxydantes est proposée comme un traitement thérapeutique potentielle dans la MA [7-8].

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause la plus fréquente de démence chez les personnes âgées [9-10-11]. Elle constitue le principal motif d'entrée en institution et sa survenue dans une famille imprime l'entourage du patient d'une marque indélébile.

Cette maladie survient en moyenne autour de 65 ans et concerne actuellement plus de 30 millions de personnes dans le monde, et ce chiffre va doubler tous les 20 ans, selon un rapport de l'OMS du fait de vieillissement de la population.

INTRODUCTION GENERALE

Les facteurs de protection sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens, la vitamine E, un niveau d'étude élevé et des activités de loisirs. Le diagnostic précoce se base sur les tests neuropsychologiques et l'imagerie cérébrale. Les moyens thérapeutiques concernent les anticholinestérase, les antioxydants (les inhibiteurs de β -sécrétase) [12].

Tous ces arguments justifient le nombre important de recherches dont fait l'objet la MA et incitent à continuer les efforts afin de lui trouver un remède ou, mieux de la prévenir totalement.

L'Association des neurologues algériens, ont souligné que la maladie d'Alzheimer était quelque peu délaissée et vouée à l'échec. Actuellement, compte tenu du nombre de laboratoires de recherches et de l'espérance de vie qui augmente, atteignant les 75 ans en Algérie (elle était de 50 ans en 1960), l'effort est déployé vers la prise en charge des malades atteints de ce syndrome (on estime en Algérie de 100 000 et 120 000 les cas à traiter).

Cette maladie est caractérisée par la présence de dépôts amyloïdes dans les vaisseaux sanguins cérébraux.

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant, sont connues essentiellement pour la protection des parois cellulaires et des vaisseaux sanguins ils sont considérés comme de bons inhibiteurs de la β -sécrétase [13].

Notre travail consiste à étudier l'inhibition de la β -sécrétase, enzyme impliquée dans la maladie d'Alzheimer [14-15] avec une série de flavonoïdes. Cette étude a pour but de diminuer la formation du β -Amyloïde et par suite retarder sa progression.

Afin de rationaliser au mieux les propriétés des flavonoïdes et de déterminer les processus réactionnels impliquant ces composés, nous nous sommes tournés vers les approches de la modélisation moléculaire. Au regard du nombre de publications énoncé ci-dessus, très peu d'études de modélisation moléculaire sur cette famille de substances naturelles ont été réalisées à ce jour. L'intérêt majeur de ces méthodes [16-17], est de permettre la caractérisation des grandeurs électroniques, structurales

INTRODUCTION GENERALE

et énergétiques d'un système moléculaire mais également de permettre l'élucidation des mécanismes d'interactions mis en jeu entre un ligand et son récepteur. La puissance de calcul actuelle des ordinateurs, mise en place pour le calcul scientifique intensif, est telle que des systèmes de plus en plus complexes sont à la portée des utilisateurs. Les méthodes de mécanique moléculaire et de dynamique moléculaire permettent de prendre en compte un nombre très important d'atomes et/ou de molécules. Ceci est particulièrement intéressant pour l'étude dynamique de systèmes complexes. Les processus biologiques des flavonoïdes impliquent très souvent des systèmes moléculaires complexes tels qu'une enzyme. Il est alors possible de simuler le comportement d'une protéine en phase aqueuse, d'analyser l'évolution des conformations du complexe protéine-ligand au cours du temps et de caractériser les interactions hydrophiles et hydrophobes entre le ligand et le récepteur.

Avec le développement des outils informatiques dans les 20 dernières années, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire (assemblage ou arrimage moléculaire) a rapidement investi le domaine de la recherche en biologie. Celui-ci peut être défini comme la recherche du meilleur appariement entre deux molécules. Le docking moléculaire sert à prédire et à reproduire les interactions protéine-ligand [18-19-20] comme il peut servir à l'optimisation de molécules et au criblage de base de données. En pharmacie, la découverte et la mise au point de nouvelles substances médicamenteuses peut passer par le criblage de bases de données avec des millions de composés pour une même protéine cible, ce qui ne serait pas réalisable en biologie classique.

En général, la cible est une protéine et le ligand peut être une petite molécule organique ou une protéine.

L'objectif du présent travail est d'étudier l'interaction β -sécrétase- flavonoïdes par le programme Auto-Dock3, dont on s'intéresse à déterminer le mode d'interaction du complexe (β -sécrétase-inhibiteur) pour la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme, avec une meilleure complémentarité et en calculant l'énergie d'interaction du complexe formé. Le complexe qui a l'énergie d'interaction la plus faible présentera une meilleure activité et par la suite une meilleure inhibition [21-22]. Ces résultats

INTRODUCTION GENERALE

aideront probablement au développement d'un outil thérapeutique efficace pour lutter contre le développement de la maladie d'Alzheimer.

REFERENCES:

- [1] Harbone J. B., Baxter H., Handbook of Natural Flavonoids, **1999**, 2.
- [2] George J. Volikakis, Constantinos E. Efstathiou, Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 551, 124-131.
- [3] Seikel M.K., Geissman (Ed), The chemistry of Flavonoid Compounds, *Pergamon Press*, New York, **1962**.
- [4] Williams C.A., Harbone J.B., Haborn J.B. (Ed)., The Flavonoids-Advances in Research Since 1986, *Chapman and Hall*, London, **1994**.
- [5] Markham K.R., Techniques of Flavonoids Identification, *Academic Press*, London, **1982**.
- [6] Lundkvist J., Näslund J., Gamma-secretase: a complex target for Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Pharmacol*, **2007**, 7, 112–118.
- [7] Commenges D., Scotet V., Renaud S., Jacqmin-Gadda H., Barberger- Gateau P., Dartigues J.F., Intake of flavonoids and risk of dementia, *Eur. J. Epidemiol*, **2000**, 16, 357–363.
- [8] Ko P.C., Kilduff P.T., Higgs J.A, Milberg W., McGlinchey R., Evidence for intact selective attention in Alzheimer's disease patients using a location priming task, *Neuropsychology*, **2005**, 19, 381–389.
- [9] Garant M., Les inhibiteurs du cholinestérase : une nouvelle classe de médicaments, *capsule*, **2002**, 19.
- [10] Orgogozo JM., Forette B., Gamzu E., La maladie d'Alzheimer : 1^{ère} thérapeutique, *Euroconférences*, **7-8 novembre 1998**. Institut Pasteur Paris.
- [11] Henderson A.S., Alzheimer's disease in its epidemiological context, *Acta neurol Scand*, **1993**, 88, 1-3.
- [12] El Kabiri Ait Seddik S., *Neurologie-Psychiatrie- Gériatrie*, **2006**, 6(36), 12-22.

INTRODUCTION GENERALE

- [13] Shimmyo Y., Kihara T., Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activityrelationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1780, 819–825.
- [14] Ghosh A. K., Hong L., Tang J., Beta-Secretase as a Therapeutic Target for Inhibitor Drugs, *Current Medicinal Chemistry*, **2002**, 9, 1135-1144.
- [15] Wolfe M. S., Secretase Targets for Alzheimer’s disease: Identification and Therapeutic Potential, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, 44.
- [16] Doucet J. P., Weber J., Computer-aided molecular design: Theory and applications, *Academic Press*, London, **1996**, 266.
- [17] Dugas H., Principes de base en modélisation moléculaire : aspects théoriques et pratiques, 5^{ème} édition, **2000**.
- [18] Wodak SJ., Janin J., Computer analysis of protein-protein interactions. *J. Mol. Biol*, **1978**, 124, 323-342.
- [19] Salemme FR., An hypothetical structure for an intermolecular electron transfer complex of cytochromes c and b5, *J. Mol. Biol*, **1976**, 102, 563-568.
- [20] Sari S., Medjahed W., Kajima Mulengi J., Ghalem S., Approach of the Interaction Enzyme-Substrate by Molecular Modelling, *Asian Journal of Chemistry*, **2007**, 19(3).
- [21] Abdelli I., Sari S., Ghalem S., Molecular Modelling of Green Tea catechins Inhibitors of Humain Brain Bace 1, *IBSientific Journal of Science*, **2008**, 3(2), 27-29.
- [22] Abdelli I., Sari S., Ziani Cherif C., Ghalem S., Theoretical Study of The Inhibition of beta-secretase, *Asian Journal of Chemistry*, **2007**, 19(7), 5407-5416.

CHAPITRE I : MALADIE D'ALZHEIMER

I-1- Généralités sur la maladie d'Alzheimer

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 [1].

La démence est une maladie dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population [2-3]. La maladie d'Alzheimer serait le type de démence le plus fréquent avec une prévalence hautement âge dépendante [4-5] et on estime qu'elle affecte actuellement 18 millions d'individus à travers le monde. Avec le vieillissement de la population, on estime qu'en 2025 ce nombre pourrait atteindre 34 millions (OMS).

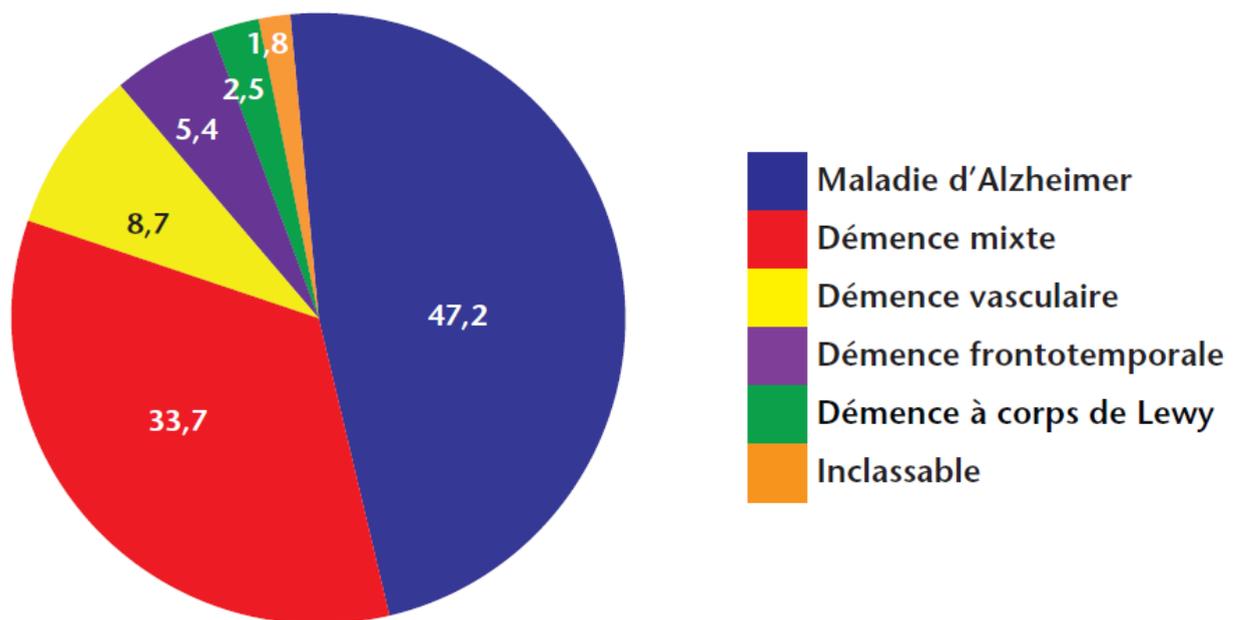


Figure 1 : Type de démence [6]

I-2- Statistiques de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer touche 5% de la population âgée de plus de 65 ans. Selon un rapport de l'OMS [source, ATS 2011].

- Alzheimer et les troubles apparentés touchent plus de **35 millions de personnes** dans le **monde** et ce chiffre "va doubler tous les 20 ans".
- Aux **Etats-Unis** : **4.5 millions** de personnes souffrent de cette maladie.
- En **France** : 880 000 **personnes** souffrent de la maladie d'Alzheimer. dont 30000 sont âgés de moins de 35 ans.
- En **Suisse**, **100'000 personnes** souffrent de la maladie d'Alzheimer.
- En **Algérie**, Deux millions et demi d'Algériens sont âgés de plus de 60 ans. Soit 7,4% de la population générale, présentant le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Jusqu'à alors, 120 000 malades sont dépistés dans le pays.
- Les Femmes sont trois fois plus touchées que les hommes.
- **32000 personnes** plus jeunes, de moins de 60 ans, sont touchées.

I-3- Historique de la maladie

Cette maladie a été identifiée pour la première fois en 1906 par le médecin qui allait plus tard lui donner son nom : le Dr. Alois Alzheimer. Dans un hôpital de Frankfurt, le neuropsychiatre allemand reçut une patiente de 51 ans présentant des troubles de mémoire accompagnés de troubles de compréhension, de comportement, une profonde désorientation, des hallucinations ainsi que des signes de paranoïa. Après la mort de la patiente quelques années plus tard, l'autopsie de son cerveau révéla la présence de plaques denses à l'extérieur des neurones accompagnées d'amas anormaux de fibrilles à l'intérieur des neurones, des lésions qui n'avaient jamais été décrites auparavant.

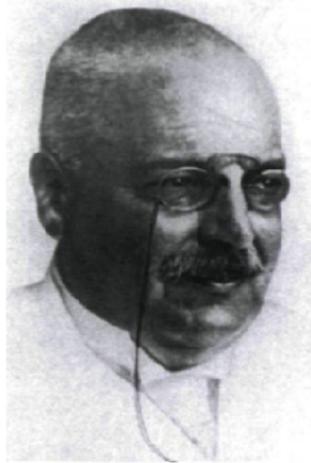


Figure 2 : Alois Alzheimer (1864-1915). Psychiatre allemand ayant caractérisé la neuropathologie de la MA pour la première fois en 1906. Il observe, pendant l'autopsie de sa patiente Auguste Deter, la présence de dépôts intra- et extraneuronaux, soient les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques amyloïdes. Ce médecin est le premier à avoir observé les enchevêtrements neurofibrillaires. Image tirée de Verhey (2009).

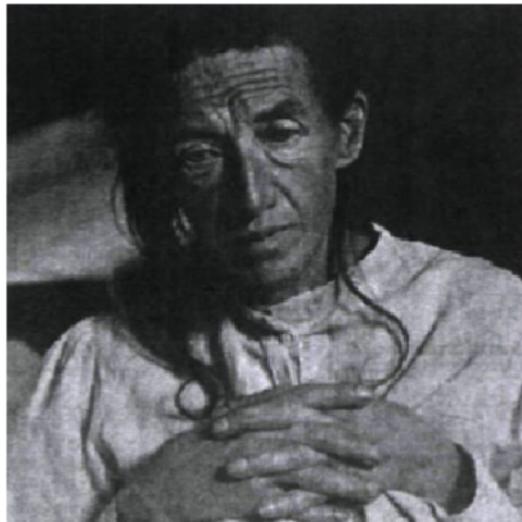


Figure 3 : Auguste Deter. Patiente du Dr Alois Alzheimer internée pour démence. À son autopsie, en 1906, Dr Alzheimer décrit la neuropathologie de la MA. Image tirée d'internet.

Encore aujourd'hui, l'observation de plaques et d'amas fibrillaires par l'autopsie du cerveau est le seul moyen permettant de confirmer un diagnostic de maladie d'Alzheimer. Avec les années, on en a toutefois appris davantage sur la nature réelle de ces lésions et sur la maladie. On sait que les plaques, appelées plaques amyloïdes, sont formées majoritairement par l'accumulation progressive et irréversible d'un peptide de 42 acides aminés, le peptide β -amyloïde ($A\beta$) [7-8]. Les enchevêtrements neurofibrillaires sont quant à eux causés par l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, une protéine requise pour la polymérisation des microtubules [9]. Ces deux anomalies provoquent une perte neuronale et synaptique graduelle dans le cerveau des patients, entraînant la perte des fonctions associées aux régions cérébrales atteintes [10]. Traduites d'abord par des oublis bénins ou des changements d'humeurs, ces neurodégénérescences se manifestent ensuite par des troubles de concentration et d'orientation chez les individus. À un stade avancé, elles finissent même par affecter les fonctions vitales de l'organisme, causant le décès du malade.

Malgré les nombreux progrès réalisés depuis 100 ans, on ignore encore l'étiologie exacte de la maladie; on ne connaît toujours pas toutes les causes et les facteurs qui amorcent tout le processus de neurodégénération. Plusieurs hypothèses soutiennent le rôle des plaques et des enchevêtrements dans le processus de neurodégénération mais certains des mécanismes impliqués demeurent obscurs.

I-4- Les 10 signes de la maladie d'Alzheimer :

- Perte de mémoire
- Difficultés à réaliser les tâches quotidiennes
- Difficultés à s'exprimer, troubles du langage
- Perte d'orientation, sentiment d'être déboussolé
- Faible qualité de jugement
- Difficultés à raisonner de façon abstraite
- Avoir du mal à retrouver les choses
- Changements d'humeurs et de comportements
- Changements de personnalité
- Perte du sens de l'initiative

Tableau 1 : Stade de la maladie d'Alzheimer.

	Léger	Modérer	Avancer
Capacités Mentales	<ul style="list-style-type: none"> • Légère perte de mémoire • Difficulté à communiquer (p. ex., à trouver le bon mot) • Difficulté à faire de nouveaux apprentissages, à suivre les conversations • Difficulté à se concentrer, durée d'attention limitée • Problèmes d'orientation (p. ex. tendance à s'égarer ou à ne pas suivre les directions) 	<ul style="list-style-type: none"> • Perte de mémoire soutenue • Perte de mémoire liée aux souvenirs personnels • Incapacité à reconnaître les amis ou la famille • Désorientation dans l'espace et dans le temps 	<ul style="list-style-type: none"> • Perte de la capacité de se rappeler, de communiquer ou de fonctionner • Graves difficultés d'élocution • Incapacité à traiter l'information • Désorientation grave dans le temps, l'espace et à l'égard des autres
Humeur	<ul style="list-style-type: none"> • Sautes d'humeur • Dépression 	<ul style="list-style-type: none"> • Sautes d'humeur • Dépression • Changement dans la personnalité • Confusion • Colère • Anxiété/ appréhension • Méfiance • Hostilité 	<ul style="list-style-type: none"> • Retrait

<p>Attitude</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Passivité • Retrait des activités habituelles • Agitation (déambulation, errances) 	<ul style="list-style-type: none"> • Passivité • Diminution de la capacité à se concentrer • Agitation • Agressivité • Comportement dépourvu de toute inhibition • Répétition • Idées délirantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Méthodes non verbales de communication (contact visuel, pleurs, gémissements)
<p>Physique</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Légers problèmes de coordination 	<ul style="list-style-type: none"> • Assistance requise pour les tâches quotidiennes (p. ex., pour s'habiller, se laver, aller aux toilettes) • Habitudes de sommeil perturbées • Troubles du langage • Fluctuations de l'appétit • Difficultés visuospatiales 	<ul style="list-style-type: none"> • Immobile (devient grabataire) • Incapacité de s'habiller ou de prendre un bain • Dort plus longtemps et plus souvent • Perte de la capacité de parler • Difficulté à manger ou à avaler • Perte du contrôle de la vessie et des intestins • Perte de poids possible

I-5- Les deux formes de la MA

La MA se présente sous deux formes : la forme familiale et la forme sporadique. Ces deux formes, bien qu'elles présentent les deux mêmes types de lésions caractéristiques de la maladie et qu'elles se traduisent par les mêmes symptômes, origine de causes différentes. L'hérédité est mise en cause dans la forme familiale de la maladie mais on ignore encore si elle joue un rôle dans la forme sporadique. Pour cette dernière forme toutefois, on a réussi à identifier certains facteurs comme étant associés à un risque plus élevé de développer la maladie. Ces facteurs sont appelés facteurs de risque.

I-5-1- La forme sporadique de la MA

La forme sporadique de la maladie est la forme la plus courante et représente environ 90% des cas observés. La forme sporadique est associée à un développement tardif de la maladie, c'est-à-dire chez les individus âgés de plus de 60 ans [12].

I-5-1-1- L'âge, le facteur de risque le plus important

Le facteur de risque le plus important pour cette forme de la maladie est l'âge; l'occurrence de la maladie augmente de façon proportionnelle avec l'âge. À partir de 65 ans, la fréquence de la maladie double à chaque tranche d'âge de 5 ans pour atteindre 50% à l'âge de 85 ans. [12-13] Pour cette raison, la maladie d'Alzheimer a longtemps été considérée à tort comme faisant partie du processus normal de vieillissement. Or, ce ne sont pas toutes les personnes âgées qui finissent par développer la maladie.

I-5-1-2- L'allèle ApoE4

La présence de l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'apolipoprotéine E est un facteur de risque génétique associé à la forme sporadique de la maladie et semblerait agir comme modulateur de l'âge de développement de la maladie chez les individus déjà susceptibles à la maladie [14]. Le gène de l'apolipoprotéine E est situé sur le chromosome 19 et possède trois allèles : $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$, jouant chacune un rôle

différent dans l'homéostasie des lipides [15]. Les individus portant deux copies de l'allèle Apoε4 ont une probabilité de 50 à 90% de développer la maladie et ceux portant une seule copie de l'allèle ont une probabilité de 45% de développer la maladie comparativement à 20% pour la population en général. L'implication de l'allèle Apoε4 dans la maladie semblerait associée à une incapacité à éliminer les plaques amyloïdes du cerveau contrairement aux autres allèles. L'allèle Apoε4 ne permet cependant pas d'expliquer tous les cas de la maladie; seulement 15% des personnes atteintes de la MA sont homozygotes pour cette allèle.

I-5-1-3- Les autres facteurs de risques

Des recherches intensives ont été menées afin d'identifier d'autres facteurs génétiques ou environnementaux pouvant être impliqués dans la maladie. Aucun autre gène candidat n'a été trouvé. Parmi les facteurs épigénétiques : le sexe, l'activité physique [16] et mentale, la consommation de tabac [17], l'aluminium [18], les traumatismes crâniens à répétition ont été proposés mais des recherches plus poussées sont réalisées afin de préciser le rôle de ces facteurs.

I-5-2- La forme familiale de la MA

La forme familiale de la maladie ne représente que 5 à 10% des cas observés mais est associée à une forme plus agressive ou plus précoce de la maladie : les patients atteints de la forme familiale développent généralement la maladie avant l'âge de 60 ans [19]. Des cas ont même été observés chez des patients à un âge aussi précoce que 30 ans [20]. La forme familiale de la MA se transmet selon un mode autosomique dominant d'une génération à l'autre.

I- 5-2-1-Quatre gènes sont impliqués

L'analyse génétique des personnes des familles touchées a permis d'identifier 4 gènes qui lorsque mutés, causent la MA : le gène de la protéine Préséniline 1 (PS1) situé sur le chromosome 14, le gène de la protéine Préséniline 2 situé sur le chromosome 1, le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) situé sur le chromosome 21 ainsi que le gène de la protéine Presenilin enhancer-2 (PEN-2) située

sur le chromosome 19. Ensemble, les mutations de ces gènes sont responsables de 30 à 50% des cas de maladie de forme familiale [21].

Le premier gène qui fut identifié comme étant directement impliqué dans la MA lorsque muté est le gène APP [22]. À l'heure actuelle, on dénombre 25 mutations dans ce gène. Elles conduisent à l'apparition de la maladie chez les individus à l'âge de 45 à 60 ans. Le second gène qui fut identifié est le gène PS1 [23]. Depuis sa découverte, 155 mutations ont été identifiées. Les mutations associées à PS1 conduisent à la forme la plus agressive de la maladie, les individus développent généralement les premiers symptômes dès l'âge de 30 à 50 ans. Après l'identification du gène PS1, le gène PS2, son homologue, a été découvert dans des familles atteintes. On compte aujourd'hui 10 mutations associées à PS2 et qui conduisent au développement de la maladie à partir de l'âge de 45 ans. Finalement, on a récemment identifié une première mutation associée au gène PEN-2 bien que l'implication pathologique de cette mutation ne soit pas encore claire [24]. Le rôle pathologique des mutations dans les trois autres gènes APP, PS1 et PS2 est cependant plus clair. On sait qu'elles agissent en modifiant le clivage protéolytique de la protéine APP pour favoriser la production de peptide β -amyloïde neurotoxique, le constituant majeur des plaques amyloïdes.

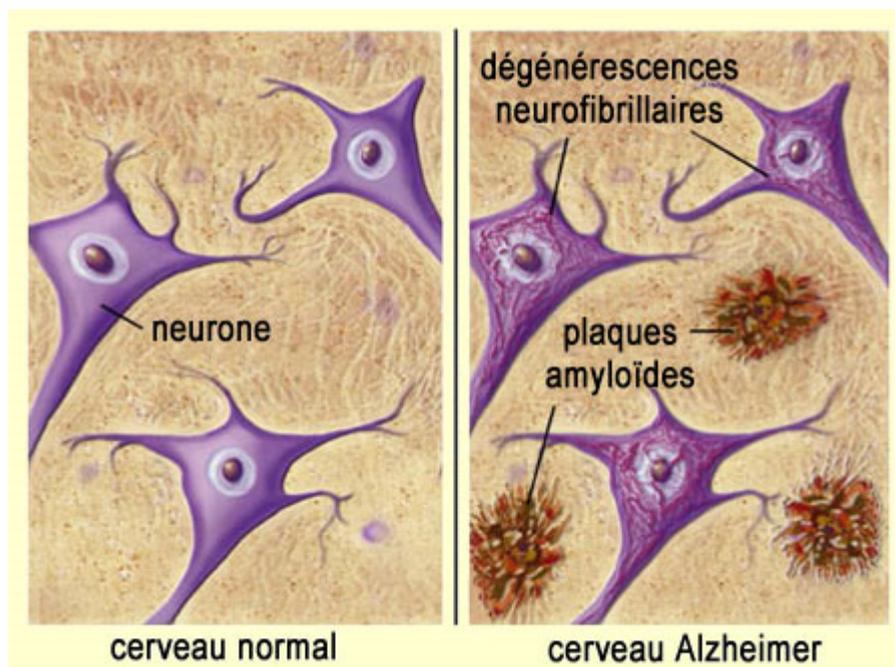


Figure 4 : Plaque d'amyloïde (plaques séniles)

I- 6- Le processus protéolytique d'APP

I- 6-1- La protéine précurseur de l'amyloïde

Le peptide β -amyloïde, constituant majeur des plaques amyloïdes, est en effet dérivé d'une protéine de plus haut poids moléculaire, la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Le locus du gène APP est localisé sur le chromosome 21q21 et code pour un groupe de protéines transmembranaires de type I exprimées ubiquitairement chez l'humain [25]. Le gène subit un épissage alternatif qui permet de créer dix isoformes différents. Parmi ces dix isoformes on retrouve trois isoformes plus communs nommés A, B et C et qui possèdent respectivement 770, 751 et 695 acides aminés. Les isoformes A et B sont largement exprimés dans toutes les cellules du corps alors que l'isoforme C est exprimé majoritairement au niveau des neurones et très faiblement dans les autres types de cellules. La protéine APP a été largement conservée dans l'évolution ce qui laisse supposer qu'elle possède un rôle physiologique précis, bien que ce dernier n'ait pas encore été identifié.

Suivant sa traduction, un peptide signal permet la translocation de la protéine APP à l'intérieur du réticulum endoplasmique et la modification post-traductionnelle de cette dernière à travers les voies de sécrétion. Au cours du routage d'APP à travers ces voies de sécrétion, la protéine peut subir différents clivages protéolytiques menant à formation de divers fragments. On ignore encore la fonction de chacun des fragments libérés mais l'analogie entre APP et la protéine Notch, une autre protéine à simple domaine transmembranaire, laisse supposer que chacun d'eux possède une fonction bien précise [26].

I- 6-1-2-APP peut être clivée selon deux voies catalytiques

Le clivage d'APP est réalisé selon deux voies catalytiques alternatives, dépendamment des protéases impliquées dans ce clivage (Fig.5). La voie la plus commune, dite voie non-amyloïdogénique, implique un premier clivage assuré par une α -sécrétase de la famille ADAM, un groupe de métalloprotéases incluant ADAM-10 et TACE. L' α -sécrétase clive APP dans sa partie extracellulaire au site α , à l'intérieur du domaine $A\beta$ ce qui prévient la formation du peptide amyloïde. Alternativement, APP peut être clivée via la voie dite amyloï

sécrétase, l'aspartyl-protéase BACE, au site β situé à l'extrémité N-terminale du domaine $A\beta$. Le clivage par BACE est parfois dirigé vers un site alternatif de clivage, le site β' , changement qui pourrait être produit par une différence d'expression de BACE [27]. Ce clivage au site β' est aussi amyloïdogénique, mais semblerait davantage observé chez le rat [28]. Peu importe la voie empruntée, cette première étape de clivage permet la libération de longs fragments solubles d'APP (APPs- α ou APPs- β) dans l'espace extracellulaire tandis que les fragments C83 ou C99, de 83 ou 99 acides aminés, demeurent ancrés dans la membrane. Une seconde étape de clivage est commune aux deux voies et implique le clivage intramembranaire des fragments C83 ou C99 au site γ ou ϵ , assuré par le complexe γ -sécrétase. Le clivage du fragment C83 par le complexe γ -sécrétase permet la libération du domaine AICD (APP Intracellular Domain) dans l'espace intracellulaire et celle d'un peptide de 3kDa, le peptide p3, dans l'espace extracellulaire. Le clivage du fragment C99 permet lui aussi la libération d'un domaine AICD mais génère un fragment extracellulaire de taille supérieure au peptide p3, le peptide $A\beta$ [29]. Dépendamment du site de clivage utilisé par le complexe γ -sécrétase, soit le site γ ou le site ϵ , la longueur du peptide $A\beta$ variera entre 40 et 42 acides aminés. Alors que le peptide p3 semble inoffensif parce que rapidement dégradé, le peptide $A\beta$ (1-42) insoluble et toxique s'accumule dans l'espace extracellulaire pour former les plaques amyloïdes caractéristiques de la MA.

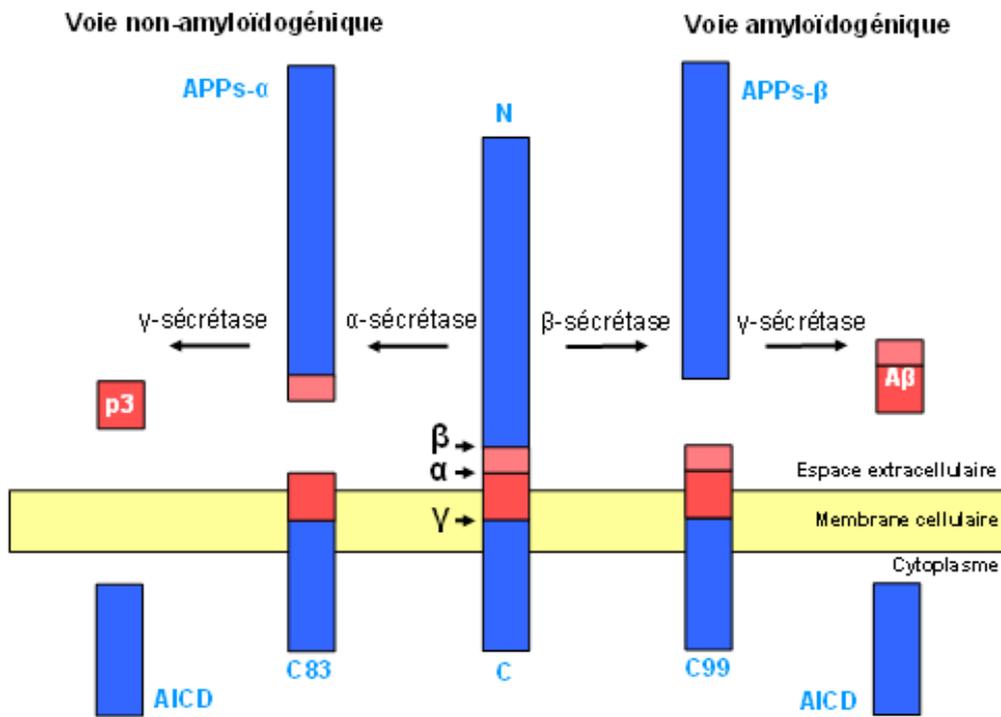


Figure 5 : Le processus protéolytique d'APP

I- 7- Le rôle de la cascade amyloïde

Depuis son identification, on suppose que le peptide Aβ est le facteur initial qui déclenche le reste de la cascade d'événements menant à la MA. Cette hypothèse dite de la « cascade amyloïde », a été proposée pour la première fois en 1991 par J. Hardy et D. Allsop [30]. Elle suggère que le processus protéolytique dérégulé de la protéine APP serait à l'origine d'un déséquilibre entre la production et l'élimination du peptide Aβ et que cette accumulation graduelle d'Aβ initierait des changements au niveau de la réponse inflammatoire, des dommages oxydatifs, des enchevêtrements neurofibrillaires en causant finalement une perte neuronale (Figure 6) [31]. Bien qu'elle soit contestée par certains, l'hypothèse de la cascade amyloïde est supportée par plusieurs observations. Parmi les plus importantes, on retrouve des plaques amyloïdes dans le cerveau de tous les patients atteints de la MA et cela en plus grand nombre que celle retrouvées chez les personnes normales. Par ailleurs, la sévérité des déficits mentaux est en corrélation avec le nombre de plaques amyloïdes retrouvées. Enfin, les 4 gènes qui ont été identifiés comme causant la maladie sous forme familiale augmentent soit la production ou l'agrégation de l'Aβ.

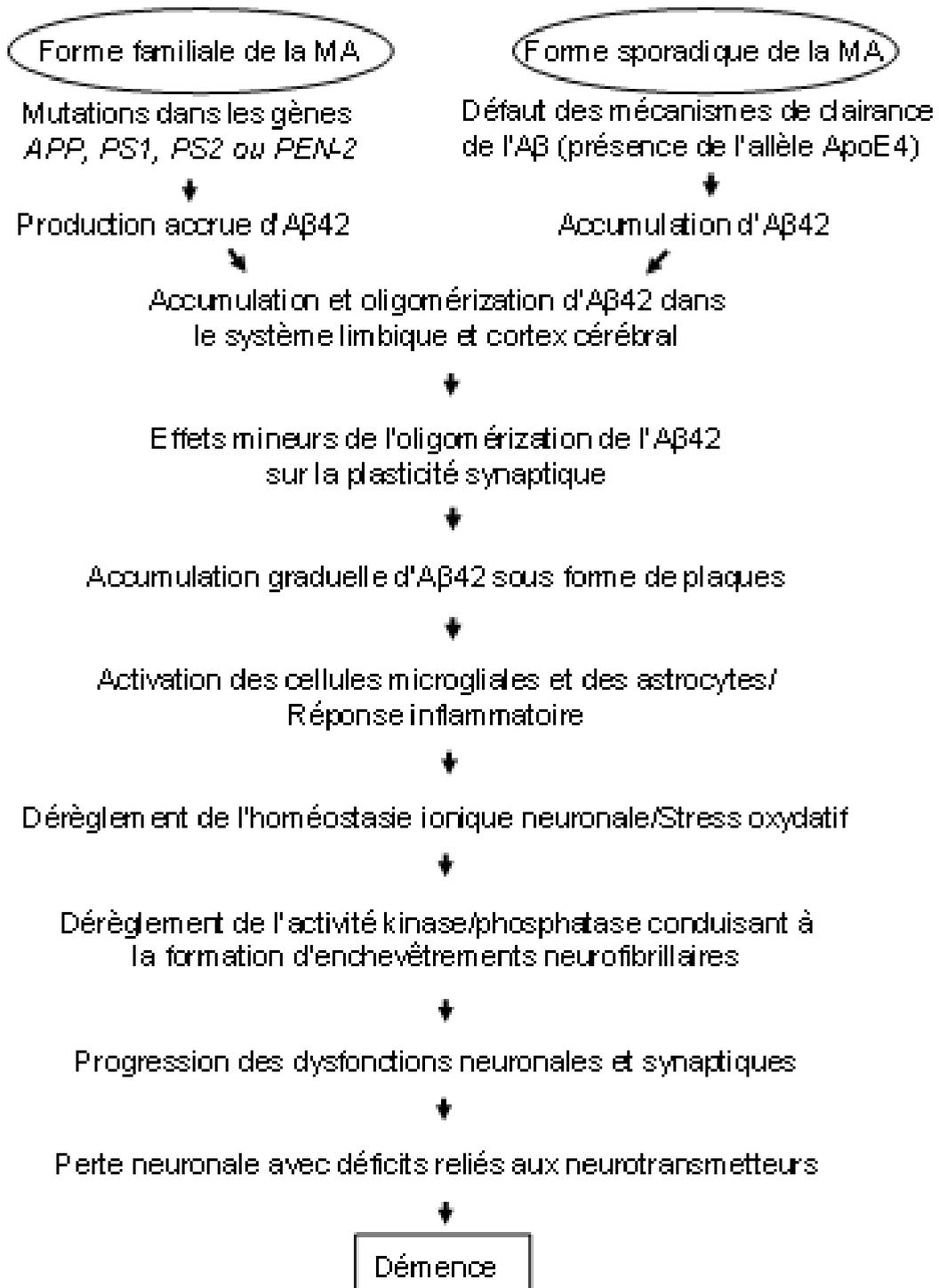


Figure 6 : L'hypothèse de la cascade amyloïde (Selkoe 2005)

Parce que l'A β possède un rôle central et initial dans l'établissement de la MA, les thérapies visant à empêcher sa production semblent représenter d'excellentes approches dans le traitement de la MA. Le développement de ces thérapies requiert une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la génération de l'A β , voies qui, tel que décrit précédemment, impliquent l'action de différentes sécrétases.

I-8- Le complexe γ -sécrétase

Le clivage au site γ d'APP est assuré par un large complexe multiprotéique de 500 à 600KDa nommé complexe γ -sécrétase [32]. Ce complexe est formé de quatre protéines membranaires : nicastrine [33], Aph-1, Pen-2 [34] et PS1 (préséniline-1) ou son homologue PS2 (préséniline-2) [35]. Le clivage d'APP au site γ est très particulier puisque le clivage a lieu à l'intérieur de la membrane. Ce processus particulier de protéolyse est appelé Protéolyse Intramembranaire Régulée (RIP) et est assuré par des protéines de la famille des RIP-protéases [36]. Plusieurs évidences supportent l'hypothèse que les présénilines sont responsable de l'activité γ -sécrétase du complexe. Des mutations autosomales dominantes sur les gènes PS1 et PS2 ont été découvertes et ces mutations ont pour effet de déplacer le clivage au site- γ de la position 40 à 42, augmentant ainsi la production d'A β 42 responsable de la formation des plaques amyloïdes [37]. Par ailleurs, le remplacement des deux résidus aspartate de PS1 abolit complètement l'activité γ -sécrétase [38]. PS1 assurerait donc la RIP de APP et les autres protéines du complexe joueraient un rôle dans la formation, la stabilisation et l'activation du complexe [39-40].

I-9-La β -sécrétase, l'enzyme limitante lors de la production d'amyloïde

La β -sécrétase suscite un intérêt particulier puisque c'est elle qui initie le catabolisme dérégulé de l'APP à l'origine des plaques amyloïdes. L'étude des propriétés et de l'activité de cette enzyme est donc essentielle à l'avancement des connaissances sur la maladie. L'enzyme BACE1 (β -site APP Cleaving Enzyme), aussi appelée Asp2 ou Memapsin, a été identifiée pour la première fois en 1999 comme étant la β -sécrétase responsable du clivage en N-terminal d'APP. BACE1 est une protéine transmembranaire de type I qui comprend un domaine catalytique situé

dans l'espace luminal, un seul domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Faisant partie de la famille des aspartyl protéases, la protéine a une longueur de 501 acides aminés et est exprimée dans la plupart des types cellulaires et organes bien que son expression soit prédominante au niveau du pancréas et ensuite au niveau des neurones [41]. Par contre, l'activité β -sécrétase de BACE1 est majoritaire au niveau du cerveau et bien que son ARNm soit détecté à de hauts niveaux dans le pancréas, son activité γ est faible ou quasiment nulle. L'absence d'activité malgré l'expression abondante dans ce tissu serait due à la présence d'un variant catalytiquement inactif de BACE1, dépourvu d'une partie de l'exon 3 par épissage alternatif [42]. Après la découverte de BACE1, plusieurs groupes ont rapporté l'existence d'un homologue, la protéine BACE2 [43]. Cependant, la β -sécrétase responsable de la production d'A β serait BACE1 et non BACE2 [44].

I-9-1 L'inhibition de BACE1 représente un potentiel thérapeutique important

L'identification de la protéine BACE1 a été rapportée simultanément par quatre groupes de chercheurs en 1999 [45-48] (Hussain, Powell et al. 1999; Sinha, Anderson et al. 1999; Vassar, Bennett et al. 1999; Yan, Bienkowski et al. 1999). À l'époque, le clonage et la caractérisation de la protéine ont permis de démontrer que BACE1 possédait toutes les caractéristiques attendues pour la β -sécrétase. Il restait cependant à confirmer si BACE1 était l'unique β -sécrétase ou s'il existait d'autres β -sécrétase à l'origine de la production d'amyloïde. De plus, on ignorait encore si BACE1 possédait une fonction essentielle *in vivo* ou non, et donc si son inhibition pouvait représenter une cible thérapeutique potentielle sans effets indésirables. Ainsi, plusieurs groupes ont généré des souris déficientes en BACE1 pour élucider ces questions. Le knockout de BACE1 a permis d'abolir l'activité β -sécrétase complètement et les souris BACE1^{-/-} générées se sont révélées viables, fertiles et présentant toutes les caractéristiques d'une souris de type sauvage [49-52]. Ces résultats suggéraient que BACE1 était la principale β -sécrétase dans le cerveau et que son inhibition pouvait être une stratégie efficace pour empêcher la production d'amyloïde sans effets secondaires sérieux. L'inhibition de BACE1 présentait ainsi un intérêt plus élevé que l'inhibition de la γ -sécrétase, la seconde sécrétase impliquée dans la génération de l'amyloïde, étant donné l'implication de

clivage protéolytique de multiples protéines incluant Notch, une protéine essentielle au développement.

I-9-2 Structure cristallographique de BACE1

L'élucidation de la structure tridimensionnelle de BACE1 par L. Hong [53] a grandement contribué au développement de molécules inhibitrices. La structure tridimensionnelle de BACE1 avec un inhibiteur OM-99 a révélé une poche catalytique de BACE1 plus large que pour les autres aspartyl protéases et recouverte d'une structure susceptible de modifier la liaison de l'enzyme à son substrat. La structure a aussi permis de mettre en évidence certaines liaisons entre des résidus situés sur BACE1 et des résidus situés sur son substrat APP pour expliquer la spécificité de substrat de BACE1.

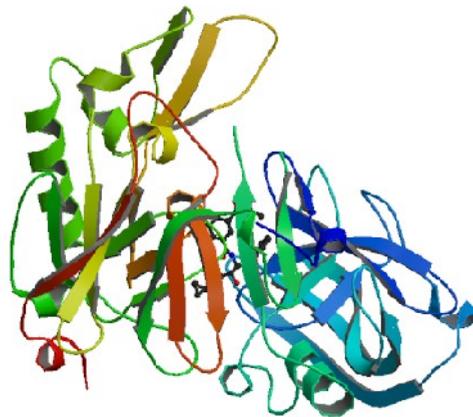


Figure 7 : Structure tridimensionnelle de BACE1 (Protein Data Bank)

Bien que l'élucidation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme ait aidé au développement d'inhibiteurs, l'enzyme s'est toutefois révélée être une cible plus récalcitrante que prévu, en raison de la largeur de sa poche catalytique et de sa localisation cellulaire et tissulaire. Pour être efficaces, les inhibiteurs de BACE1 doivent être suffisamment volumineux pour occuper la majeure partie des huit sous-sites catalytiques de l'enzyme mais suffisamment petits et liposolubles pour parvenir à traverser la barrière hématoencéphalique. Cette liposolubilité est aussi essentielle

pour permettre à l'inhibiteur de traverser la bicouche lipidique pour se rendre jusqu'à l'appareil de Golgi et les endosomes, où est située BACE1.

La propriété de liposolubilité est très importante chez les flavonoïdes ce qui nous a poussé à les introduire dans l'inhibition de la BACE1 pour diminuer la formation des (plaques séniles plaques Amyloïde) et par suite diminuer l'évolution de la maladie d'Alzheimer [51].

REFERENCES:

- [1] Beers MH., Berkow R.(eds),The Merck manual of diagnosis and therapy. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories, **1999**.
- [2] Cummings J. L, Cole G., Alzheimer disease, *JAMA*, **2002**, 287, 2335-8.
- [3] Bird T. D.,Braunwald E., Fauci AS. Kasper DL.,Maladie d'Alzheimer et autres démences. In : Principe de médecine interne d'Harrison, New York. MC Graw Hill, **2001**. 2391-8.
- [4] Garant M., Les inhibiteurs de la cholinestérase : une nouvelle classe de médicaments, *capsule*, **2002**, 19.
- [5] Orgogozo JM., Forette B.,Gamzu E.,La maladie d'Alzheimer : 1^{ère} thérapeutique 1998 Euroconférences **7-8 novembre1998**. Institut Pasteur Paris.
- [6] Feldman H., Levy AR., Hsiung G-Y., A Canadian cohort study of cognitive impairment andrelated dementias (ACCORD): study methods and baseline results. *Neuroepidemiology*,**2003**, 22, 265-274.
- [7] Glenner., Wong G. G. and C. W., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem Biophys Res Commun*,**1984**, 120(3), 885-90.
- [8] Selkoe D. J., Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments, *Science*, **1997**, 275(5300), 630.
- [9] Grundke-Iqbal, I., IqbalK., et al.. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc Natl Acad Sci U S A*,**1986**, 83(13), 4913-7.
- [10] Smale G., Nichols N. R., et al.. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease, *Exp Neurol*,**1995**, 133(2),225-30.

- [11] Morris J. C., Is Alzheimer's disease inevitable with age?: Lessons from clinicopathologic studies of healthy aging and very mild Alzheimer's disease, *J Clin Invest*, **1999**, 104(9), 1171-3.
- [12] Puglielli L., Ellis B. C., et al., Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis, *J Biol Chem*, **2003**, 278(22), 19777-83.
- [13] Strittmatter W. J., Saunders A. M., et al., Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**, 90(5), 1977-81.
- [14] Smith J. D., Apolipoproteins and aging: emerging mechanisms, *Ageing Res Rev* **2002**, 1(3), 345-65.
- [15] Teri L., McCurry S. M., et al., Exercise and activity level in Alzheimer's disease: a potential treatment focus, *J Rehabil Res Dev*, **1998**, 35(4), 411-9.
- [16] Suay Llopis L., Ballester Diez F., [Review of studies on exposure to aluminum and Alzheimer's disease, *Rev Esp Salud Publica*, **2002**, 76(6), 645-58.
- [17] Portet, F., Dauvilliers Y., et al., Very early onset AD with a de novo mutation in the presenilin 1 gene (Met 233 Leu), *Neurology*, **2003**, 61(8), 1136-7.
- [18] Bird T. D., Genetic factors in Alzheimer's disease, *N Engl J Med*, **2005**, 352(9), 862-4.
- [19] Kang J., Lemaire H. G., et al., The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor, *Nature*, **1987**, 325(6106), 733-6.
- [20] Sherrington R., Rogaeve E. I., et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease, *Nature*, **1995**, 375(6534), 754-60.
- [21] Sala Frigerio C., Piscopo P., et al., PEN-2 gene mutation in a familial Alzheimer's disease case, *J Neurol*, **2005**, 252(9), 1033-6.

- [22] Goldgaber D., Lerman M. I., et al., Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease, *Science*, **1987**, 235(4791), 877-80.
- [23] Ray W. J., Yao M., et al., Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch, *J Biol Chem*, **1999**, 274(51), 36801-7.
- [24] Creemers J. W., Ines Dominguez D., et al., Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family, *J Biol Chem*, **2001**, 276(6), 4211-7.
- [25] Gouras G. K., Xu H., et al., Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons, *J Neurochem*, **1998**, 71(5), 1920-5.
- [26] Haass C., Hung A. Y., et al., beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms, *J Biol Chem*, **1993**, 268(5), 3021-4.
- [27] Hardy J., Allsop D., Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease, *Trends Pharmacol Sci*, **1991**, 12(10), 383-8.
- [28] Selkoe D. J., Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments, *Science*, **1997**, 275(5300), 630-1.
- [29] Edbauer D., Winkler E., et al., Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, 99(13), 8666-71.
- [30] Yu G., Nishimura M., et al., Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing, *Nature*, **2000**, 407(6800), 48-54.
- [31] Francis R., McGrath G., et al., aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation, *Dev Cell*, **2002**, 3(1), 85-97.
- [32] Li Y. M., Xu M., et al., Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1, *Nature*, **2000**, 405(6787), 689-94.

- [33] Brown M. S., Ye J., et al., Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans, *Cell*, **2000**, 100(4), 391-8.
- [34] Citron, M., Westaway D., et al., Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice, *Nat Med*, **1997**, 3(1), 67-72.
- [35] Wolfe M. S., Xia W., et al., Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature*, **1999**, 398(6727), 513-7.
- [36] Francis, R., McGrath G., et al., aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation, *Dev Cell*, **2002**, 3(1), 85-97.
- [37] Takasugi, N., Tomita T., et al., The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex, *Nature*, **2003**, 422(6930), 438-41.
- [38] Vassar, R., Bennett B. D., et al., Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science*, **1999**, 286(5440), 735-41.
- [39] odendorf U., Fischer F., et al., A splice variant of beta-secretase deficient in the amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein, *J Biol Chem*, **2001**, 276(15), 12019-23.
- [40] Yan R., Bienkowski M. J., et al., Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity, *Nature*, **1999**, 402(6761), 533-7.
- [41] Vassar, R., "BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci*, **2004**, 23(1-2), 105-14.
- [42] Hussain I., Powell D., et al., Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci*, **1999**, 14(6), 419-27.

- [43] Sinha, S., Anderson J. P., et al., Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain, *Nature*, **1999**, 402(6761), 537-40.
- [44] Vassar, R., Bennett B. D., et al., , Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science* **1999**, 286(5440), 735-41.
- [45] Yan, R., Bienkowski M. J., et al., Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity, *Nature*, **1999**, 402(6761), 533-7.
- [46] Cai H., Wang Y., et al., BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons, *Nat Neurosci*, **2001**, 4(3), 233-4.
- [47] Luo, Y., Bolon B., et al., Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation, *Nat Neurosci*, **2001**, 4(3), 231-2.
- [48] Cai, H., Wang Y., et al., BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons, *Nat Neurosci*, 2001, 4(3), 233-4.
- [49] Roberds, S. L., Anderson J., et al., BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics, *Hum Mol Genet*, **2001**, 10(12), 1317-24.
- [50] Hong, L., G. Koelsch, et al., Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor, *Science*, **2000**, 290(5489), 150-3.
- [51] Shimmyo Y., Kihara T., Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1780, 819-825.

CHAPITRE II : FLAVONOÏDES

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour, les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces, nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

Les flavonoïdes sont des pigments naturels répandus le règne végétal où ils interviennent comme filtre UV et comme agent de protection contre des organismes pathogènes. Ils sont apportés au niveau de l'organisme grâce à la consommation des fruits, des légumes, des céréales et de boissons.

Les flavonoïdes interviennent dans le mécanisme d'oxydo-réduction. 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 ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP (Une molécule qui fournit de l'énergie nécessaire aux réactions chimiques des cellules).

Cependant, dans le cas où il y a transfert d'un nombre d'électrons impair, nous assistons à la formation d'espèces toxiques ayant des électrons non appariés (célibataires), appelées radicaux libres. Parmi ceux-ci, peuvent être cités les radicaux peroxydes ($\text{ROO}\bullet$), alcoxydes ($\text{RO}\bullet$), superoxydes ($\text{O}_2\bullet^-$) et hydroxydes ($\text{HO}\bullet$). 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: Reactive Oxygen Species, selon la terminologie anglo-saxonne). 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 et les maladies neurodégénératives tel que la maladie d'Alzheimer.

Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont

obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes). Le système endogène est formé par des enzymes qui agissent en synergie, à savoir la glutathion peroxydase, la catalase et le superoxyde dismutase (SOD). En effet, la SOD transforme le superoxyde en peroxyde d'hydrogène, tandis que la catalase métabolise ce dernier en une molécule d'eau et une autre d'oxygène.

A cause des agents externes comme les polluants de l'air, les radiations UV et l'alcool, les radicaux libres peuvent être produits en excès. De ce fait, notre système endogène de défense se trouve incapable de réduire toutes ces espèces réactives. Pour diminuer ces dommages oxydatifs, notre organisme a alors besoin d'une alimentation riche en antioxydants exogènes.

Parmi ces antioxydants, on trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les flavonoïdes. Ces molécules ont fait l'objet de plusieurs travaux. Il s'agit essentiellement des différentes techniques d'extraction végétale, leur identification, leur fonctionnalisation et des propriétés de ces molécules. L'intérêt pour ces composés est justifié par les nombreux effets biologiques qu'on leur attribue, tels que leur rôle protecteur contre les inflammations, les allergies, les maladies cardiovasculaires, les cancers, la maladie d'Alzheimer, les infections bactériennes et virales, la stimulation du système immunitaire. Ces effets sont reliés à leur pouvoir antioxydant et inhibiteur d'enzymes.

II-1- Structure et origine des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des membres d'une classe des composés naturels avec l'occurrence répandue dans le règne des végétaux. Ils font partie de la classe des polyphénols [1-3], principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (figure 1).

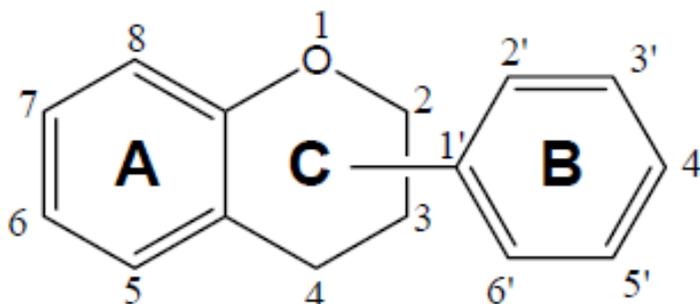


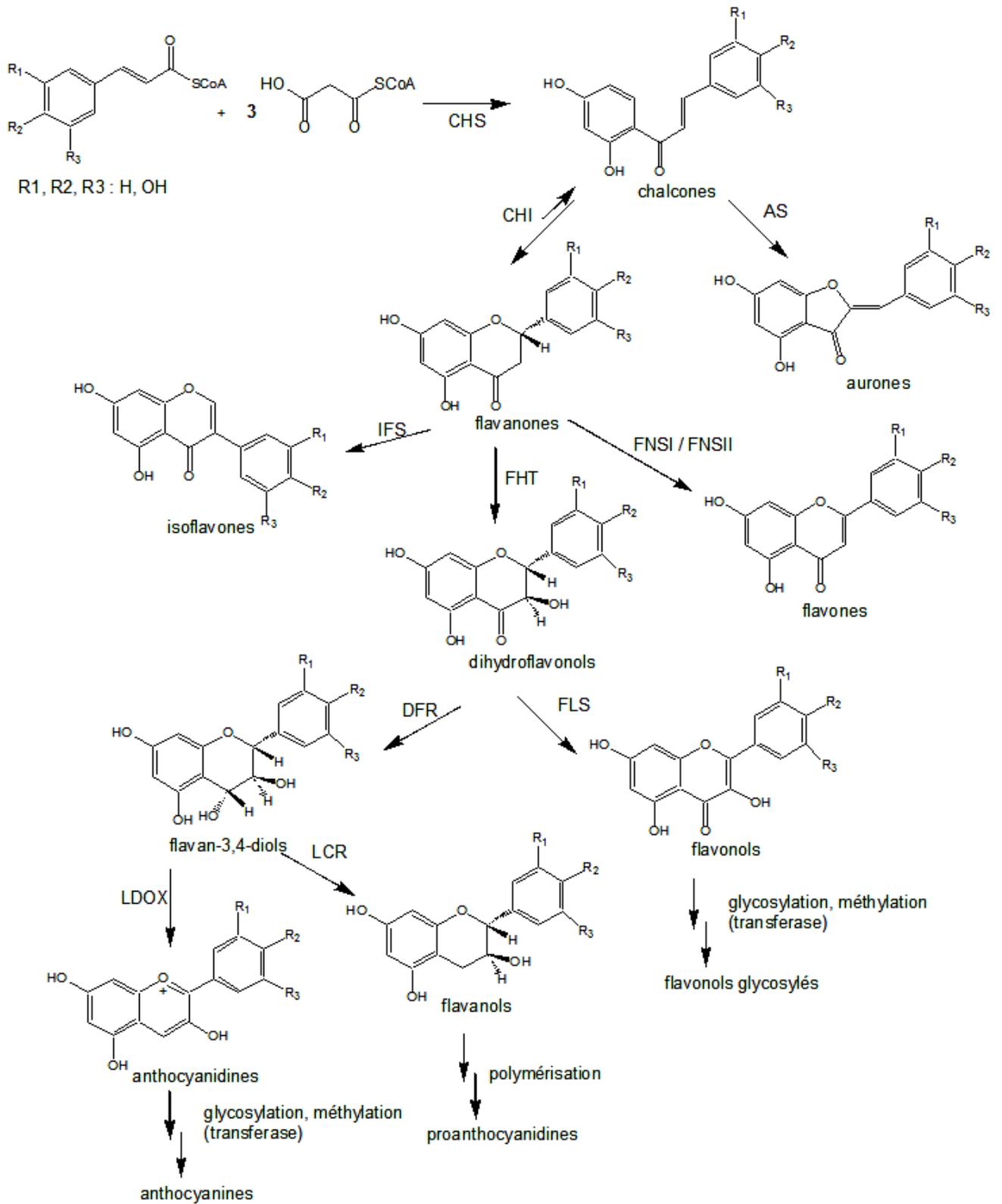
Figure 1 : Squelette de base flavonoïdes et numérotation adoptée [4]

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide Shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate-coenzyme A synthétisé à partir de la phénylalanine. La voie biosynthétique de ces polyphénols est présentée dans la figure 2. Les enzymes intervenant dans la voie de différenciation des classes de flavonoïdes ont été plutôt bien caractérisées.

Tous les flavonoïdes sont formés via un intermédiaire commun : la 2',4',4',6'-tétrahydroxychalcone. Ce précurseur dérive de la condensation de trois molécules d'acétylcoenzyme A, qui correspondront au cycle A, et d'une molécule de 4-hydroxycinnamatecoenzyme A, permettant la formation des cycles B et C. Ce mécanisme est catalysé par la chalcone synthase. La cyclisation de cette chalcone stéréospécifique par la chalcone isomérase forme la (S)-4', 5, 7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes.

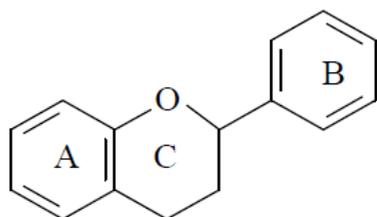
Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydroxylase, flavonoïde 3',5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoïde glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation.

Figure 2. Voies de biosynthèse des flavonoïdes [3], [5] .AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomerase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol 4-reductase, FHT : flavanone 3-hydroxylase, FLS : flavonol synthase, FNSI/FNSII : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase, LCR : leucoanthocyanidin reductase 6

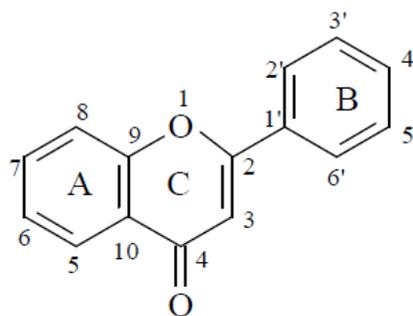


II-2- Les différentes classes de flavonoïdes

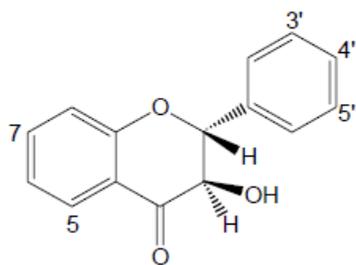
Les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C [6-7].



(a)

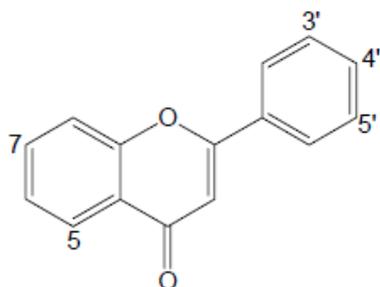


(b)



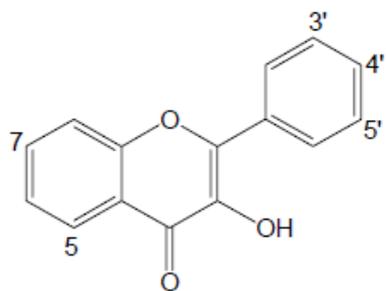
Dihydroflavonols

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Taxifoline	OH		OH	OH	OH	
Fusetine			OH	OH	OH	



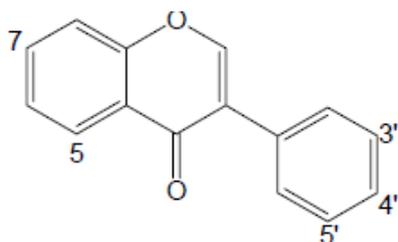
Flavones

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Apigénine	OH		OH		OH	
Chryisine			OH			
Lutéoline	OH		OH	OH	OH	



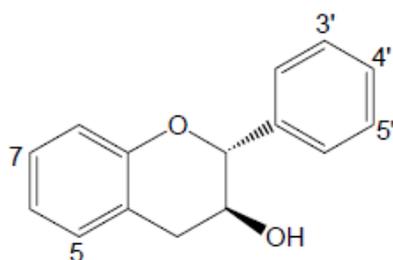
Flavonols

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Kaempférole	OH		OH		OH	
Myricétine	OH		OH	OH	OH	OH
Quercétine	OH		OH	OH	OH	



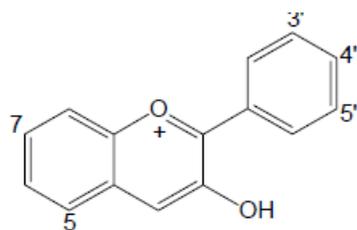
Isoflavones

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Daidzéine			OH		OH	
Génistéine	OH		OH		OH	



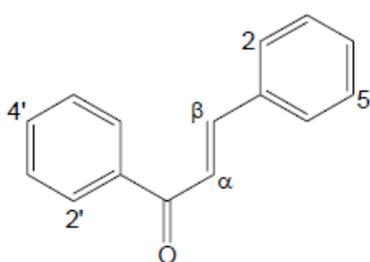
Flavanols

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Catéchine	OH		OH	OH	OH	
Gallocatéchine	OH		OH	OH	OH	OH



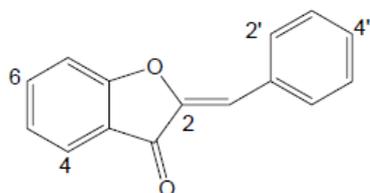
Anthocyanes

Flavonoïde	Substitution					
	3	5	7	3'	4'	5'
Pelargonidine	OH	OH	OH		OH	
Cyanidine	OH	OH	OH	OH	OH	
Delphinidine	OH	OH	OH	OH	OH	OH



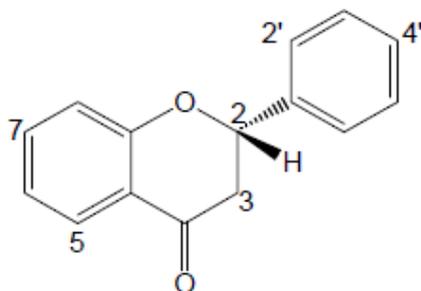
Chalcones

Flavonoïde	Substitution					
	2'	3'	4'	5'	6'	4
Davidigénine	OH		OH			OH
Asebogénine	OH		OMe		OH	OH



Aurones

Flavonoïde	Substitution					
	4	6	7	3'	4'	5'
Leptosidine		OH	OMe	OH	OH	
Maritimétine		OH	OH	OH	OH	



Flavanones

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Eriodictyol	OH		OH	OH	OH	
Hesperitine	OH		OH	OH	OMe	
Naringénine	OH		OH		OH	

Pour chaque classe de flavonoïde, les molécules diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyle, la présence de substituant sur la génine (flavonoïde non substitué) et le degré de polymérisation. Les formes les plus rencontrées sont issues d'une hydroxylation, alkylation (méthylation ou prénylation), glycosylation et acylation soit sur la génine, soit sur un groupe hydroxyle d'un ose. Les flavonoïdes sont essentiellement hydroxylés en position 5, 7, 4' et éventuellement en position 3.

Cette grande diversité de structures fait des flavonoïdes l'une des plus grandes familles de substances naturelles. En effet, les techniques d'analyse récentes ont permis d'identifier plus de 8000 flavonoïdes [8-11].

II-3 - Biodisponibilité des flavonoïdes

L'organisme humain ne synthétise pas de flavonoïdes mais, de manière générale, elles sont largement rencontrées dans le règne végétal. Elles sont cependant rares chez les végétaux inférieurs puisque ce sont des métabolites secondaires -composés non issus de la photosynthèse mais de réactions chimiques ultérieures. Nous retrouvons les flavonoïdes dans notre alimentation quotidienne [8-12-13-14]. Les fruits (orange, raisin, etc..), les légumes (oignon, laitue, etc..) mais également les graines (fève, cacao) ou encore les racines des plantes sont, pour l'homme, des sources importantes de flavonoïdes. Les feuilles de thé sont également connues pour être riches en flavonoïdes.

La quercétine et la lutéoline sont parmi les composés les plus représentatifs de cette famille en cela qu'elles présentent une activité importante dans les processus biologiques impliquant ces composés [15]. La consommation journalière en flavonoïdes n'a jamais été étudiée de manière systématique au vu du très grand nombre de composés et de matrices naturelles à prendre en considération. Les seules estimations précises sur la consommation en flavonoïdes concernent essentiellement les flavonols et les flavones [16,17]. Ainsi la consommation journalière en flavones et flavonols est de l'ordre de quelques dizaines à une centaine de mg.

La distribution des différentes familles de flavonoïdes dans le règne végétal a été évaluée par plusieurs auteurs (tableau 1).

Tableau 1 : Distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes [6-7-18-19-20-21]

Famille	Molécules principales	Distribution
Flavone	apigénine, lutéoline, chrysine	pomme, céleri, grains de céréale,...(teneur = 5-100mg/kg) herbes aromatiques (persil, romarin, thym), <i>Petroselinum sativum, Apium graveolens...</i>
Flavanone	hespéritine, naringine, taxifoline	citrus et agrumes (teneur = 250-6000 mg/kg) <i>Eucalyptus globulus</i>
flavonol	quercétine, myricétine et kaempférol	pomme, pamplemousse, radis, endive, brocoli, oignon, chou, laitue, vin rouge, raisin, olive, thé noir,... (teneur = 56-250mg/kg) <i>Sophora japonica, Stellaria media, Vitis vinifera</i>
isoflavones	genisteine et daidzeine	légumineuses (soja, haricots noirs et pois chiches verts), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol (teneur = 150-1500 mg/kg) <i>Pueraria lobata, Stellaria media</i>
flavan-3-ols	(+)-catéchine, (-)-epicatéchine, (-)-epigallocatechine et leurs esters de gallate	thé vert et noir, vin rouge (teneur = 5-250 mg/kg) <i>Vitis vinifera</i>
anthocyanes	cyanidine, pelargonidine	fruits et légumes rouges et violets (pommes, raisins, kaki, cassis...) (100-4000 mg/kg)



Petroselinum sativum

Persil commun



Apium graveolens

céleri



Eucalyptus globulus

Eucalyptus



Sophora japonica
Sophora du Japon



Stellaria media



Pueraria lobata



Vitis vinifera
Raisin

II-4- Implications biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant [5-12-22-24]: par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer et par inhibition d'enzymatiques.

Sous certaines conditions, les flavonoïdes sont susceptibles de se comporter comme agent prooxydant [25-30], et ils sont responsables de l'inhibition de très nombreuses enzymes. Deux revues [31-32] très complètes rendent compte de l'incroyable potentialité des flavonoïdes.

II-5- Application reliées aux activités des flavonoïdes et à leurs esters

Les propriétés thérapeutiques, cosmétiques et alimentaires ont fait l'objet de nombreuses publications et brevets. Il s'agit essentiellement d'activités anti-virale, anti-tumorale, anti-inflammatoire, anti-allergique, anti-cancéreuse, etc. ... Ces propriétés sont souvent interprétées comme la conséquence de leurs propriétés antioxydantes et de leur affinité pour les protéines (dont une variété d'enzymes). Le tableau 2 résume les principales applications des flavonoïdes et de leurs esters dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire.

Tableau 2 : Aperçu sur les propriétés biologiques de flavonoïdes et de leurs esters

Applications pharmaceutiques		
Références	Flavonoïdes	Propriétés
Leroi <i>et al.</i> (1973) [33]	hespéridine octonicotinoate	traitement de l'hypercholestérolémie
Albert <i>et al.</i> (1977) [34]	esters de cyanidan-3-ol	inhibition de la lipoperoxydation
Vercauteren <i>et al.</i> (1993) [35]	perester de catéchine et OPC et d'acide gras	veinotonique, vasculoprotecteur
Watanabe <i>et al.</i> (1993) [36]	esters d'esculétine et d'acide gras	protection des cartilages, dégradation du protéoglycane, traitement pour l'arthropathie
Watanabe <i>et al.</i> (1994 a, b) [37, 38]	dérivés des hydroxycoumarines	inhibition des métalloprotéinases Agent chondroprotecteur, traitement de l'arthropathie

Formica et Regelson (1995) [15]	quercétine	anti-inflammatoire, anti-tumeur, anti-virale
Manach <i>et al.</i> (1996) [39]	flavones, flavonols, isoflavones, flavanones	prévention du cancer et des maladies cardio-vasculaires
Eugster <i>et al.</i> (1996) [40]	perester de flavonols et de lavanones (non glycosylés) et d'acide graS	anti-virale, anti-parasitaire
Di carlo <i>et al.</i> (1999) [6]	flavonoïde	effet anti-tumeur, anti inflammatoire
Bok <i>et al.</i> (1999) [41] Alcaraz <i>et a.</i> (2000) [42]	esters de flavanones et d'acides gras et aromatiques flavones, flavanones, chalcones	traitement et prévention des maladies liées à l'hyperlipidémie activité anti-bactérienne
Mantas <i>et al.</i> (2000) [43]	flavonoïdes	activité anti-HIV
Matsubara et al. (2004) [44]	quercetine, isoquercitrine, rutine, quercitmeritrine, isoquercitrine cinnamate, isoquercitrine dihydrocinnamate, isoquercitrine pcoumarate, isoquercitrine 2- naphalate	activité anti-angiogénique (empêcher l'alimentation des tumeurs en sang ce qui favorise leurs disparition)
Syuchi et al. (2006) [45]	eridictyol/ diosmetin	anti-bacterienne, traitement pour glucosidase
Cavazza [46]	propionyl L-carnitine, quercétine, rutine	antiradicalaire, traitement d'anomalies thrombotiques et artérioscléreuse
Applications cosmétiques		
Références	Flavonoïdes	Propriétés
Gorou (1983) [47]	esters de quercétine et d'acide gras	inhibition de la tyrosinase, suppression de la formation de mélanine, anti-UV
Levy et Andry (1994) [48]	microcapsules de flavonoïdes	activité antiradicalaire, traitement du vieillissement cutané
Otto <i>et al.</i> (2000) [49]	esters de flavones et isoflavones et d'acides aromatiques et d'acides gras polyinsaturés	activité de photoprotection et d'activation de la synthèse de collagène
Pfluecker <i>et al.</i> (2000) [50]	flavones et flavonols non glycosylés	antioxydante, filtre UV alkylées ou acylées par des filtres UV
Wolber et al. (2004) [51]	alpha glucosyl rutine	antioxydante pour les préparations dermocosmétiques
Amalia (2004) [52]	flavonoïdes aglycones et glycosylés	modification de l'état des cellules endogènes de la peau

Suk et al. (2005) [53]	gallate d'épicatéchine	résistance à l'oxygène et à la Lumière pour des préparations cosmétiques
Applications agro-alimentaires		
Références	Flavonoïdes	Propriétés
Markakis [54]	quercétine, rutine	colorants naturels (jus de fruit, soupe, etc.)
Bok <i>et al.</i> (1999) [41]	esters de flavanones et d'acides gras et aromatiques	incorporation dans des préparations alimentaires
Chen <i>et al.</i> (1999) [55]	polyphénols du thé acylés par des chaînes grasses	antioxydant pour les huiles

II-6- Choix des flavonoïdes

Dans ce travail, nous nous sommes limités à deux types de molécules les plus représentatifs de la famille des flavonoïdes : les flavones et flavonols [56]. Ces molécules interviennent dans la quasi-totalité des mécanismes cités précédemment et se trouvent être l'objet de la plupart des études.

REFERENCES:

- [1] Hahlbrock K., Flavonoid. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise: Secondary Plant Products*, E.E. Academic Press: New York, **1981**, 7.
- [2] Winkel-Shirley B., Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.*, **2001**, 126 (2), 485-493.
- [3] Winkel-Shirley B., Biosynthesis of flavonoids and effects stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2002**, 5 (3), 218-223.
- [4] Cook N., Samman S., Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, **1996**, 7, 66-76.
- [5] Forkmann G., Martens S., Metabolic engineering and applications of flavonoids, *Current Opinion in Biotechnology*, **2001**, 12, 155-160.
- [6] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A A., Capasso F., Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, **1999**, 65 (4), 337-353.
- [7] Hollman P. C. H., Katan, M. B., Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability, *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37 (9-10), 937-942.
- [8] Manach C., Scalbert A., Morand C., Remy C., Jiménez L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, 79(5), 727-747.
- [9] Markham K.R., Techniques of flavonoids identification, New York : Academic Press: London, **1982**.
- [10] Harborne J.B., Williams C.A., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **2000**, 55(6), 481-504 .
- [11] Markham K.R., Bloor S.J., Analysis and identification of Flavonoids in Practice. In *Flavonoids, in health and disease*, Rice-Evance , C.A, Packer, L, Eds, Marcel Dekker: New York, **1998**, 1- 34.
- [12] Peterson J., Dwyer J., Flavonoids: dietary occurrence and biochemical Activity, *Nutr. Res.*, **1998**, 18 (12), 1995-2018.
- [13] Scalbert A., Williamson G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols . *J. Nutr.* , **2000**, 130(8S Suppl), 2073S-2085S.

- [14] Aherne S.A., O'Brien N.M., Dietary flavonols : chemistry , food content , and metabolism, *Nutrition*, **2002**, 18(1), 75-81 .
- [15] Formica J.V., Regelson W., Review of the biology of quercetin and related , bioflavonoids , *Food Chem . Toxicol.*, **1995**, 33(12), 1061-1080 .
- [16] Hertog M.G.L ., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D., Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands, *Nutr. Cancer*, **1993**, 20, 21-29.
- [17] Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravis C., Blackburn H., Buzina R.B., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M., Simic B.S., Toshima H., Feskens J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B., Flavonoids , intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, *Arch. Int. Med*, **1995**, 155, 381-386 .
- [18] Heller W., Forkmann G., *The flavonoids*. Harborne J.B. ed.; London, **1993**, 499.
- [19] Fargeix D., Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoides en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoides. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon, **2000**.
- [20] Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, 20 (7), 933-956.
- [21] Sampson L., Rimm E., Hollman P. C. H., De Vries J. H. M., Katan M. B., Flavonol and Flavone Intakes in US Health Professionals, *Journal of the American Dietetic Association*, **2002**, 102 (10), 1414-1420.
- [22] Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., Van Norren K., Van Leeuwen P.A.M., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am.J.Clin.Nutr*, 2001, 74(4), 418-425.
- [23] Pietta P.G., Flavonoids as antioxidants, *J.Nat. Prod*, **2000**, 63(7), 1035-1042.
- [24] Metodiewa D., Jaiswal A.K., Cenas N., Dickanaitė E., Segura-Aguilar J., . Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product, *Free Radical Biol. Med*, **1999**, 26(1-2), 107-116.
- [25] Awad H.M., Boersma, M.G., Vervoort J., Rietens I.M.C.M., Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide-Glutathione Adducts. *Arch. Biochem . Biophys.*, **2000**, 378(2), 224-233.

- [26] Yamashita N., Tanemura H., Kawanishi S., Mechanisms of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu (II). *Mutat. Res.* **1999** 425(1), 107-115.
- [27] van der Woude H., ALINK G.M., Van Rossum B.E.J., Walle K., Van Steeg H., Walle T., Rietjens I.M.C.M., Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chem. Res. Toxicol.*, **2005**, 18(12), 1907-1916.
- [28] Oikawa S., Hirosawa I., Hirakawa K., Kawanishi S., Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol, *Carcinogenesis*, **2001**, 22(8), 1239-1245.
- [29] Galati G., Moridani M.Y., Chan T.S., O'Brien P.J., Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation, *Free Radical Biol. Med.*, **2001**, 30(4), 370-382.
- [30] Erben-Russ M., Bors W., Saran M., Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1987**, 52, 393-412.
- [31] Havsteen B.H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, **2002**, 96(2-3), 67-202.
- [32] Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **2000**, 52(4), 673-751.
- [33] Leroi E., Polynicotinic esters of hesperidin, US 3751570, **1973**.
- [34] Albert A., Courbat P., Weith A., Process of the preparation of *O*-substituted derivatives of cyanidan-3-o1. US4255336, **1977**.
- [35] Vercauteren J., Weber J. F., Bisson J. L., Bignon J., Polyphenol derivative compositions and preparation thereof, US 5844061, **1993**.
- [36] Watanabe K., Niimura K., Miyagawa J., Esculetin derivatives and method for manufacture thereof, use thereof, and pharmaceutical composition, EP 0654479A2, **1993**.
- [37] Watanabe K., Niimura K., Esculetin derivatives and pharmaceutical Composition, EP 0 614 896 A1, **1994**.
- [38] Watanabe K., Niimura K., Yamazaki T., Maruoka. Esculetin derivatives, method for manufacture thereof, and pharmaceutical composition, EP (

- [39] Manach C., Regerat F., Texier O., Agullo G., Demigne C., Remesy C., Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research*, **1996**, **16** (3), 517-544.
- [40] Eugster C., Bioflavonol glycoside peroxy esters and their preparation for pharmacologically effective concentrations and ultramicroemulsions, WO9811876, **1996**.
- [41] Bok S.H., Jeong T.S., Lee S.K., Kim J.R., Moon S.S., Choi M.S., Hyun B. H., Lee C.H., Choi Y.K. Flavanone derivatives and composition for preventing or treating blood lipid level-related diseases comprising same. US 20010006978A1, **2001**.
- [42] Alcaraz L., Blanco S., Puig O., Tomas F., Ferretti, F., Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology*, **2000**, 205, 231-240.
- [43] Mantas A., Deretey E., Ferretti F. H., Estrada M. R., Csizmadia I. G., Structural analysis of flavonoids with anti-HIV activity, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **2000**, 504 (1-3), 171.
- [44] Matsubara K., Ishihara K., Mizushina Y., Mori M., Nakajima N., Anti-angiogenic activity of quercetin and its derivatives, *Letters in Drug Design & Discovery*, **2004**, 1, 329- 333.
- [45] Syuichi F., Kazutaka T., Shigeharu M., Antioxidant material, anti-deterioration agent and food or beverage, WO2006070810, **2006**.
- [46] Cavazza C., Antioxidant composition comprising propionyl L-carnitine and a flavonoid against throm-bosis and atherosclerosis, US2003206895, **2003**.
- [47] Gorou H., Cosmetic for fair-complexioned face containing fatty acid ester of Quercetin, JP 58131911, **1983**.
- [48] Levy M. C., Andry M. C., Microcapsule à paroi de flavonoïde reticule et composition en contenant, FR 2715582, **1994**.
- [49] Otto R. T., Geers B., Weiss A., Petersohn D., Schlotmann K., Schroeder K.L., Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrition, WO0179245, **2001**.
- [50] Pfluecker F., Buenger J., Driller H.J., Buchholz H., Roskopf R., Flavonoid verbindungen zur verwendung gegen oxidativen stress und uv-strahlung, EP 1205475 A1, **2000**.

- [51] Wolber R., Staab F., Max H., Wehmeyer A., Hadshiew I., Wenck H., Rippke F., Wittern K. P., Alpha-glucosylrutin, a highly effective flavonoid for protection against oxidative stress, *Alpha-glucosylrutin: Ein hochwirksames flavonoid zum schutz vor oxidativem stre*, **2004**, 2 (7), 580.
- [52] Amalia P., Flavonoid compounds and their pharmaceutical uses, US2004266699, **2004**.
- [53] Suk L. J., Woong K. J., Junoh K., Hoon S. H., Seop C. I., Flavonoid-deposited polimer composite particles and process from preparation of the same, and cosmetic compositions containing the same. WO2005049704, **2005**.
- [54] Markakis P., stability of anthocyanins in foods. In *anthocyanins as food colors*, Academic Press: New York, **1982**, 163-180.
- [55] Chen P., Zhong J., Zhang G., Fat-soluble tea polyphenol and esterification method productive process thereof, CN1231277, **1999**.
- [56] Shimmyo Y., Kihara T., Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activityrelationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1780, 819–825.

CHAPITRE III : METHODES DE MODELISATION MOLECULAIRE DES INTERACTIONS ENZYME-LIGAND

Contrairement au domaine classique de la chimie, la chimie computationnelle et la modélisation moléculaire sont relativement nouvelles. Malgré leurs récentes, ces méthodes sont de plus en plus utilisées. On classe les méthodes actuelles de calcul en plusieurs catégories selon le niveau de théorie qu'elles utilisent ou bien selon le type de calcul qu'elles réalisent. On distingue la **mécanique quantique (MQ)** et la **mécanique moléculaire (MM)** qui sont les deux approches limites par rapport au niveau de théorie utilisée. Une combinaison de ces deux approches existe également, la technique hybride de **mécanique quantique / mécanique moléculaire (MQ/MM)**. Les autres méthodes sont la **dynamique moléculaire (DM)** et la **modélisation de Monte Carlo**, les deux utilisant une approche de mécanique moléculaire pour explorer l'espace conformationnel des molécules et analyser leur comportement structural dans le temps. On distingue les calculs **single-point** et les **optimisations de géométrie** des molécules, les calculs de diverses **propriétés chimiques** ou les calculs de **recherche conformationnelle**. On peut utiliser chacune de ces approches aux différents niveaux de la théorie utilisée.

Ces méthodes permettent de fournir des informations qui ne sont pas fournies par l'expérience et joue donc un rôle complémentaire à celui de la biochimie expérimentale.

III-1- Mécanique moléculaire

Les méthodes de mécanique moléculaire (MM) utilisent les lois de la physique classique pour la prédiction des structures et de leurs propriétés, comme l'énergie. Au même titre que les méthodes de MQ, les méthodes de MM utilisent une alternative à l'approximation de Born-Oppenheimer, mais les électrons ne sont pas explicités dans le calcul. Cette simplification assume que les électrons dans la molécule sont répartis dans leurs distribution optimale, et seuls les positions des noyaux sont prise en considération pour la résolution du problème chimique particulier. La molécule est alors mécaniquement simplifiée à un ensemble de masses

auxquelles des charges ont été attribuées. Ces masses interagissent entre eux par des forces classiques, décrites par des fonctions d'énergie potentielle. Les effets électroniques sont simplifiés, et inclus dans le champ de forces pour certains atomes spécifiques.

III-1-1- Champ de force

Un champ de force utilise généralement un ensemble d'équations pour définir comment l'énergie potentielle du système varie en fonction de la position des atomes. Le champ définit aussi les propriétés « chimiques » pour chaque atome (en prenant en compte son environnement chimique), telles que la charge partielle, l'hybridation ou le rayon de Van der Waals. En fin, le champ de force définit les paramètres spécifiques, telles que les longueurs, les angles et les torsions de liaison, les barrières de rotation des angles définies par la constantes de force. Ces valeurs sont généralement importées à partir de données expérimentales ou de calcul *ab initio*.

Le théorème fondamental de la MM est que l'énergie potentielle totale (E_{tot}) peut être considérée comme la somme de plusieurs contributions (1) :

$$E_{tot} = E_{stretch} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdW} + E_{elstat} + E_{cross} \quad (1)$$

$E_{stretch}$ est la fonction d'énergie pour l'étirement d'une liaison entre deux atomes, généralement définie par une fonction d'oscillateur harmonique, E_{bend} est la fonction d'ouverture d'un angle (généralement harmonique), E_{tors} représente la fonction pour la variation des torsions, i.e. les rotations autour des liaisons, E_{vdW} , E_{elstat} et E_{cross} représentent les fonctions pour les interactions de Van der Waals, électrostatiques et les termes croisés. Les interactions de Van der Waals sont décrites, par exemple, par le potentiel de Lennard-Jones [1], les interactions électrostatiques par une simple loi de Coulomb, et les interactions croisées représentent les interactions spécifiques, comme l'étirement-flexion ou torsion-tension.

Il est important de noter que les champs de forces constituent une approche purement empirique. Ils sont paramétrés de manière à ce que l'ensemble des

différentes contributions permette de reproduire une série de résultats expérimentaux. Un champ doit donc toujours être considéré comme une entité indivisible et il est exclu de combiner les termes et/ou les paramètres de deux champs dans l'espoir d'obtenir un meilleur ensemble [2]. En outre, le paramétrage vise souvent à ce que le champ de forces puisse traiter de manière réaliste une catégorie particulière de composés. On peut ainsi trouver des champs destinés plus spécialement à la modélisation de petites molécules organiques [3] de macromolécule [3], de nucléotides [4] ou encore de complexes organométallique [3]. Il est donc dans un premier temps important de vérifier si le champ choisi est adapté au système à étudier.

III-1-2- Différents champs de force en mécanique moléculaire

Différents champs de force utilisent le même type de termes énergétiques mais paramétrés de manières différentes. Les champs de forces en MM peuvent être groupés en trois classes principales [5] :

- Champs de force contenant uniquement les termes harmoniques.
- Champs de force utilisant les termes d'ordre supérieur (cubique, quadratique,...).
- Champs de force suggérés par *Allinger et col.* [6] ne considérant pas que les termes de la mécanique moléculaire classique mais aussi les effets chimiques comme l'électronégativité.

- **MM2/MM3/MM4 :**

MM2 est le premier champ de force développé par Allinger et col. [7-8-9]. Il a été conçu au début pour les molécules simples (alcane, alcène, alcyne non conjugués, amine...), mais ses versions améliorées MM3 (1989) [10] et MM4 (1996) [11] lui permettent de traiter des molécules organiques de plus en plus complexes.

- **OPLS :**

Le programme OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations), comme l'indique son nom, est conçu pour optimiser le potentiel qui permet la description des propriétés de solvation. Il est écrit par W. L. Jorgensen et J. Tirado Rives [12].

- **GROMOS** :

GROMOS (Groningen Molecular Simulation Program Package), est écrit par Van Gusteren [13] et conçu spécialement pour les biomolécules en milieu aqueux en vue de l'étude des interactions entre les molécules d'eau et les groupements polaires des protéines.

- **CHARM (Bio+)** :

Développé par Karplus et col [14-17], pour le calcul de biomolécules. Son concept est semblable à celui d'AMBER. Bien qu'au début, ce champ de force est conçu pour les aminoacides et les protéines, maintenant il traite d'autres biomolécules.

- **SPASIBA** :

(Spectroscopic Potential Algorithm for Simulating biomolecular conformational Adaptability), élaboré par Gérard Vergoten et col. (1995). Il combine le champ de force spectroscopique modifié de Urey-Bradly-Shimanouchi [18] et le champ de force AMBER. Il permet de trouver les structures, les énergies de conformation et les fréquences vibrationnelle au minimum énergétique d'une molécule [19].

- **EMO** :

Le programme Emo (Energy Of Molecule), est développé par B. Blaive [20-23], il est basé sur le champ de force MM2. Il est articulé autour de trois menus :

- Menu 1 : entrée de la molécule à l'aide d'un clavier.
- Menu 2 : manipulation géométrique sur la molécule.
- Menu 3 : minimisation de l'énergie par mécanique moléculaire.

- **AMBER** :

AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement), a été décrit par Kollman [24]. Le champ est paramétré pour les protéines et les acides nucléiques (UCSF, 1994). Il a été utilisé pour les polymères et pour d'autres petites molécules.

Dans le cadre de ces travaux, nous utiliserons ce champ de force, puisque on va traiter les protéines.

Du point de vue du temps de calcul, l'ensemble des approximations utilisées rendent les calculs de MM beaucoup moins exigeant que les calculs de MQ. On peut donc appliquer ces méthodes à un plus grand nombre de système, y compris les biomolécules (protéines, acides nucléiques).

II-2- Docking moléculaire

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques [25-26], la transmission ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques [27–30]. Connaître la manière dont les protéines interagissent avec d'autres entités biochimiques est une étape essentielle pour comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées. Le développement d'approches prédictives ouvre la voie à la conception assistée par ordinateur de systèmes protéiniques aux propriétés modifiées [31–33] et présente donc un intérêt indéniable pour la recherche et l'industrie pharmaceutique et médicale.

C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom "amarrage moléculaire" ou "docking", ont été développées. Il est à noter que les substrats et les inhibiteurs sont définis par le terme génériques de "ligand", tandis que le terme "récepteur" est utilisé pour la cible sur laquelle le ligand va se fixer, que ce soit une enzyme ou un récepteur protéique.

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Les forces intervenant dans la formation du complexe peuvent être de nature stérique, électronique ou les deux avec des contributions différentes.

Le premier modèle de reconnaissance moléculaire fut proposé par Emile Fischer en 1894. Il s'agit du modèle clé-serrure où la reconnaissance est stérique. Le

ligand s'encastre dans la macromolécule biologique de manière rigide comme une clé dans une serrure. Cette reconnaissance moléculaire est spécifique [34] et s'utilise par modélisation moléculaire dans le cas du docking rigide.

Une amélioration de ce modèle a conduit à celui de Koshland [35]. Dans ce cas, il y a une reconnaissance moléculaire commune avec adaptation des formes du ligand et du récepteur. Ce modèle a été implémenté dans les algorithmes de docking permettant la prise en compte de la flexibilité du ligand. Il s'ensuit la sélection d'une conformation privilégiée des 2 protagonistes pour parvenir à une complémentarité préférentielle de l'interaction ligand-récepteur. Les états conformationnels choisis lors de l'interaction ne sont pas nécessairement ceux de plus basse énergie en solution, mais des états transitoires stabilisés par celle-ci [36]. Les complexes formés sont alors plus stables que les formes dissociées. Cette association intermoléculaire est stabilisée par plusieurs effets et des liaisons non covalentes. Au niveau du processus biochimique, elles s'expriment par différentes interactions: électrostatiques, hydrophobiques, de Van der Waals et des ponts hydrogène.

Les interactions de Van der Waals sont des dipôles non permanents de faible rayon d'action (Figure 1). Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice.

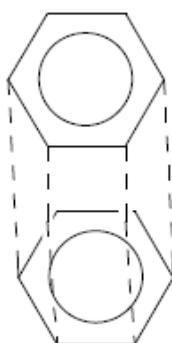


Figure 1: Interactions de Van Der Walls

Les ponts hydrogène avec une force de l'ordre de 2 à 4 Kcal/mol agissent, dans les systèmes biologiques, à très courte distance (0,8 à 2,8 Å) entre un H lié à

un O ou un N avec un O ou un N (Figure 2). Ils sont peu nombreux et s'adaptent très bien à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°).

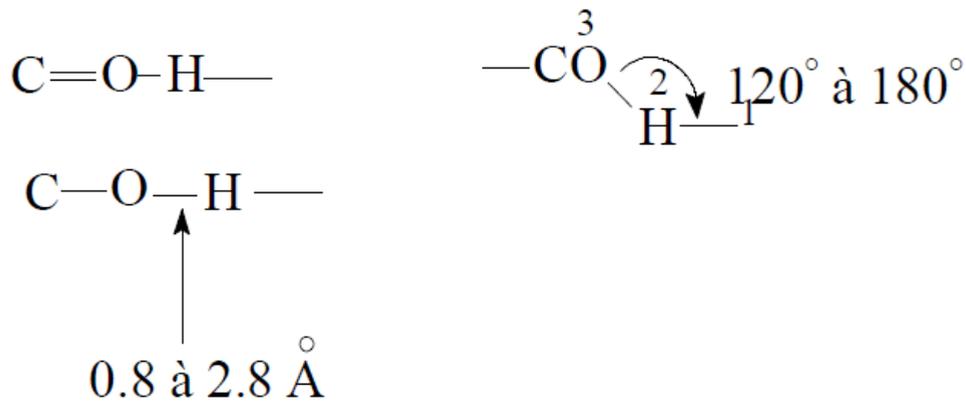


Figure 2 : ponts hydrogène

Les interactions électrostatiques agissent à plus grande distance entre dipôles chargés. La distance pour une liaison saline, par exemple, est de 3,7 à 4,5 Å (Figure 3), et sa force est de l'ordre de 8 Kcal/mol. En présence de solvant, ces interactions sont favorisées du fait de la polarité et de la petite taille de la molécule d'eau.

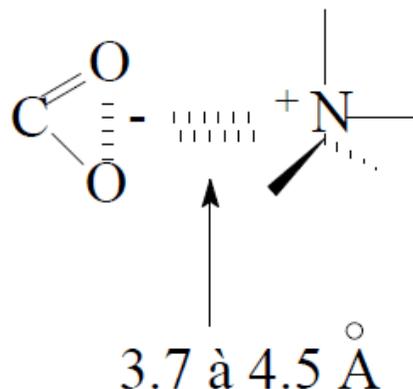


Figure 3 : Interaction électrostatiques

En docking moléculaire, la désolvatation n'est que partiellement compensée par la formation des ponts hydrogène et des interactions électrostatiques. Ces

derniers, jouant un rôle primordial dans la spécificité de l'interaction ligand-récepteur.

Au contraire, la désolvatation provoquée par enfouissement des groupements non polaires à l'intérieur du complexe constitue l'effet hydrophobe [37]. Il en résulte un gain d'entropie au profit d'une meilleure stabilité du complexe formé. La reconnaissance moléculaire est donc la résultante de l'arrangement géométrique des 2 protagonistes et de l'échange électronique.

Afin d'obtenir le minimum global d'énergie d'interaction entre le ligand et le récepteur, la plupart des méthodes d'amarrage moléculaire repose donc sur des minimalisations d'énergie, des recuits simulé, des calculs de Monte-Carlo, de complémentarité de surface, d'énergie libre ou encore sur des algorithmes génétiques. Parmi tous les programmes d'amarrage moléculaire qui ont déjà prouvé leur efficacité, comme GOLD [38], FlexX [39] ou bien DOCK [40], nous avons choisi d'utiliser pour notre approche β -sécrétase- flavonoides le programme AutoDock 3.0 [41].

REFERENCES :

- [1] Lenanard-Jones J.E., Proc.Camb.Phil.Soc, **1931**, 27, 469.
- [2] Lipkowitz K. B., Abuses of molecular mechanics: Pitfalls to avoid. *J. Chem.*
1995, 72, 1070-1075.
- [3] Biosym/MSI, Discover, user guide, ed. Biosym/MSI., San Diego, **1995**.
- [4] Weiner S. J., Kollman P. A., Nguyen D.T., Case D. A., An all-atom force field for simulations of proteins and nucleic acids, *J. Comp. Chem.*, **1986**, 7, 230.
- [5] Dinur U., Hagler A., *Reviews in computational Chemistry*, (K. B. Lipkowitz, D. B. boyd, Eds). VCH, Weinheim. , **1991**, 2, 99.
- [6] Allinger N. L., Chen K., Katzenellenbogen J. A., R.Wilson S., M.Anstead G., *J. Como. Chem.*,**1996**, 17, 747.
- [7] Allinger N. L., *Adv. Phys .Org. Chem*, **1976**, 13, 1.
- [8] Allinger N. L., *J. Am. Chem. Sos*, **1977**, 99, 8127.
- [9] Burkert U., Allinger N. L., *Molecular Mechanics*, ACS Monograph. American Chemical Society, Washington DC, **1982**, 177.
- [10] Allinger N. L., Yuh Y. H., Li J. H., *J. Am .Chem. Soc*, **1989**,111, 8522.
- [11] Allinger N. L., Chen K., Lii J. H., *J. Comp. Chem*, **1996**, 17, 642.
- [12] Jorgensen W. L., Rives J. T., *J. Am. Chem. Soc*, **1988**, 110, 1657.
- [13] Van Gusten W. F., Karplus M., *Macromolecules*, **1982**, 15, 1528.
- [14] Brooks B. R., bruccoleri R., Olafson E. B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M., *J. Comp.Chem*, **1983**, 4, 187.

- [15] Roterman I. K., Lambert M. H., Gibson K. D., Scheraga H. A., *J. Biomol. Struct. Dyn*, **1989**, 7, 421.
- [16] Momany F. A., Ronte R., *J. Comp. Chem*, **1992**, 13, 888.
- [17] Smith J. C., Karplus M., *J. Am Chem. Soc*, **1992**, 114, 805.
- [18] Shimanouchi T., *PureAppl. Chem*, **1963**, 7, 131.
- [19] Tristram F., Durier V., Vergoton G., *Journalof Molecular Structure.*, **1996**, 378, 249-259.
- [20] Bouraoui A., Fathallah M., Blaive B., Gallo R., *J.Chem.Soc. Perkin Trans.* **1990**, 2, 1211-1214.
- [21] Bouraoui A., Fathallah M., M'Henni F., Blaive B., R. Gallo., Modeling of Molecular Structures and Properties, *Proceeding of an International Meeting Nancy, France*, 11-15, Septembre **1989**, ed, J.L. Rivail., Studies in Physical and Theoretical chemistry, 71,381-393.
- [22] Zinelabidine A., Bouraoui A., Fathallah M., M'Henni F., Blaive B., Gallo R., *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1993**, 286, 267-274.
- [23] Blaive B., Legsaï G., Lai R., *J. Mol. Struct.* **1995**, 354, 245-250.
- [24] Weiner S. J., A.Kollman P., Nguyent T., Case D. A., *J. Comput .Chem.* **1986** , 7, 230.
- [25] Rosen E. D., O'Donnell A. L., Koenig R. J., *Mol. Cell. Endocrinol*, **1991**, 78, C83-C88.
- [26] Roberts M. R., *Curr. Opin. Plant Biol*, **2000**, 3, 400–405.
- [27] Pawson T., Nash P., *Genes Dev*, **2000**, 14, 1027–1047.

- [28] Filman D. J., Bolin J. T., Matthews D. A., Kraut J., *J. Biol. Chem*, **1982**, 257, 13663–13672.
- [29] Héroux A., White E. L., Ross L. J., Kuzin A. P., Borhani D. W., *Structure*, **2000**, 8, 1309–1318.
- [30] Zacharias N., Dougherty D. A., *Trends Pharmacol. Sci*, **2002**, 23, 281–287.
- [31] Manssour Fraga C. A., Barreiro E. J., *Curr. Drug Ther*, **2008**, 3, 1–13.
- [32] Marco E., Gago F., *ChemMedChem*, **2007**, 2, 1388–1401.
- [33] Fox T., Brennan D., Austen D. A., Swalley S. E., Coll J. T., Raybuck S. A., Chambers S. P., *Curr. Protein Pept. Sc*, **2007**, 8, 439–445.
- [34] Fischer E., Einfluss der Configuration auf die wirkung der Enzyme. *Ber*, **1894**, 27, 2985–93.
- [35] Koshland DE Jr. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1958**, 44, 98–104.
- [36] Foote J., Milstein C., Conformational isomerism and the diversity of Antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 10370–74.
- [37] Kauzmann W., Some factors in the interpretation of protein denaturation, *Adv. Protein Chem*, **1959**, 14, 1–63.
- [38] Jones G., Willett P., Glen R. C., Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation, *J Mol Biol*, **1995**, 245, 43-53.
- [39] Rarey M., Wefing S., Lengauer T., Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *J Comput Aided Mol Des*, **1996**, 10(1), 41-54.
- [40] Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E., A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *J Mol Biol*, **1982**, 161, 269-288.

[41] Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew, R. K., Olson A. J., Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function, *J Comp Chem*, **1998**, 19, 1639-1662.

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

L'objectif du présent travail est d'étudier à l'aide programme Auto-Dock3, Ce calcul a été effectué au niveau du centre de recherche CERMAV-Grenoble-France.

IV-1- LES LIGANDS

Dans ce travail, nous nous sommes limités à deux types de molécules les plus représentatifs de la famille des flavonoïdes : les flavones et flavonols. Ces molécules interviennent dans la quasi-totalité des mécanismes cités précédemment et se trouvent être l'objet de notre travail. Leurs structures sont représentées dans la figure 1.

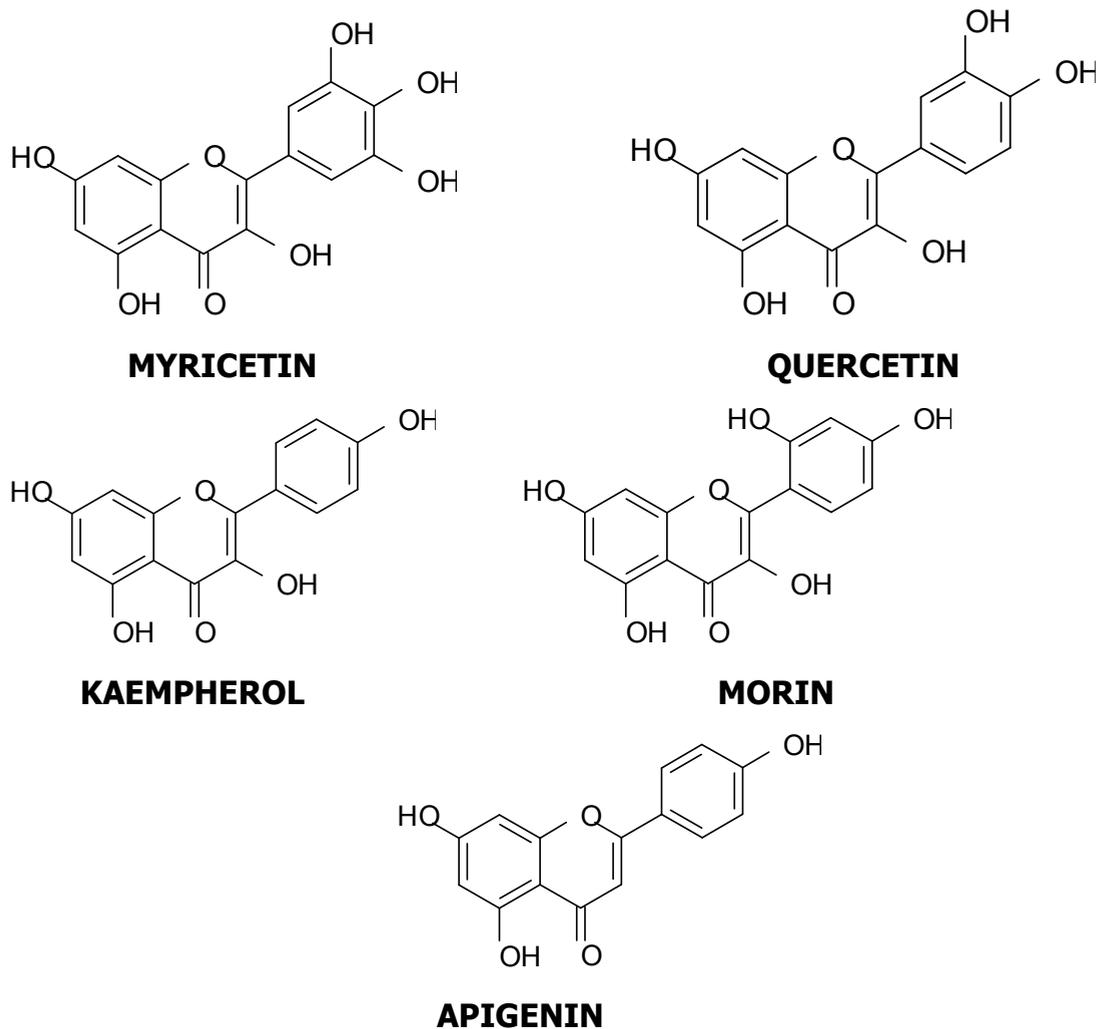


Figure 1 : Structures des flavonoïdes mise en jeu dans notre travail

La structure et l'optimisation des flavonoïdes ont été effectuées par le logiciel sybyl.

IV-2- SYBYL

Quand aucune référence n'est disponible, il est possible, de créer la molécule de manière totalement artificielle. Cette étape est faite avec le programme de construction moléculaire Sybyl (version SYBYL 7.3) [2]. Ils possèdent une banque d'atomes sous différents états d'hybridation permettant de construire tous les groupements chimiques éventuels. Il est possible de déterminer exactement les torsions. Ce type de construction ne peut se faire sans une étape de minimisation importante de l'énergie potentielle, durant laquelle le choix du champ de force est primordial. Pour les flavonoïdes comme pour les composés de synthèse, cette solution est la seule qui nous permet d'obtenir une structure.

IV-3- LA CIBLE ENZYMATIQUE

Afin d'obtenir de manière expérimentale la structure d'une protéine, plusieurs étapes sont nécessaires. Il faut isoler le gène, le cloner et l'exprimer dans un organisme adéquat, puis purifier la dose de protéine obtenue et parfois éliminer le fragment rajouté à la protéine pour la chromatographie d'affinité [3]. Ces étapes de biologie moléculaire restent encore délicates et limitent le travail. La structure tridimensionnelle est le plus souvent obtenue à partir de l'échantillon par diffraction de rayons X. pour ces méthodes, les molécules doivent auparavant être préparées sous forme de cristal, mais la cristallogénèse reste une étape hautement empirique et difficile [4]. La possibilité d'obtenir des cristaux complexe protéine-ligand est bien plus intéressante mais aussi plus difficile à réaliser. La plupart des structures obtenues sont disponibles via la banque de donnée « Protein data Bank (PDB) » [5], le nombre de structures d'une même molécule avec ou sans ligand permet d'avoir une information pertinente. Néanmoins certains cas restent difficiles car il existe dans la PDB peu ou pas de structures en interaction avec les inhibiteurs.

L'enzyme choisit dans notre étude est la β -sécrétase. Cette enzyme a été cloné et caractérisé en 1999 par plusieurs groupes de chercheurs indépendants, elle contribuerait à la formation de la protéine β -amyloïde [6-9]. Le téléchargement de la β -sécrétase (figure 2) a été fait à partir de la base de données Bookhaven Protein Data Bank (code d'accès 2B8L). La structure tridimensionnelle de la β -sécrétase a été obtenue par diffraction en rayon X avec une résolution (1.70 Å).

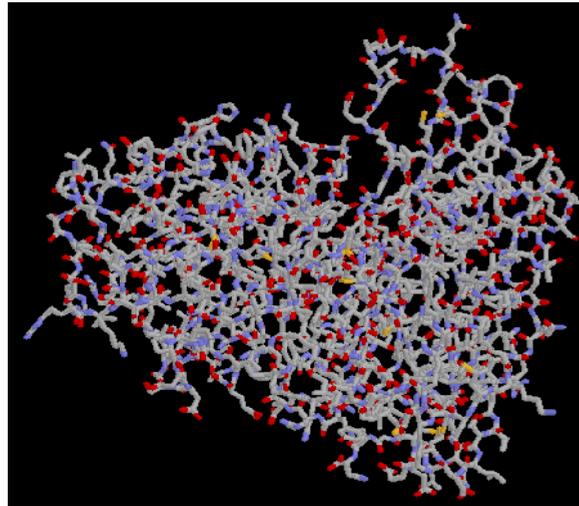


Figure 2 : Structure de la β -sécrétase code PDB 2B8L

Dans ce travail l'étape du docking moléculaire qui consiste la formation des complexes β -sécrétase- Flavonoïdes a été réalisé par le programme AUTODOCK [10-11] (La version utilisée est AUTODOCK 3.05).

IV-4- AUTODOCK 3.05

AUTODOCK 3.05 est un programme de simulation d'amarrage de ligand flexible sur un récepteur rigide. Il est constitué d'un ensemble de sous-programmes et d'utilitaires exécutés en ligne de commandes sous environnement Unix. Il comprend 3 parties : AutoTors, AutoGrid et AutoDock.

La procédure AUTODOCK se décompose en cinq étapes :

- **Préparation des fichiers de coordonnées atomiques du ligand et de la macromolécule ;**
- **Définition des pivots flexibles du ligand ;**
- **Calcul des grilles de potentiel d'interaction du récepteur ;**
- **Recherche des solutions d'amarrage ;**
- **Analyse des résultats.**

REFERENCES

- [1] Shimmyo Y., Kihara T., Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activityrelationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1780, 819–825.
- [2] Hirst JD., Vieth M., Klinski A., Brooks CL., Sybyl. 1988. Tripos associate, assign St Louis, Mo, USA, 189-213. 85, Assessing energy functions for flexible docking, *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1612-1622.
- [3] Edwards AM., Arrowsmith CH., Christendat D., Dharamsi A., Friensen JD., Greenblatt JF., Vedadi M., Protein production: feeding the crystallographers and NMR spectroscopists, *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, 7, 970-972.
- [4] Abola E., Kuhn P., Earnst T., Stevens RC., Automation of X-ray crystallography, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 973-977.
- [5] Siegal G., Van Duynhoven J., Baldus M., Biomolecular NMR: recent advances in liquids, solids and screening, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, 3, 530-543.
- [6] Hussain I., Powel D. I., et al., Identification of a novel aspartic protease (Asp2) as beta-secretase, *Mol Cell Neurosci*, **1999**, 14(6), 419-27.
- [7] Sinha S., Anderson J. P., et al., Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain, *Nature*, **1999**, 402(6761), 537-40.
- [8] Vassar R., Bennett B. D., et al., Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science*, **1999**, 286(5440), 735-41.
- [9] Yan R., Bienkowski M. J., et al., Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity, *Nature*, **1999**, 402(6761), 533-7.

[10] Morris G.M., Goodsell D.S., Huey R., and Olson A.J., Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4, *Journal of Computer- Aided Molecular Design*, **1996**, 10(4), 293-304.

[11] Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., and Olson A.J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry*, **1998**, 19(14), 1639-1662.

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

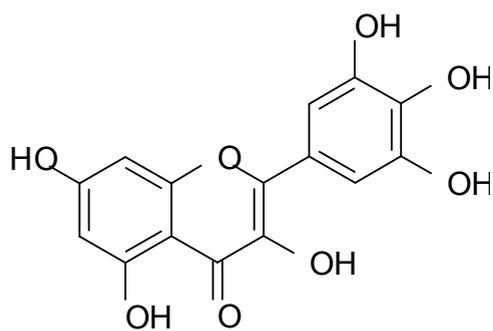
Ce travail consiste à étudier les interactions entre des inhibiteurs de type flavonoïdes (figure 1) et la β -sécrétase avec les méthodes de la modélisation moléculaire [1-2].

Les mécanismes réactionnels et interactions mises en jeu dans la catalyse enzymatique, la reconnaissance ou la complexation [3].

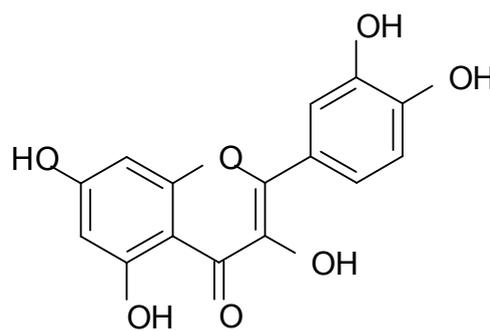
Dans ce chapitre nous avons englobé tous les résultats de calcul effectués dans cette étude.

La discussion que nous allons engager est basée sur les énergies d'interactions et les valeurs d'IC₅₀.

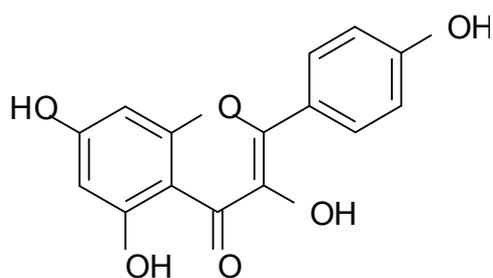
La formation des complexes et le calcul des énergies d'interactions sont réalisés par le programme AUTODOCK 3.05 [4-5].



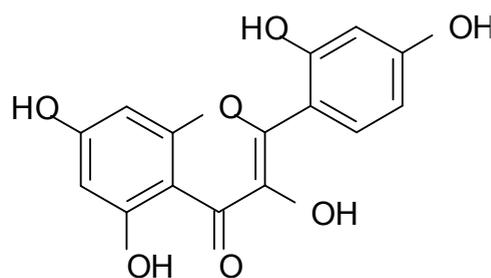
Myricetin



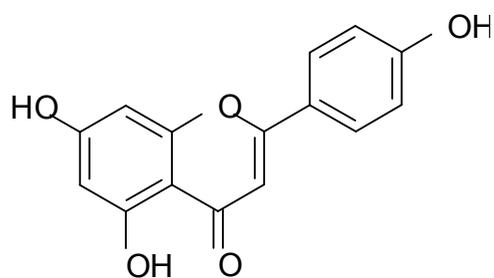
Quercetin



Kaempferol



Morin



Apigenin

Figure 1 : Structures des flavonoïdes

V-1- La démarche à suivre :

V-1-1- Téléchargement de la β -sécrétase :

Le téléchargement de la β -sécrétase [6-9] a été fait à partir de la base de données **Bookhaven Protein Data Bank** [10] (**code d'accès 2B8L**) elle est co-cristallisée avec l'inhibiteur **5HA** (**C₃₁ H₃₈ N₄ O₅ S**) (figure 2).

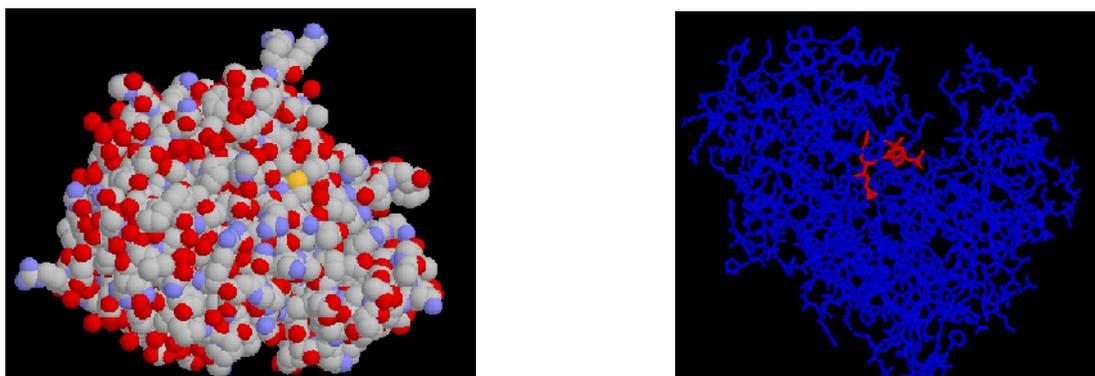


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la β -sécrétase

La structure tridimensionnelle de la β -sécrétase a été obtenue par diffraction en rayon X avec une résolution (1.70 Å). Les données de la co-cristallisation sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les données cristallographique de la β -sécrétase.

Classification	Poids moléculaire (KDa)	Polymère	Chaîne	Résolution (Å)
Hydrolase	45701.92	1	A	1.70

- Le domaine de protéase est (43-446 résidus).
- Le nombre de résidus est 379.
- Le nombre d'atomes est 2979.
- Le nombre de liaisons est 3098.

La séquence (structure secondaire : 13% hélice α (12 hélices; 56 résidus), 37% feuillet β (27 feuillet ; 152 résidus) des acides aminés de la β -sécrétase est représentée dans la figure 3.

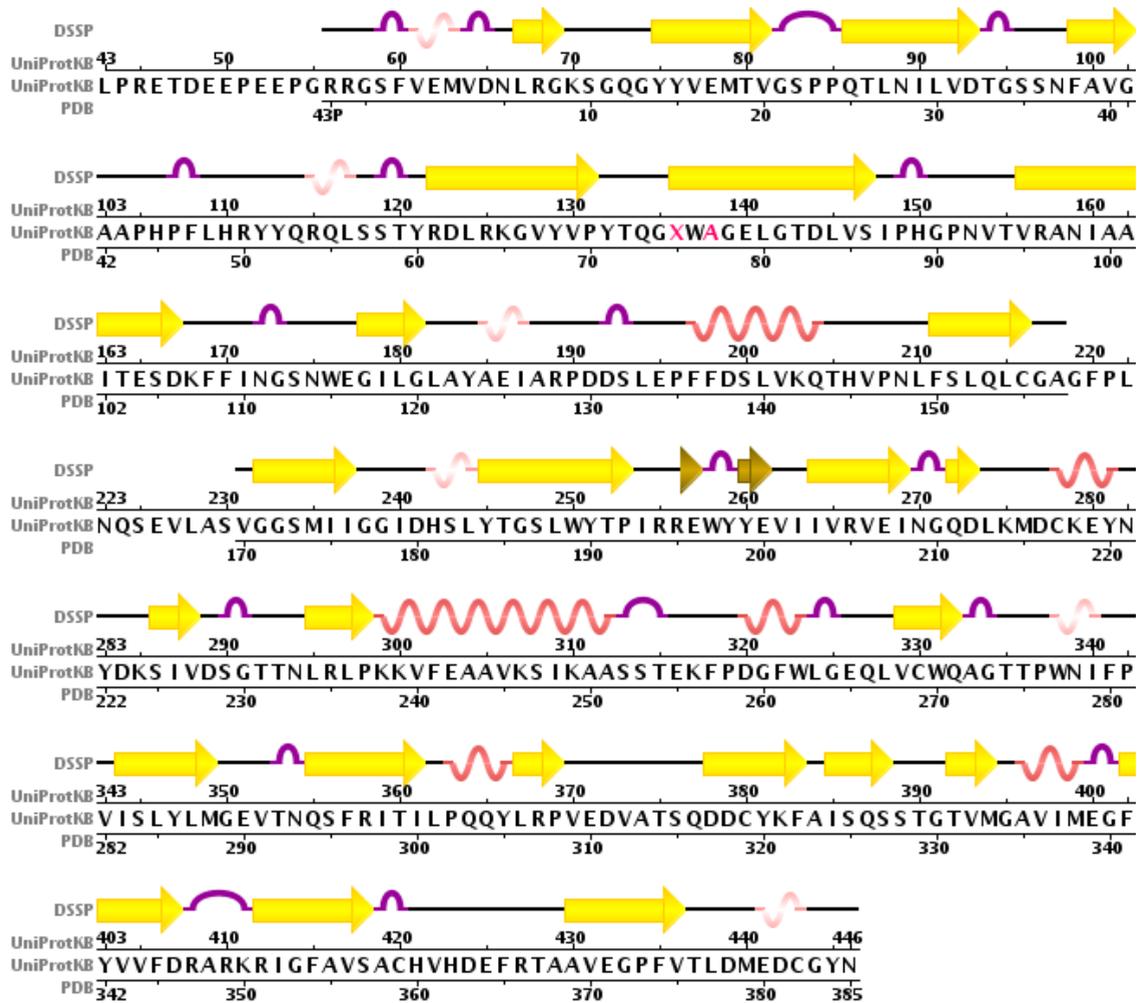


Figure 3 : Structure secondaire de la β -sécrétase

V-2- La procédure AUTODOCK

V-2-1- Préparation des fichiers

Dans cette étape on a représenté la macromolécule (β - sécrétase) avec ses hydrogènes polaires ainsi que les charges partielles de tous ses atomes. Cette opération a été effectuée avec le logiciel SYBYL [11] et son champ de force BIOPOLYMER. La protéine ainsi préparée est enregistrée dans un fichier au format *mol2* (SYBYL) (Figure 4) puis converti, avec l'utilitaire CNVMOL2TOPDBQ (fourni avec AUTODOCK), au format *pdbq* qui reprend le format *pdb* (*Protein Data Bank*) en y ajoutant une colonne pour les charges. On intègre ensuite les paramètres de solvation des atomes de la macromolécule avec l'utilitaire ADDSOL qui génère un fichier *pdbqs* utilisable par AUTOGRID.

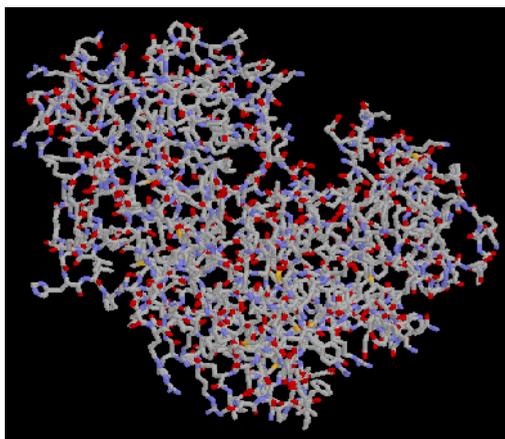
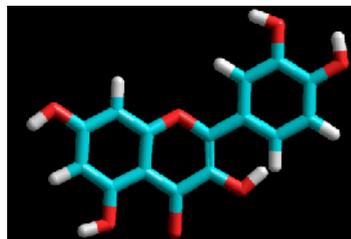


Figure 4 : Structure simplifiée de la β -sécrétase

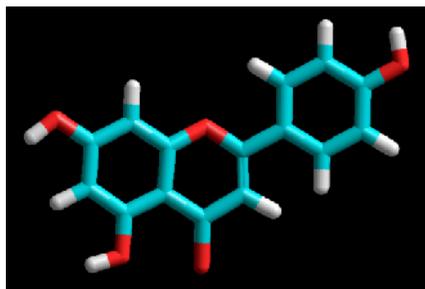
Le ligand doit comporter tous ses hydrogènes et toutes ses charges partielles. On a calculé ces charges avec SYBYL implémentant une méthode semi empirique AM1. Le ligand est d'abord enregistré au format *mol2* (Figure 5)



Myricetin.mol2



Quercetin.mol2

**Morin.mol2****Kaempferol.mol2****Apigenin.mol2****Figure 5: Structure des flavonoïdes représentés par SYBYL 7.3.**

V-2-2- Définition des pivots flexibles du ligand

Les pivots qui seront en libre rotation durant la simulation doivent être désignés et les carbones aromatiques doivent être renommés dans le fichier de structure. L'utilitaire DEFTORS exécute cette dernière opération automatiquement et permet à l'utilisateur de sélectionner les pivots libres parmi la liste des pivots existant. DEFTORS prend le fichier de coordonnées atomiques du ligand au format *mol2* et enregistre le résultat de son traitement au format *pdbq*.

V-2-3- Calcul des grilles de potentiels

Les grilles de potentiels sont calculées par le programme AUTOGRID selon les instructions du fichier de paramétrage qu'on lui fournit. Le fichier de paramétrage est un fichier texte dont l'extension est *gpf* (*Grid Parameters File*). Les paramètres, codés par des mots clé, indiquent :

- Les noms de fichiers du ligand et de la macro, aux formats *pdbq* et *pdbs* respectivement ;
- La position et les dimensions de la boîte ainsi que l'espacement entre les points de la grille (0,4 Å par défaut) ;

- Les noms des types d'atomes présents dans le ligand et pour lesquels il faut calculer une grille ;
- La valeur des constantes des différents termes à calculer.

Chaque grille calculée est enregistrée dans un fichier dont l'extension est *map*. Le fichier de paramètres peut être généré automatiquement, par l'utilitaire MKGPF3, à partir des fichiers du ligand et du récepteur. La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de ce ligand. Par conséquent, il est nécessaire d'éditer ce fichier généré pour modifier les paramètres de position et de dimension de la boîte afin de l'ajuster au mieux à la région du récepteur que l'on étudie. L'utilitaire MKBOX génère un fichier *pdb* des coordonnées de la boîte d'après les paramètres du fichier *gpf* ce qui permet de contrôler visuellement sa position par rapport au récepteur.

Les grilles ainsi calculées peuvent être réutilisées pour tout ligand ne comportant pas de nouveau type d'atome et devant explorer la même région de la macromolécule.

V-2-4- Recherche des solutions d'amarrage

C'est le programme AUTODOCK qui va faire cette recherche en fonction des paramètres qu'on lui transmet par l'intermédiaire d'un fichier *dpr* (*Dock Parameters File*). Les paramètres d'un calcul d'AUTODOCK sont :

- Les noms des fichiers contenant le ligand et les grilles de potentiels à utiliser ;
- L'état initial du ligand (position, orientation et conformation aléatoire ou précisée) ;

Un cycle d'amarrage s'arrête soit :

- Lorsque le nombre maximal de générations est atteint ;
- Lorsque le nombre maximal d'évaluation d'énergie est atteint ;
- Lorsque la population a convergé vers une unique solution.

A la fin de chaque cycle d'exploration, AUTODOCK enregistre la meilleure solution du docking du cycle c'est à dire le phénotype de l'individu de la dernière génération ayant la meilleure interaction avec le ligand.

V-2-5- Analyse des résultats

AUTODOCK peut faire une première analyse des résultats en regroupant les solutions en classes (clusters) en fonction de leur proximité spatiale. La mesure de la proximité entre deux solutions est calculée par la racine de la moyenne des carrés des écarts (*Root Mean Square Deviation* – RMSD) de leurs coordonnées atomiques. Si le RMSD entre deux molécules est inférieure à une distance seuil, ces deux solutions sont dans la même classe. Le seuil de distance est appelé « tolérance de classe » et sa valeur par défaut, pour AUTODOCK, est de 0,5 Å. Ce paramètre est transmis à AUTODOCK par le fichier de paramétrage (*dpr*) avant le lancement de l'amarrage. Le résultat de l'analyse par classes figure sous forme d'histogramme à la fin du fichier de résultats. La meilleure solution est celle de plus basse énergie et une convergence de toutes les solutions vers la même classe paraît souhaitable.

V-3- Résultats du docking moléculaire

V-3-1- Histogrammes résultants du docking moléculaire

- APIGENIN

Number of distinct conformational clusters found = 3, out of 100 runs,
Using an rmsd-tolerance of 0.5 Å

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter	Lowest Docked Rank	Energy	Run	Mean Docked Energy	Num in Clus	Histogram						
						5	10	15	20	25	30	35
1	-6.33		73	-5.93	10	#####						
2	-5.75		9	-5.51	43	#####						
3	-5.22		58	-4.98	47	#####						

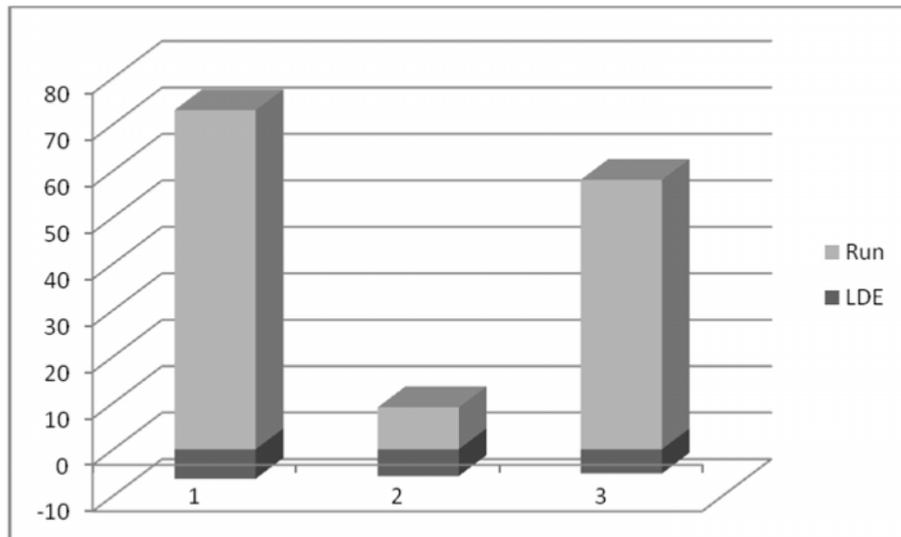


Figure 6: Nombre d'orientation dans l'espace (Run) en fonction de l'énergie minimale du docking (LDE)

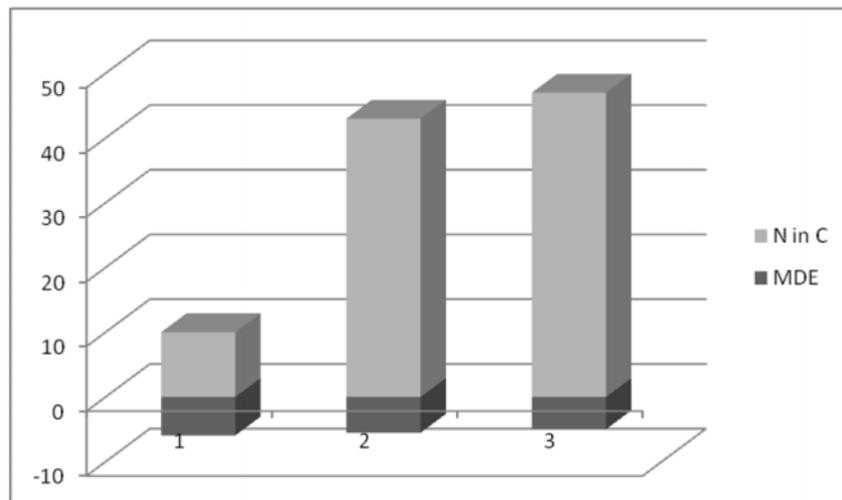


Figure 7: Nombre de regroupement (N in C) en fonction de l'énergie moyenne du docking (MDE)

L'histogramme de dock d' Apigenin montre que pour la première analyse de 100 poses de docking on a une classe comprend 10 complexes qui ont une même conformation pour une énergie moyenne ($E_{\text{Min.dock}}$) de -5.93 Kcal/mol, une deuxième classe avec 43 complexes de même conformation qui donne une énergie de -5.51 Kcal/mol et une troisième classe de 47 conformères avec $E_{\text{Min.dock}} = -4.98$ Kcal/mol. Entre ces trois valeurs des classes, les 10 complexes qui ont la plus petite $E_{\text{Min.dock}} = -5,93$ Kcal/mol représente la classe la plus stable.

Pour la deuxième analyse qui concerne les même dix conformères de même type de classe AUTODOCK a pu ressortir un seul complexe stable (figure 8) avec 73 orientations dans l'espace pour une énergie minimale du docking (énergie d'interaction) ($E_{\text{min.dock}} = -6.33$ Kcal/mol).

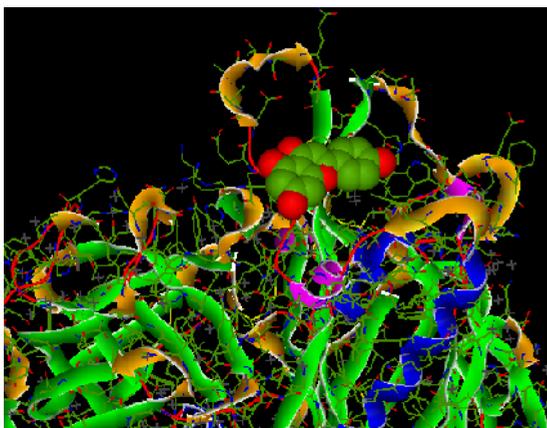


Figure 8 : Complexe β -sécrétase-Apigenin

La plus basse valeur du complexe β -sécrétase-Apigenin correspond à une meilleure stabilité relative aux autres complexes (β -sécrétase-Apigenin) (43 conformères pour 9 orientations dans l'espace) et (47 conformères pour 58 orientations).

- QUERCETIN

Number of distinct conformational clusters found = 4, out of 100 runs,

Using an rmsd-tolerance of 0.5 A

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Docked Energy	Run	Mean Docked Energy	Num in Clus	Histogram
1	-5.83	18	-5.63	12	#####
2	-5.44	28	-4.91	41	#####
3	-4.98	83	-4.56	3	###
4	-4.74	86	-4.68	44	#####

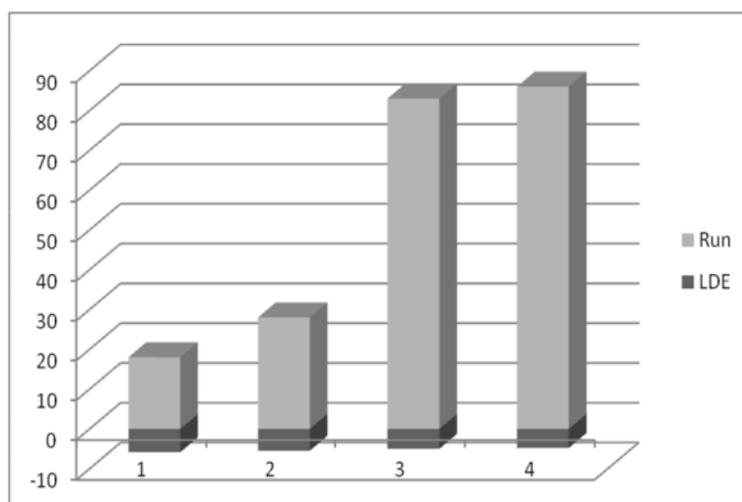


Figure 9: Nombre d'orientation dans l'espace (Run) en fonction de l'énergie minimale du docking (LDE)

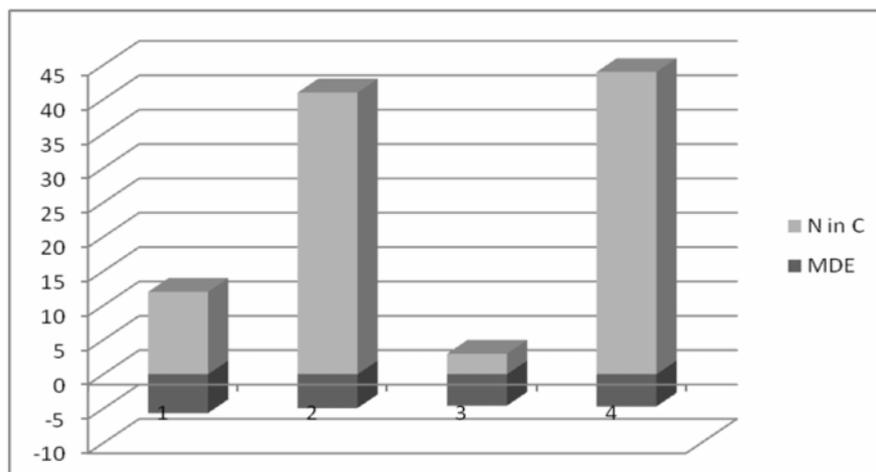


Figure 10: Nombre de regroupement (N in C) en fonction de l'énergie moyenne du docking (MDE)

L'histogramme de Quercetin montre que le complexe β -sécrétase-Quercetin (figure 11) est le plus stable de la classe qui contient 12 conformères et 18 orientations dans l'espace avec une énergie ($E_{\text{min.dock}} = -5.83$ Kcal/mol).

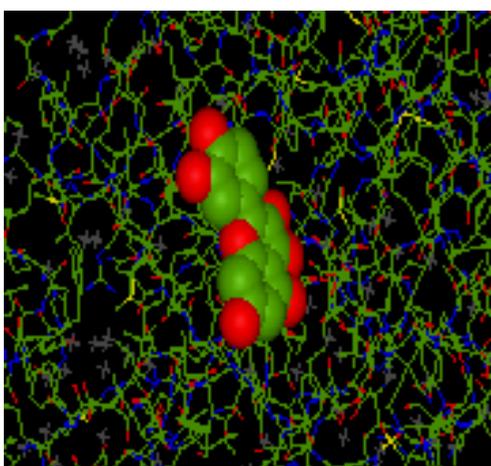


Figure 11: Complexe β -sécrétase-Quercetin

- KAEMPHEROL

Number of distinct conformational clusters found = 4, out of 100 runs,
Using an rmsd-tolerance of 0.5 A

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram
-ter	Docked		Docked	in	
Rank	Energy		Energy	Clus	5 10 15 20 25 30 35
1	-6.34	100	-5.94	20	#####
2	-6.24	86	-6.16	23	#####
3	-5.66	58	-5.57	55	#####
4	-5.66	85	-5.62	2	##

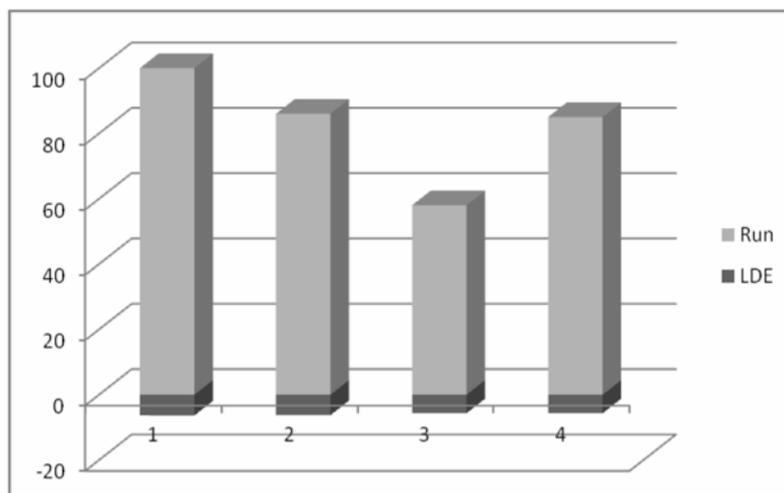


Figure 12: Nombre d'orientation dans l'espace (Run) en fonction de l'énergie minimale du docking (LDE)

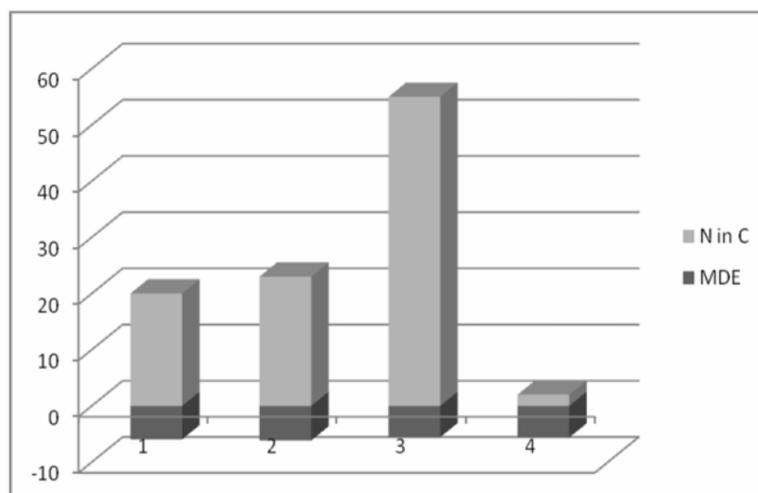


Figure 13: Nombre de regroupement (N in C) en fonction de l'énergie moyenne du docking (MDE)

Les énergies de l'histogramme de docking de Kaempherol montrent que le complexe Kaempherol- β -sécrétase (figure 14) de la classe de 20 conformères pour 100 orientations dans l'espace qui représente une énergie ($E_{\min.\text{dock}}$) de -6.34 Kcal/mol est le plus stable.

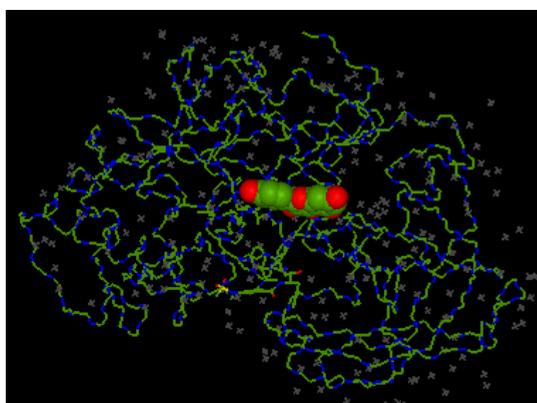


Figure 14 : Complexe β -sécrétase- Kaempherol

- MORIN

Number of distinct conformational clusters found = 4, out of 100 runs,
Using an rmsd-tolerance of 0.5 A

Runs: nombre pose de docking

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram
-ter	Docked		Docked	in	
Rank	Energy		Energy	Clus	5 10 15 20 25 30 35
					____:____ ____:____ ____:____ ____:____
1	-5.82	10	-5.58	21	#####
2	-5.78	18	-5.39	40	#####
3	-5.41	64	-5.33	2	##
4	-5.18	73	-5.06	37	#####

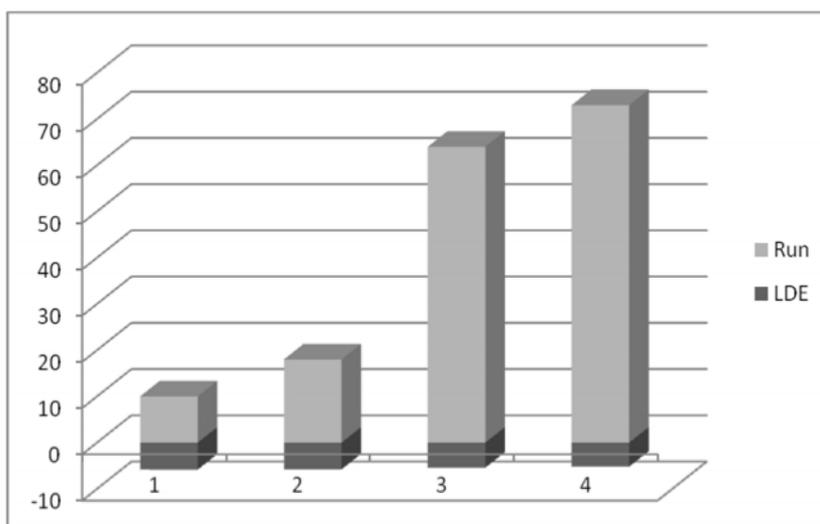


Figure 15: Nombre de regroupement dans l'espace (Run) en fonction de l'énergie minimale du docking (LDE)

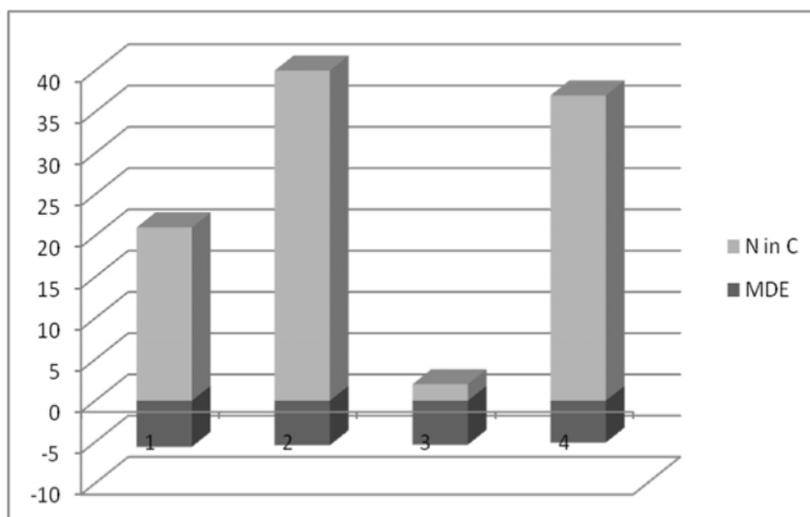


Figure 16: Nombre de regroupement (N in C) en fonction de l'énergie moyenne du docking (MDE)

On comparant les différents conformères de complexe Morin- β -sécrétase (figure 17) et les différentes orientations dans l'espace avec les différentes valeurs d'énergie on déduit que le conformère MORIN- β -sécrétase de la classe de 10 conformère pour 10 orientations ($E_{\text{min.dock}} = -5.82$ Kcal/mol) présente une meilleure stabilité.



Figure 17 : Complexe β -sécrétase- Morin

- MYRICETIN

Number of distinct conformational clusters found = 2, out of 100 runs,
Using an rmsd-tolerance of 0.5 Å

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram
-ter	Docked		Docked	in	
Rank	Energy		Energy	Clus	5 10 15 20 25 30 35
					: : : : : : :
1	-8.74	42	-8.70	99	#####
2	-8.34	52	-8.34	1	#

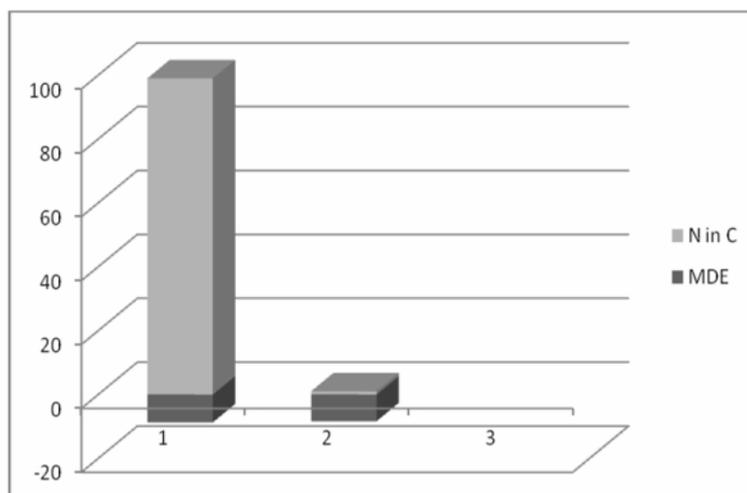


Figure 18 : Nombre de regroupement (N in C) en fonction de l'énergie moyenne du docking (MDE)

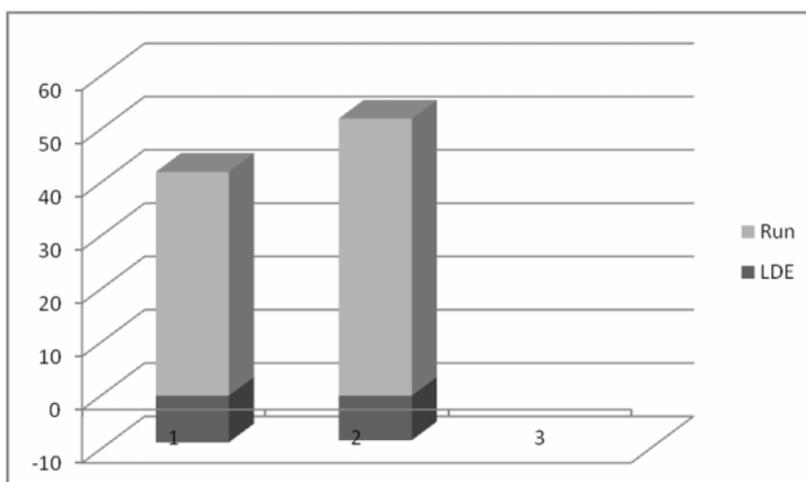


Figure 19: Nombre d'orientations dans l'espace (Run) en fonction de l'énergie minimale du docking (LDE)

Pour la Myricetin; dans la classe qui contient 99 conformères des complexes Myricetin- β -sécrétase (figure 20), le complexe le plus stable est celui qui a une énergie $E_{\text{min.dock}} = -8.74$ Kcal/mol pour 42 orientations dans l'espace.

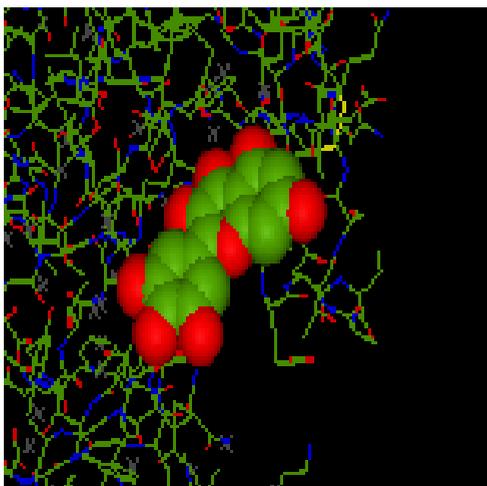


Figure 20 : Complexe β -sécrétase- Myricetin

V-3-2- Les interactions de liaison hydrogène entre les acides aminés du site actif et les ligands (flavonoïdes):

- **APIGENIN :**
- **INTERACTIONS ENTRE APEGENIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 47%**

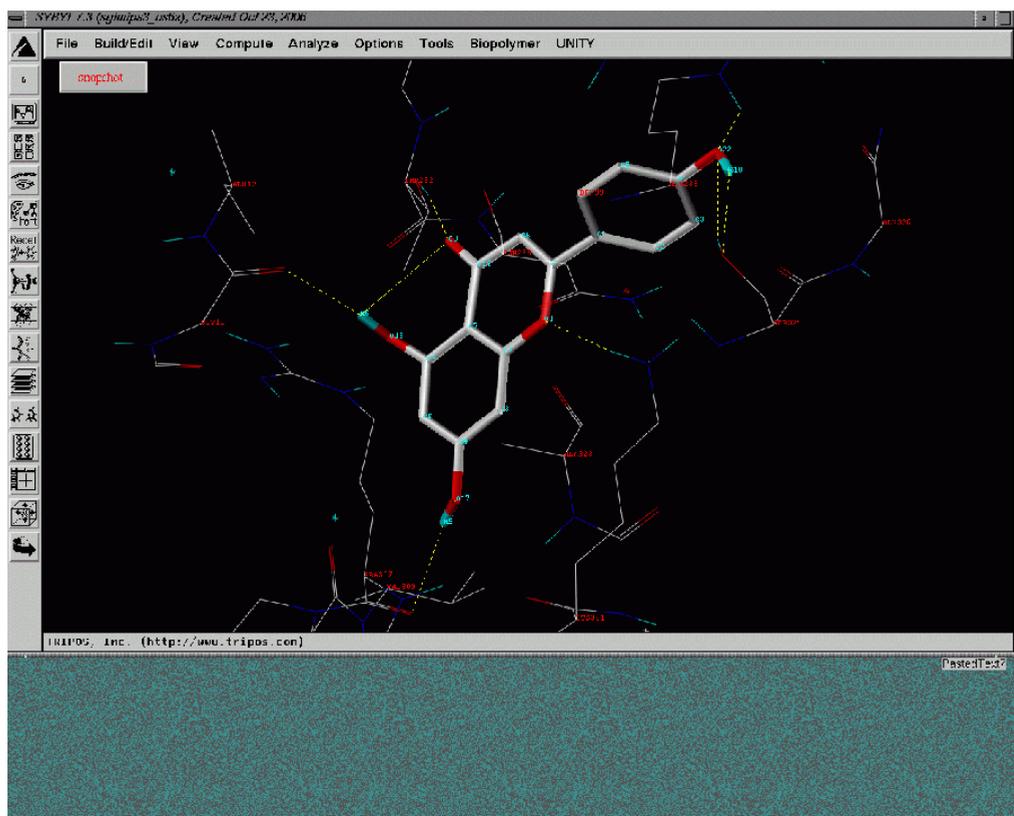
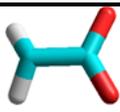
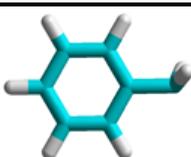
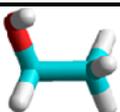
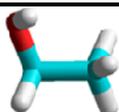


Tableau1: Interactions AA-Apigenin pour 47 poses de docking

Résidus	Asp 32	Phe 108	Thr 231	Thr 232
N° atomes ligand	H9	H5	H7	O23
Groupements d'AA				

- INTERACTION ENTRE APIGENIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 43%

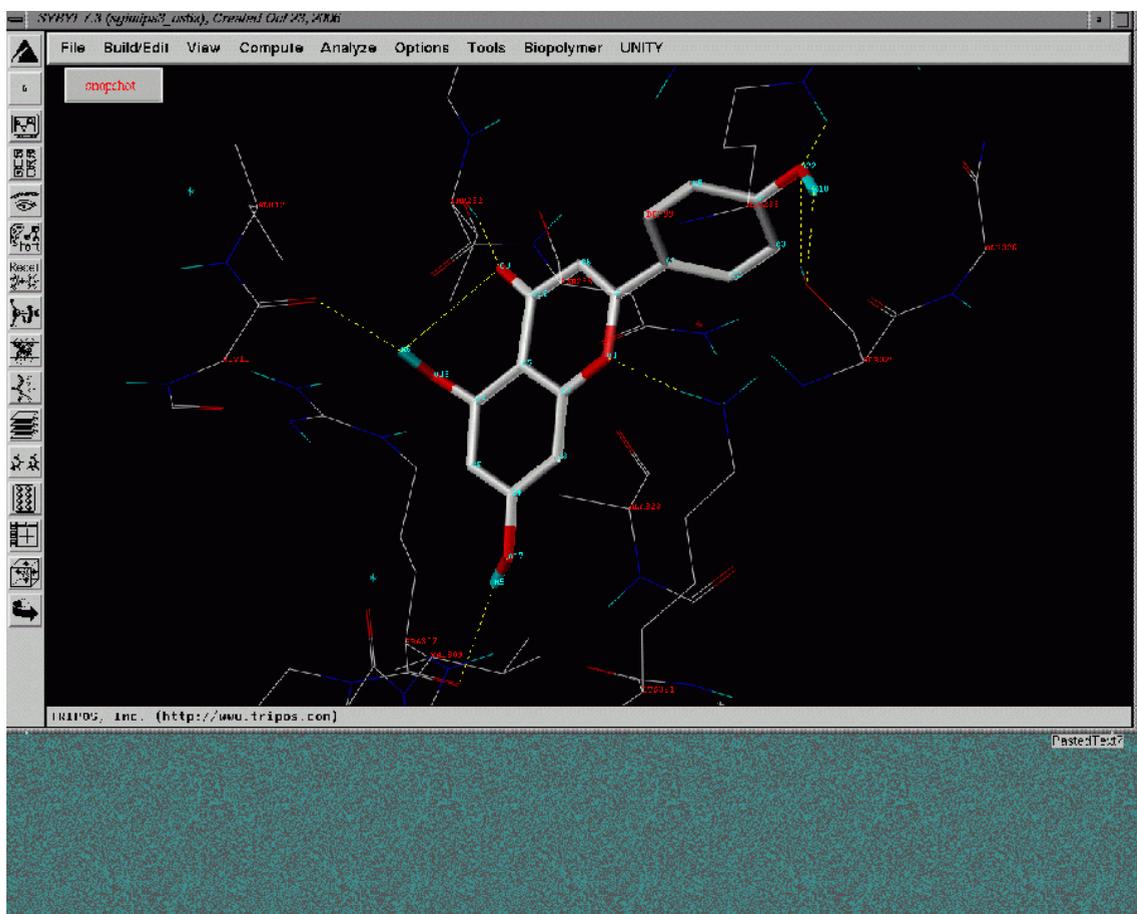


Tableau 2: Interactions AA-Apigenin pour 43 poses de docking

Résidus	Asp 32	Thr 72	Gln73	Asp 228	Thr 231
N° atomes ligand	H9	O20	H8	H10	H7
Groupements d'AA					

- INTERACTIONS ENTRE APIGENIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 10%

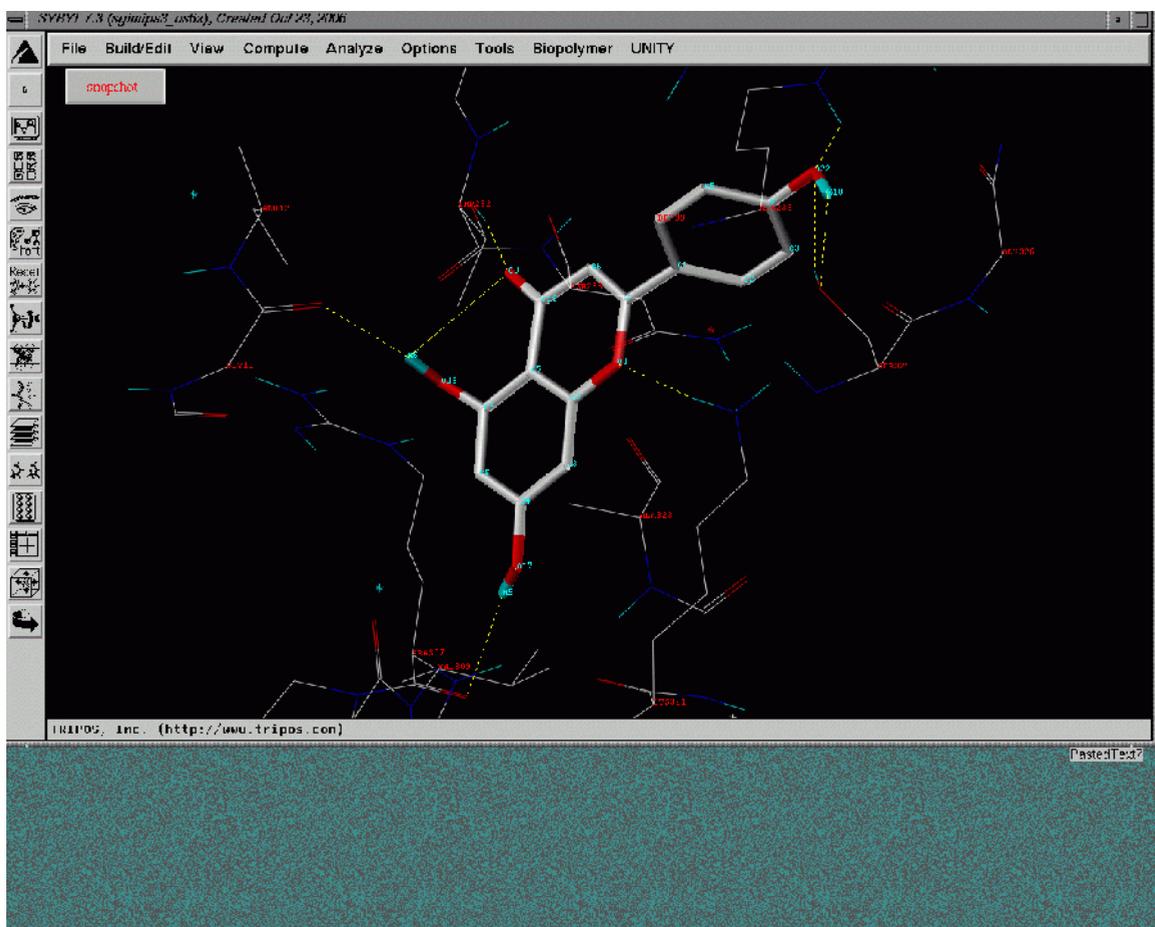
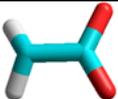
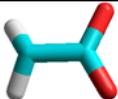


Tableau 3: Interactions AA-Apigenin pour 10 poses de docking

Résidus	Asp 32	Asp 32	Gly 230
N° atomes ligand	H9	O22	H7
Groupements d'AA			

- QUERCETIN
- INTERACTIONS ENTRE QUERCETIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 44%

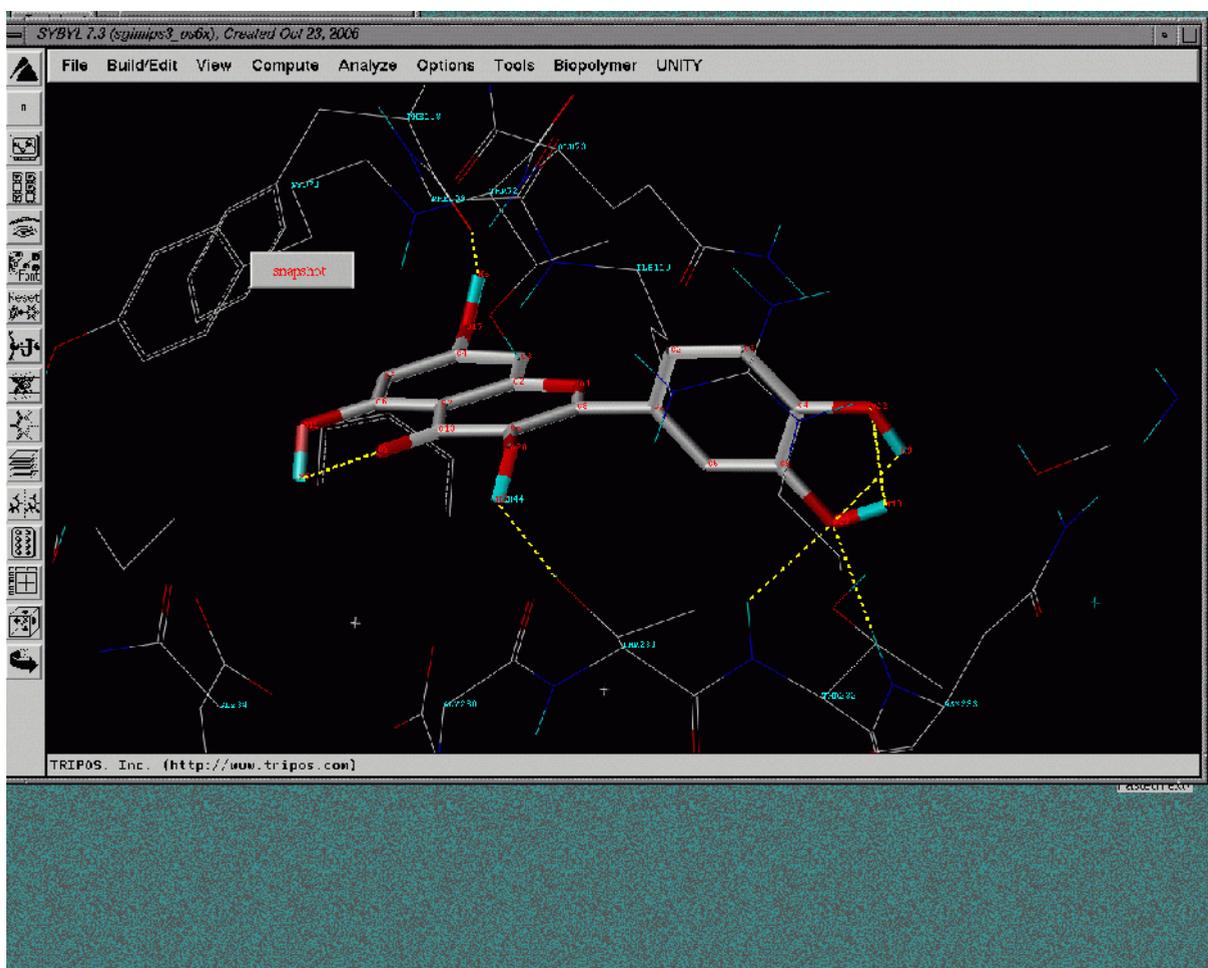
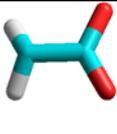
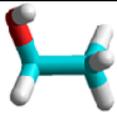
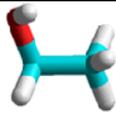
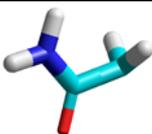


Tableau 4: Interactions AA-Quercetin pour 44 poses de docking

Résidus	Asp 32	Phe 108	Thr 231	Thr 232	Asn 233
N° atomes ligand	H6	H5	H7	O17	O23
Groupements d'AA					

- INTERACTIONS ENTRE QUERCETIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 41%

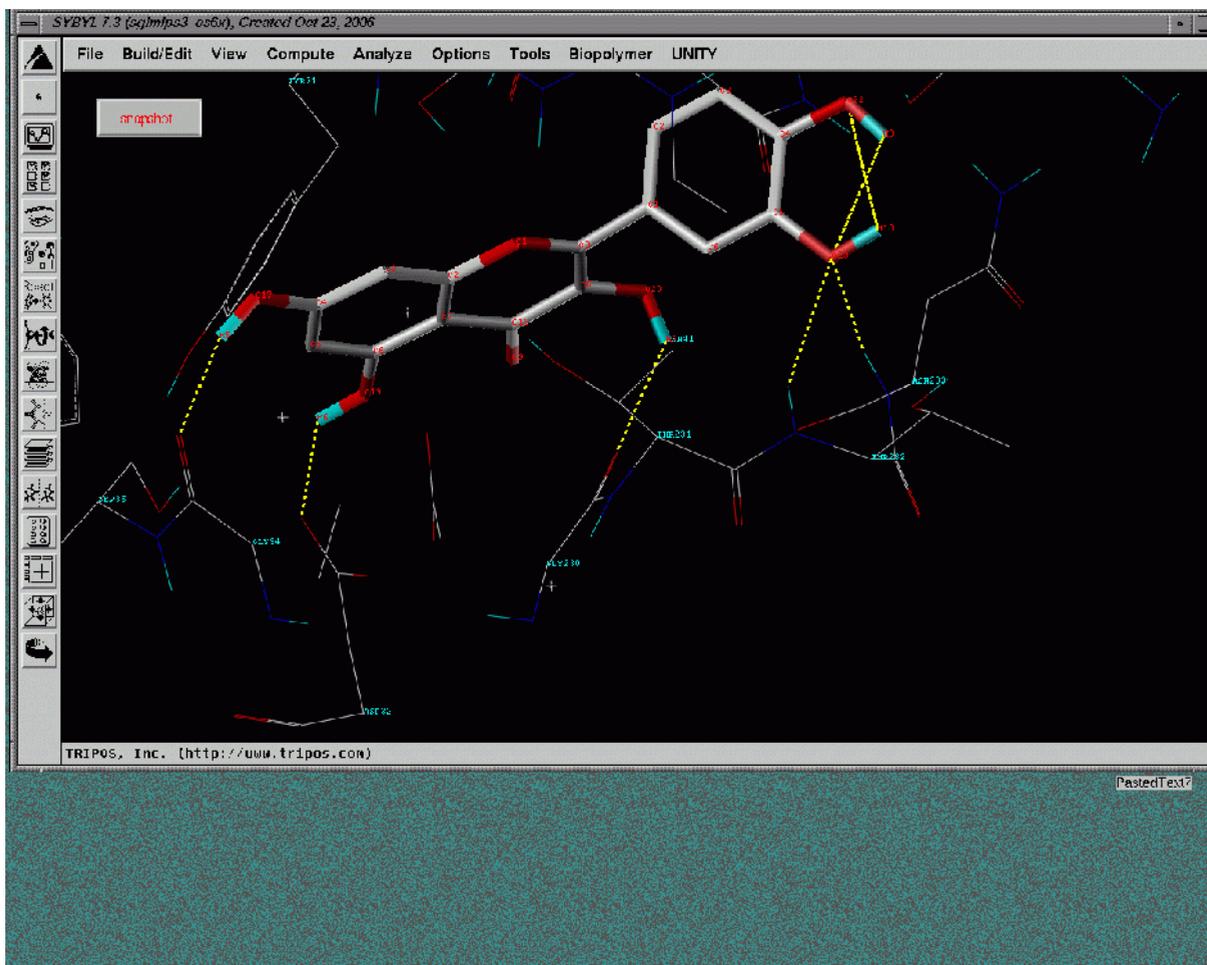
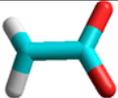
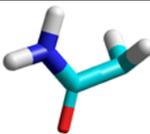


Tableau 5: Interactions AA-Quercetin pour 41 poses de docking

Résidus	Asp 32	Gly 34	Gly 230	Asn 233
N° atomes ligand	H6	H5	H7	O23
Groupements d'AA				

- INTERACTIONS DE QUERCETIN AVEC LES AA DE SITE ACTIF POUR
12 %

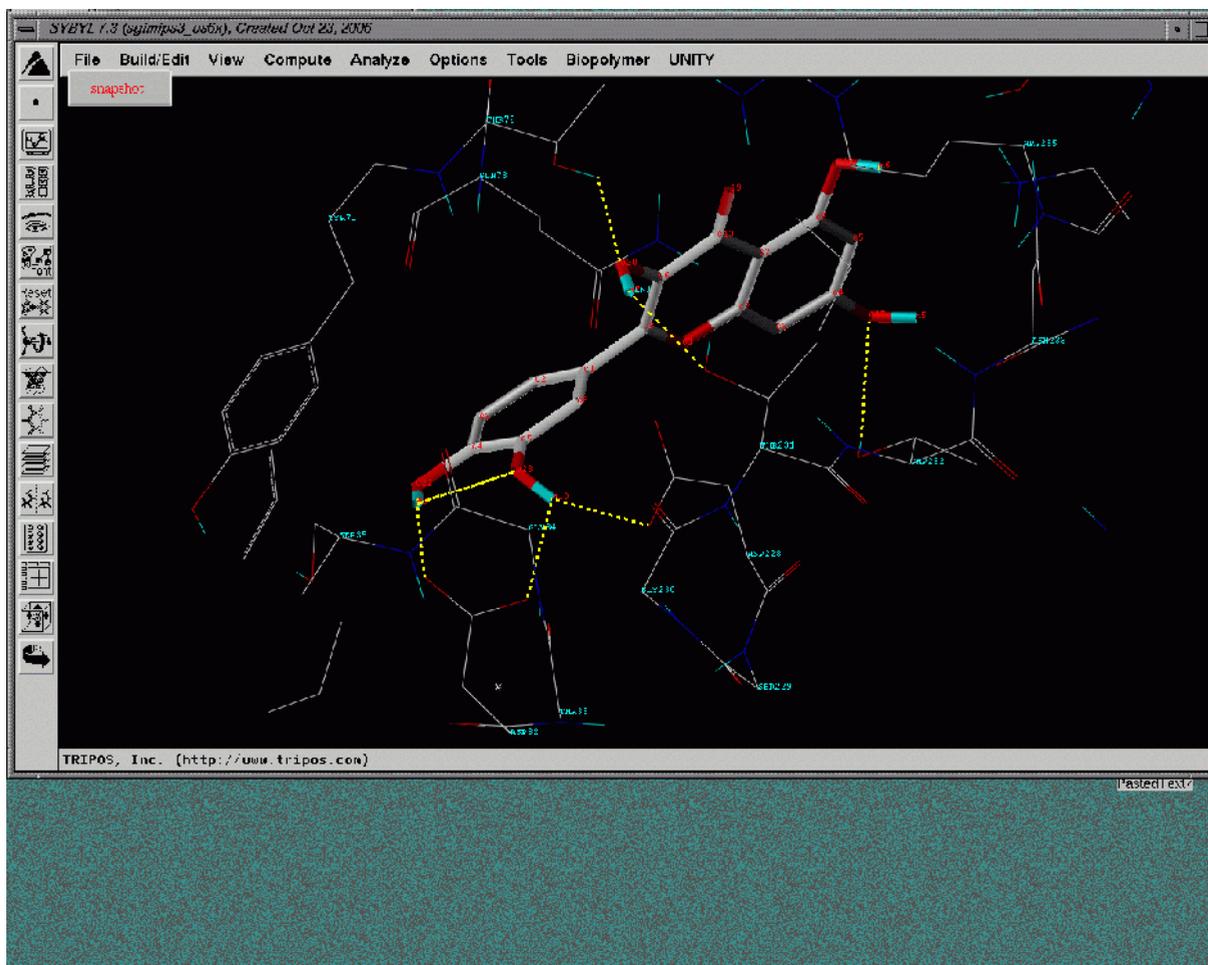
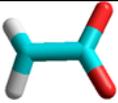
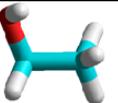
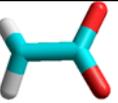
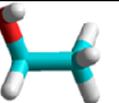


Tableau 6 : Interactions AA- Quercetin pour 12 poses de docking

Résidus	Asp 32	Thr 72	Asp 228	Thr 232
N° atomes ligand	H ₉	O ₂₀	H ₁₀	O ₁₇
Groupelements d'AA				

- INTERACTIONS DE QUERCETIN AVEC LES AA DE SITE ACTIF POUR 03%

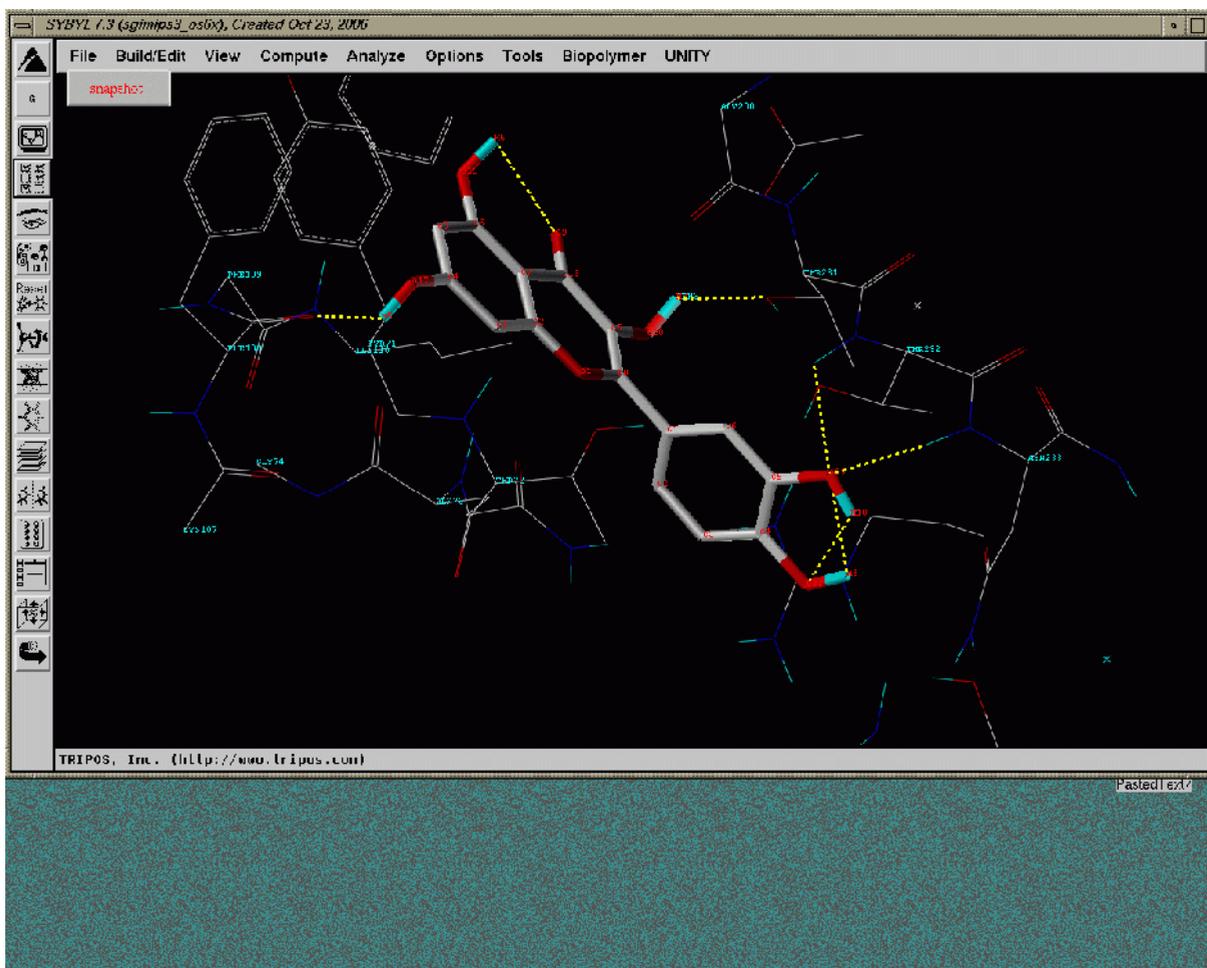
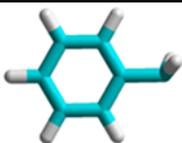
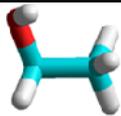
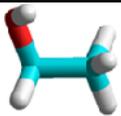
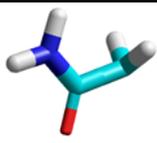


Tableau 7 : Interactions AA-Quercetin pour 3 poses de docking

Résidus	Phe 108	Thr 231	Thr 232	Asn 233
N° atomes ligand	H5	H7	O23	O23
Groupements d'AA				

- MORIN
- INTERACTIONS ENTRE MORIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 40%

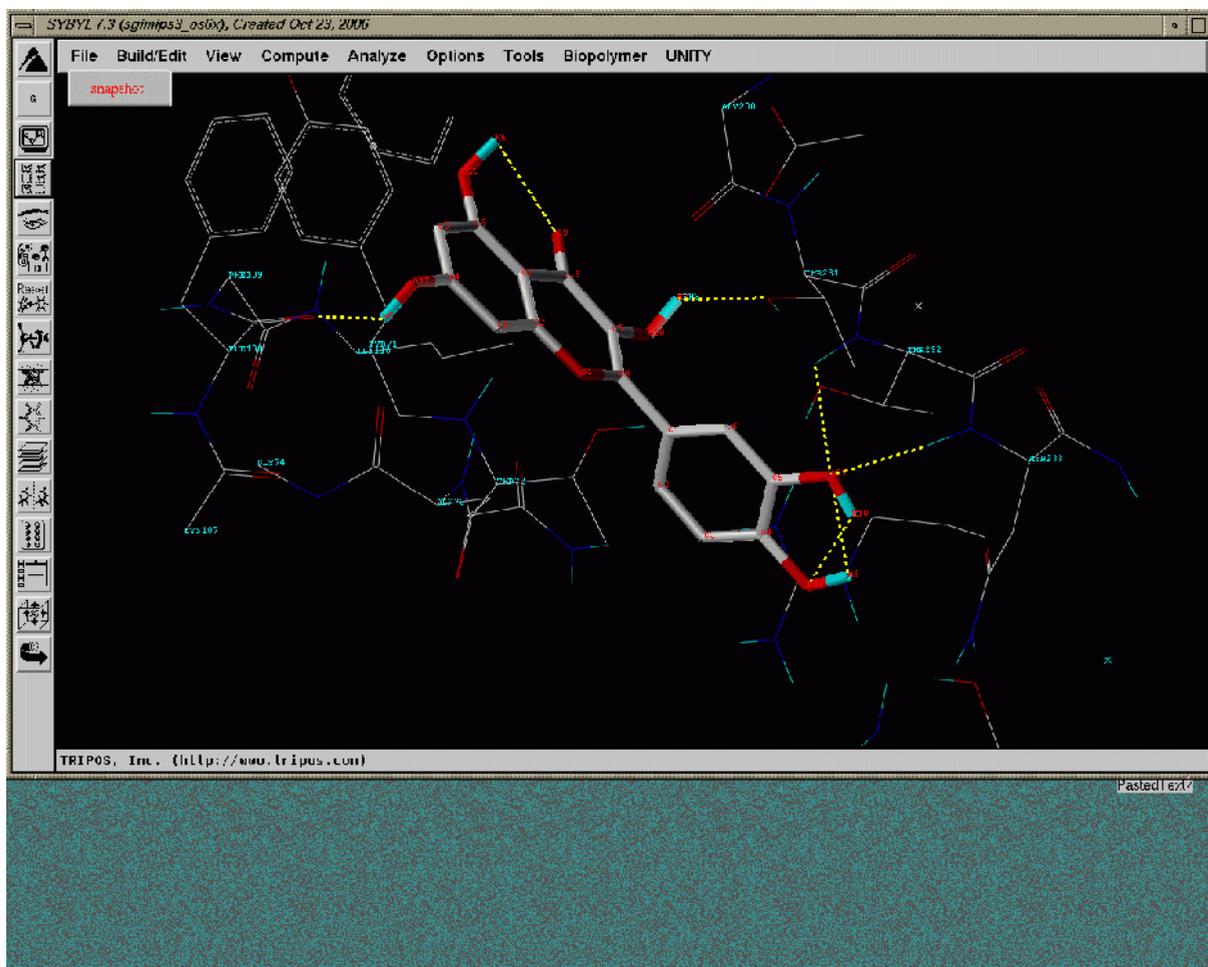
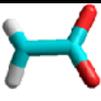
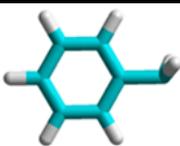
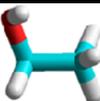


Tableau 8 : Interactions AA-Morin pour 40 poses de docking

Résidus	Asp 32	Phe 108	Gly 230	Thr 231	Thr 232
N° atomes ligand	H10	H4	O27	H5	H7
Groupements d'AA					

- INTERACTIONS DE MORIN AVEC LES AA DE SITE ACTIF POUR 37%

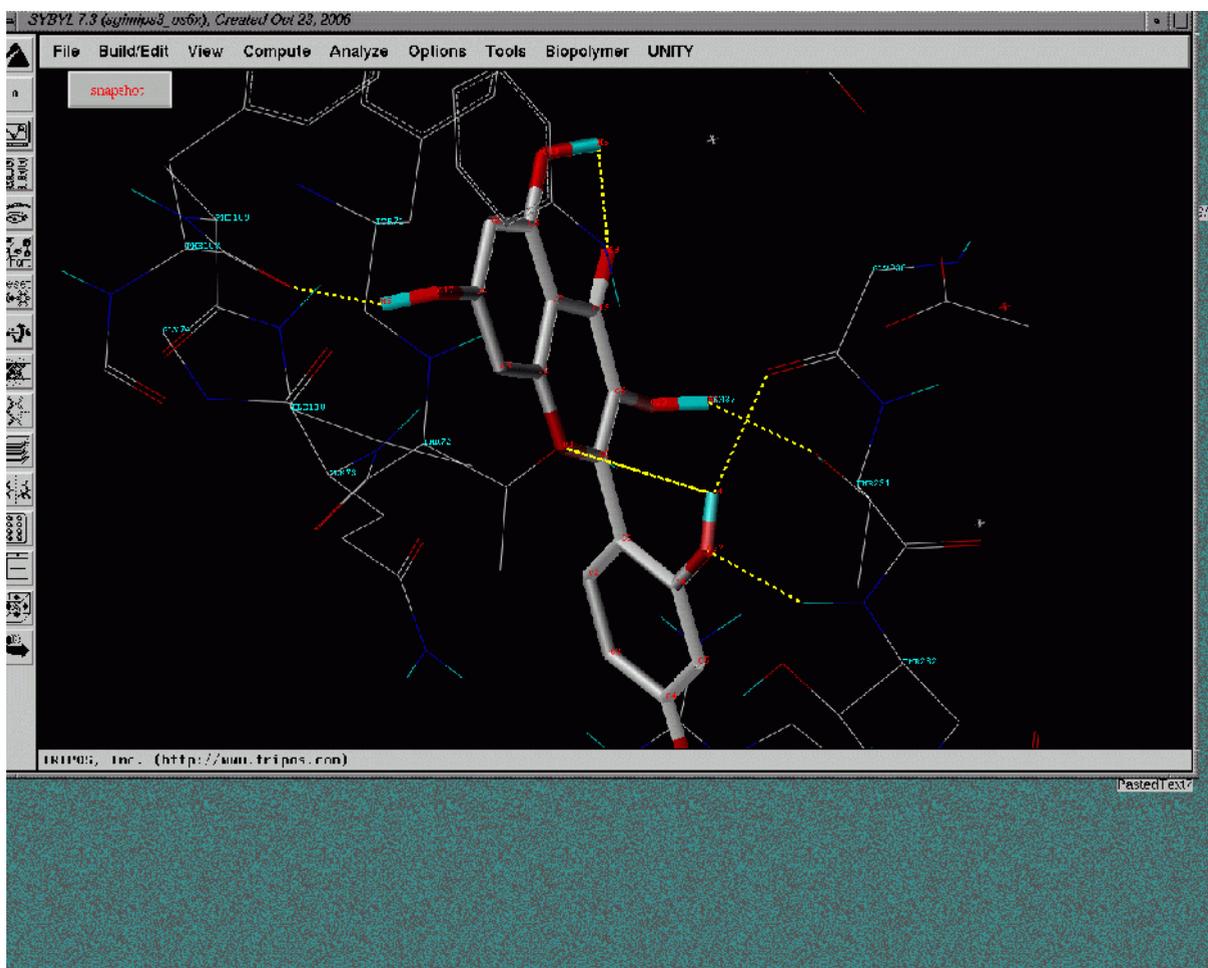
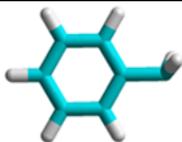
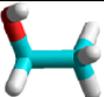
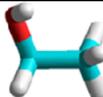


Tableau 9 : Interactions AA-Morin pour 37 poses de docking

Résidus	Phe 108	Gly 230	Thr 231	Thr 232
N° atomes ligand	H4	O27	H5	H7
Groupements d'AA				

- INTERACTIONS ENTRE MORIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 21%

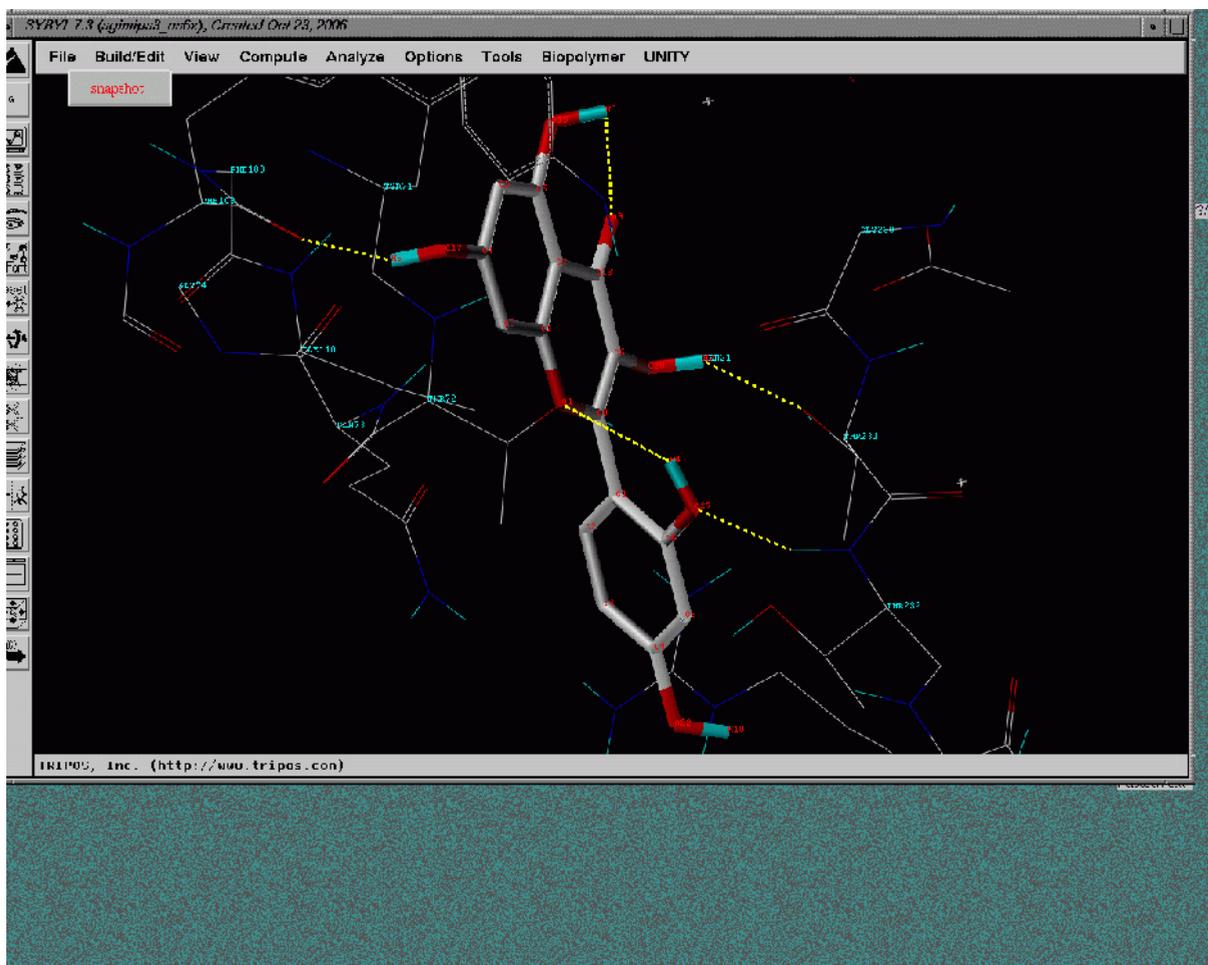
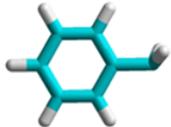
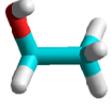


Tableau 10 : Interactions AA-Morin pour 21 poses de docking

Résidus	Phe 108	Thr 231	Thr 232
N° atomes ligand	H5	H7	O27
Groupements d'AA			

- INTERACTIONS DE MORIN AVEC LES AA DE SITE ACTIF POUR 02%

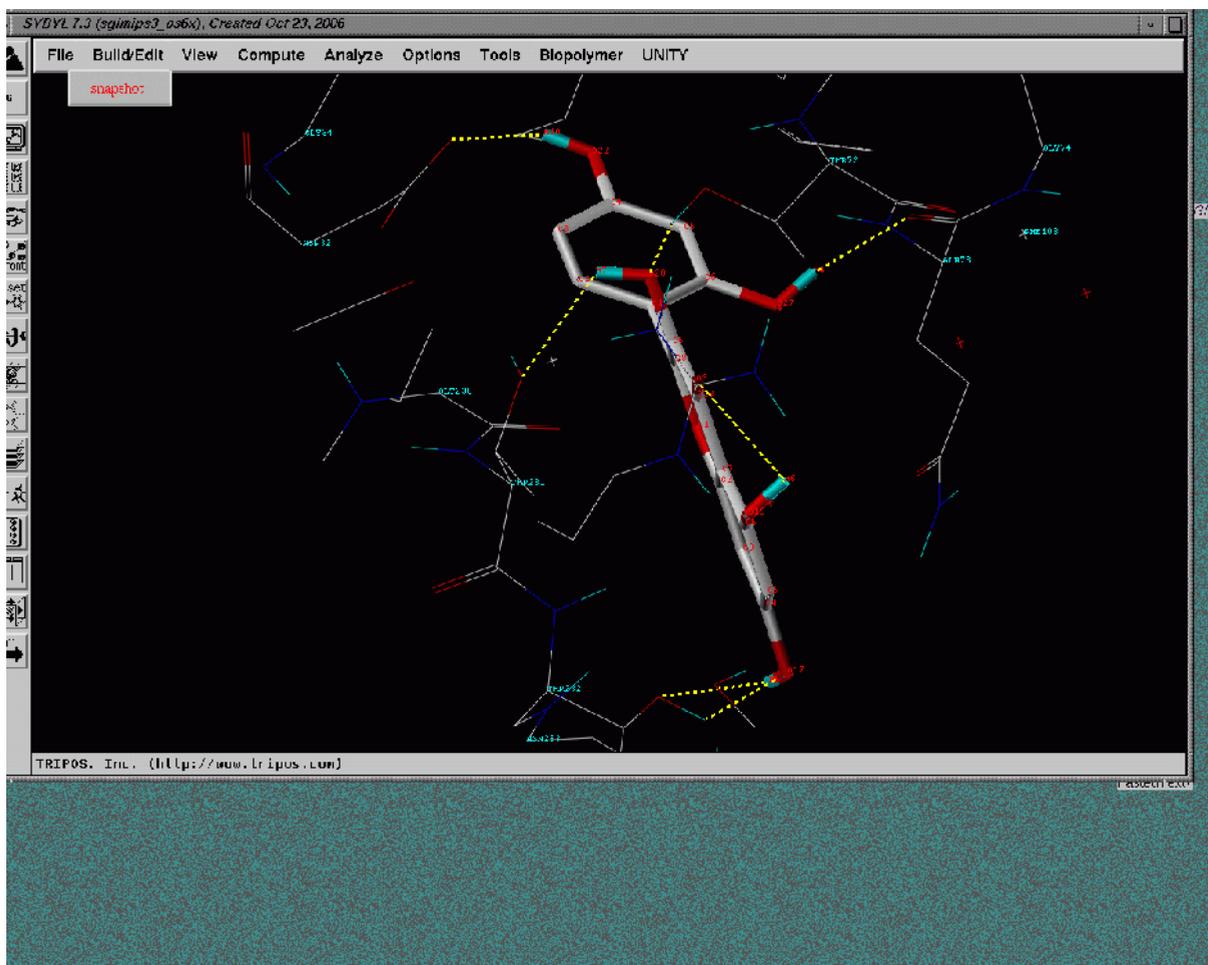
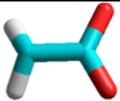
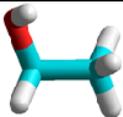
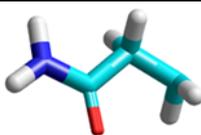
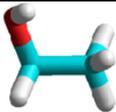
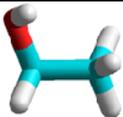


Tableau 11 : Interactions AA-Morin pour 02 poses de docking

Résidus	Asp 32	Thr 72	Gln 73	Thr 231	Thr 232
N° atomes ligand	H10	O20	H4	H7	H5
Groupements d'AA					

- KAEMPHEROL
- INTERACTIONS ENTRE KAEMPHEROL ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 55%

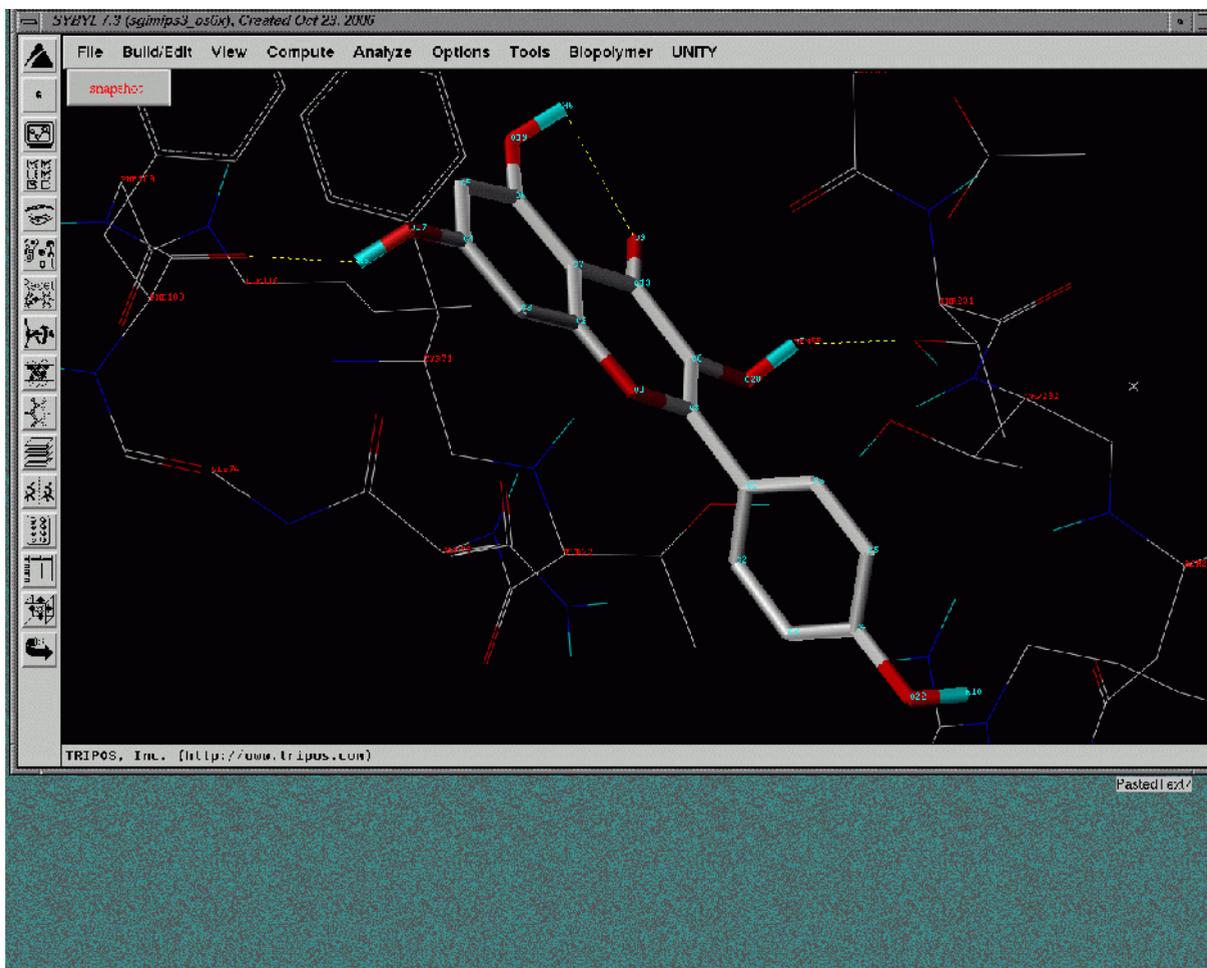
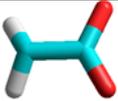
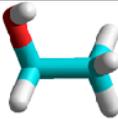
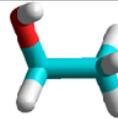


Tableau 12 : Interactions AA-Kaempherol pour 55 poses de docking

Résidus	Asp 32	Thr 231	Thr 232
N° atomes ligand	H10	H7	O9
Groupements d'AA			

- **INTERACTIONS ENTRE KAEMPHEROL ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 23%**

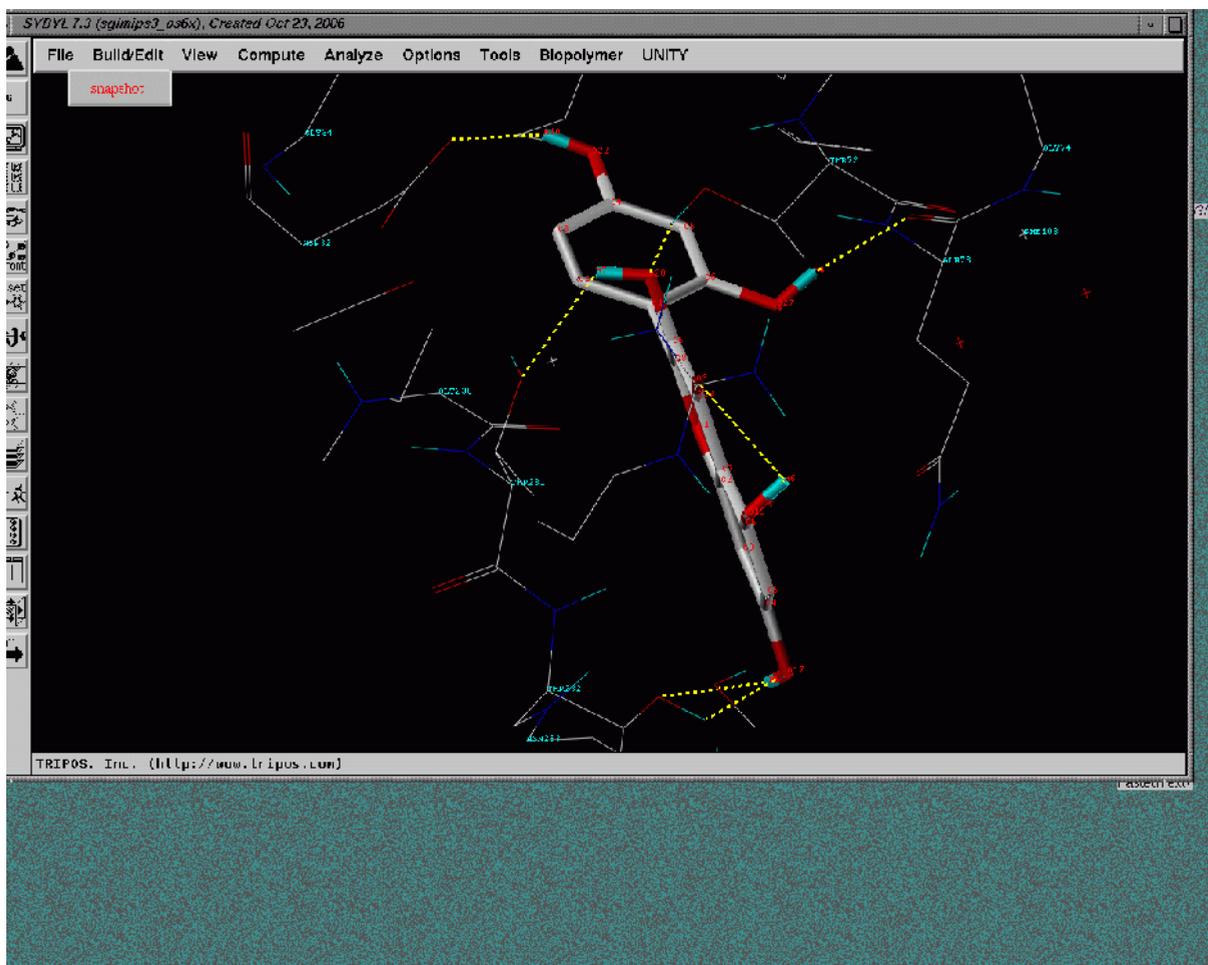
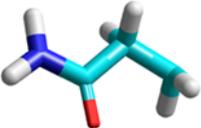
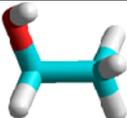


Tableau 13 : Interactions AA-Kaempherol pour 23 poses de docking

Résidus	Gly 11	Tyr 14	Gln 73	Ser 229	Thr 232
N° atomes ligand	H6	O17	H10	H5	O9
Groupements d'AA					

- INTERACTIONS ENTRE KAEMPHEROL ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 22%

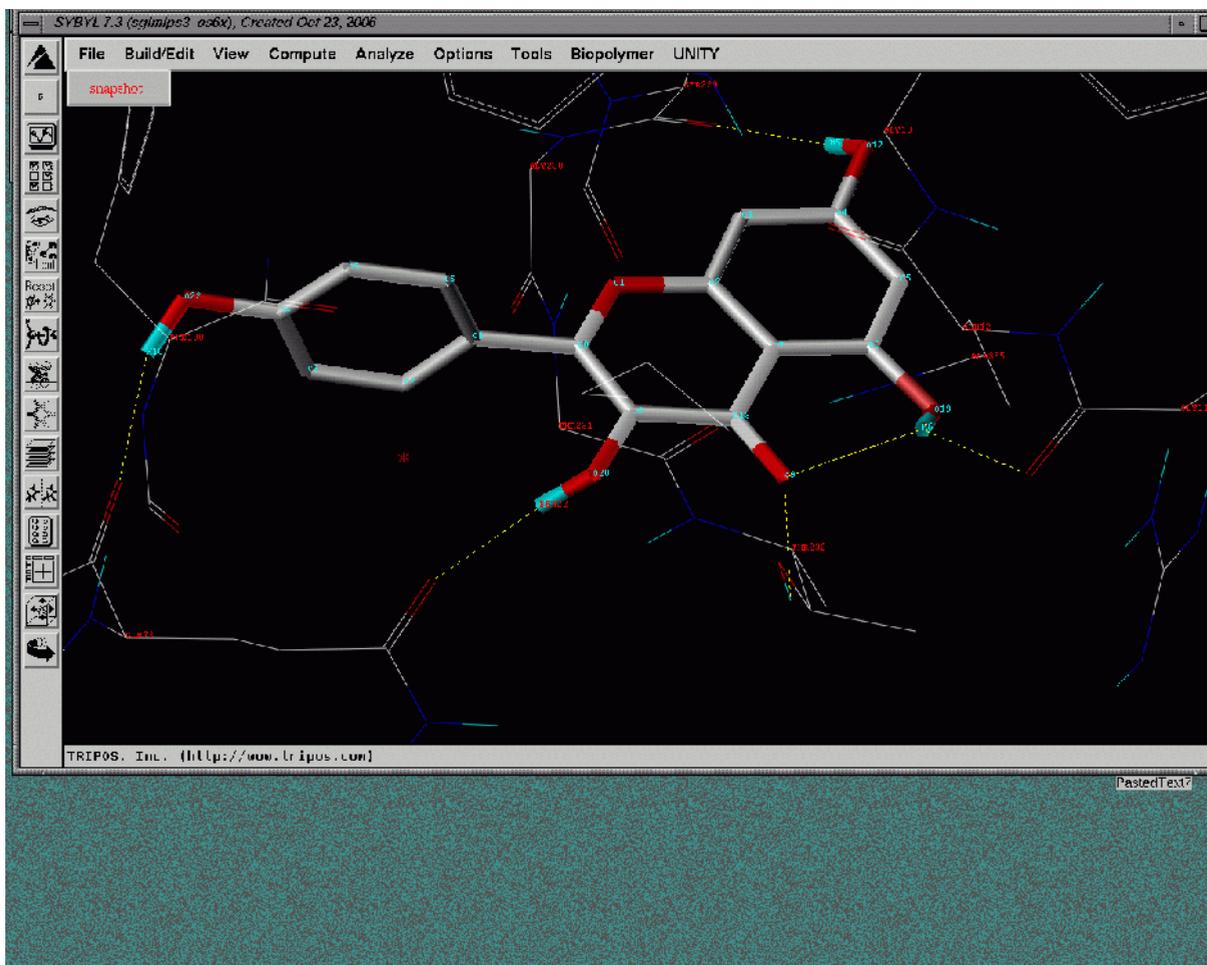
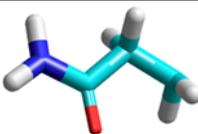
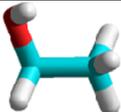


Tableau 14 : Interactions AA- Kaempherol pour 22 poses de docking

Résidus	Gly 11	Gln 73	Ser 229	Thr 232
N° atomes ligand	H6	H7	H5	O9
Groupements d'AA				

- INTERACTIONS ENTRE KAEMPHEROL ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 02%

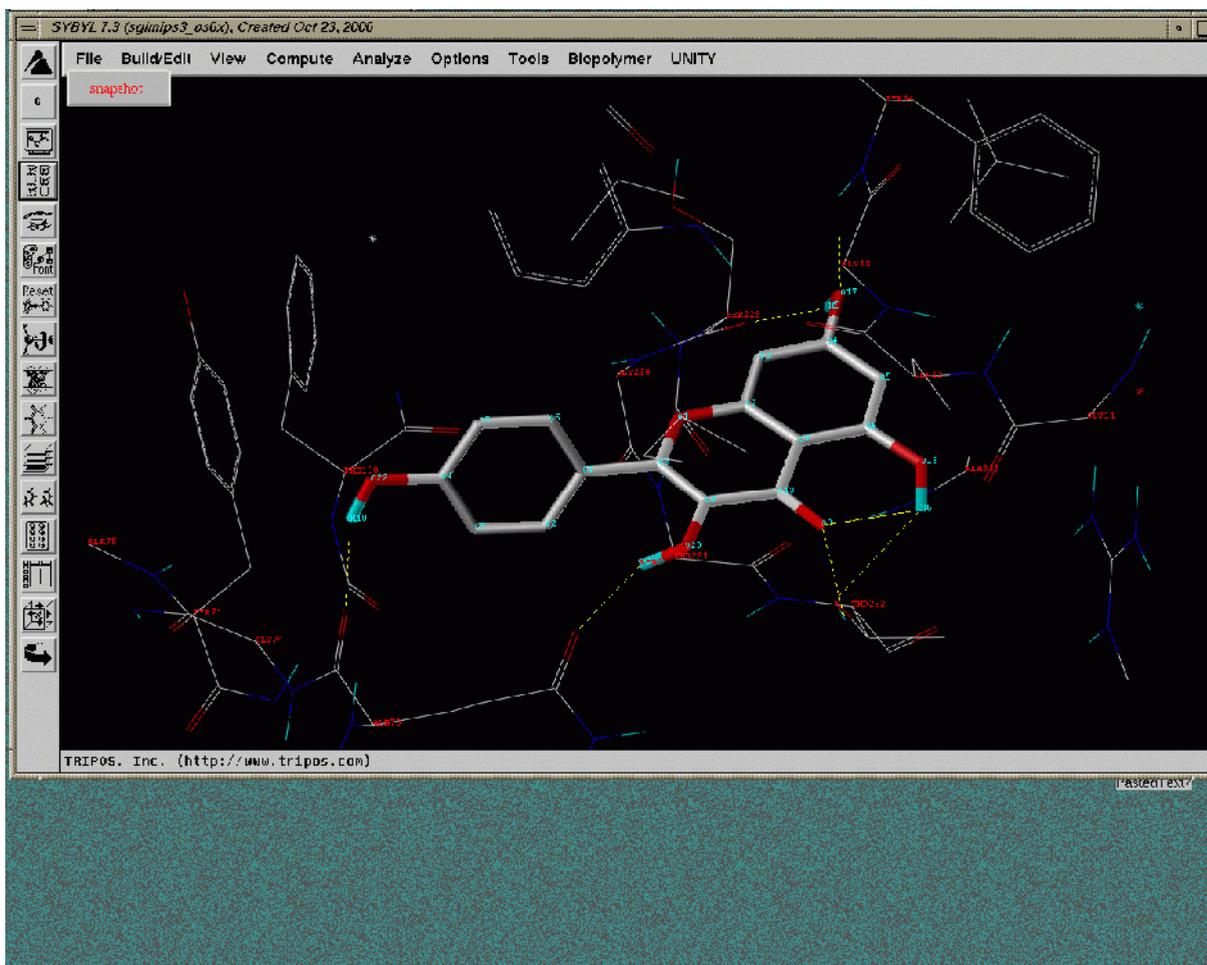
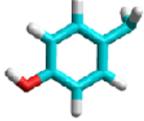
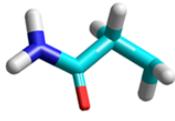
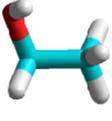


Tableau 15 : Interactions AA-Kaempherol pour 02 poses de docking

Résidus	Tyr 14	Gln 73	Ser 229	Thr 232
N° atomes ligand	O17	H7	H5	O9
Groupements d'AA				

- MYRICETIN
- INTERACTIONS ENTRE MYRICETIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 99%

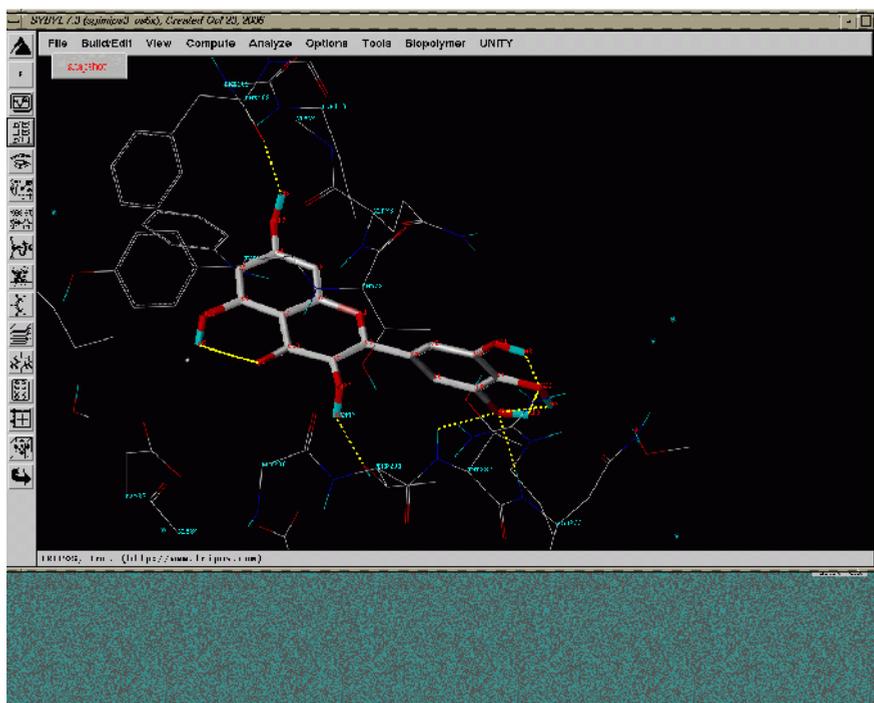
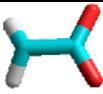
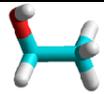
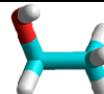
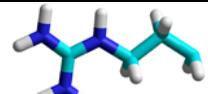
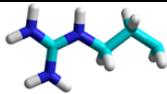
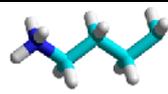


Tableau 16 : Interactions AA-Myricetin pour 99 poses de docking

Résidus	Asp 32	Thr 231	Thr 232	Arg 235	Arg 307	Lys 321	Ser325
N° atomes ligand	H5	H7	O17	O22	H6	O1	H10
Groupements d'AA							

- INTERACTIONS ENTRE MYRICETIN ET LES AA DE SITE ACTIF POUR 01%

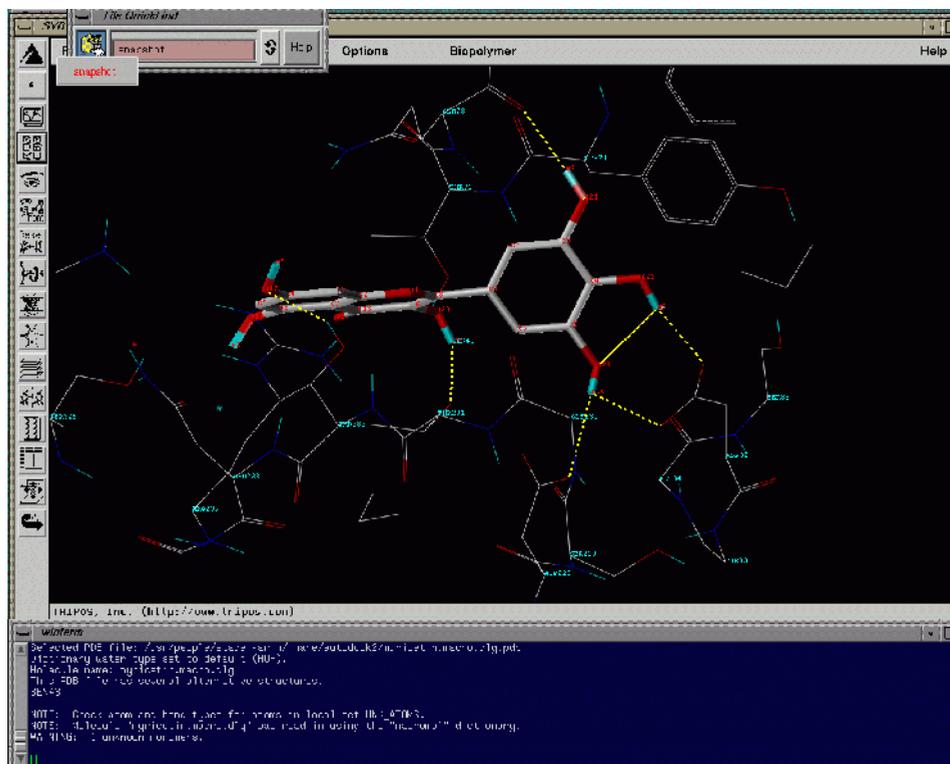
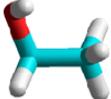
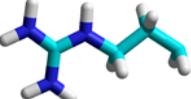


Tableau 17: Interaction entre AA-Myricetin pour 01 pose de docking

Résidus	Gly 11	Thr 232	Arg 307	Lys 321	Ser 325
N° atomes ligand	H6	O9	H5	O1	H5
Groupements d'AA					

D'après les interactions de liaison hydrogène des acides aminés du site actif de la β -sécrétase avec les cinq ligands on peut prédire les résidus qui forment le site actif. La cavité enzymatique de la β -sécrétase est donc formée de la séquence suivante des résidus (figure 21) : **Asp 32, Gly 11, Tyr 14, Gly 34, Thr 72, Gln 73, Phe 108, Asp 228, Ser 229, Gly 230, Thr 231, Thr 232, Asn 233, Arg 235, Arg 307, Lys 321, Ser 325.**

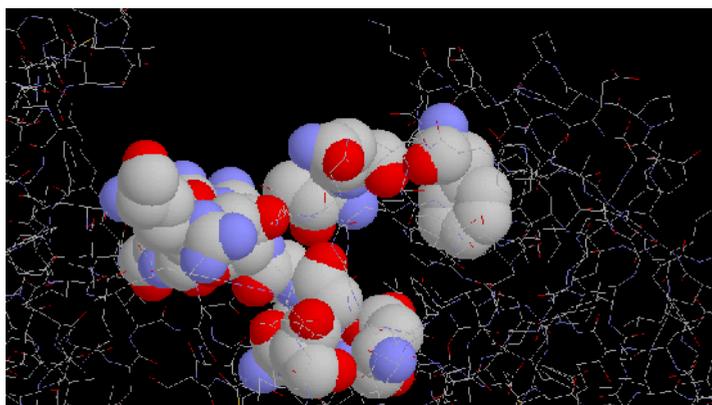


Figure 21 : Résidus du site actif

Suite à l'apparition des résidus suivants : **Asp 32, Thr 231, Thr 232** dans la majorité des interactions de liaison hydrogène avec les cinq flavonoïdes, on peut déduire que ces derniers font partie de l'inhibition de β -sécrétase. Le nombre important d'interaction avec les résidus du site actif confère à la Myricetin une meilleure complémentarité.

V-4- Les Energies d'interactions (minimales) des complexes des ligands- β -sécrétase

Les énergies d'interactions entre la β -sécrétase et les différents inhibiteurs étudiés sont obtenues à l'aide de la relation suivante [12] :

$$E (\text{Interaction}) = [E \text{ pot (Complexe Enzyme-Inhibiteur)}] - [E \text{ pot (Enzyme)} + E \text{ pot (Inhibiteur)}]$$

Tableau 18 : Energies d'interactions (minimales) des complexes ligands- β -sécrétase

Ligands	Energie Interaction (minimale) (Kcal/mol)
Apigenin	-6.33
Quercetin	-5.83
Morin	-5.82
Kaempherol	-6.34
Myricetin	-8.74

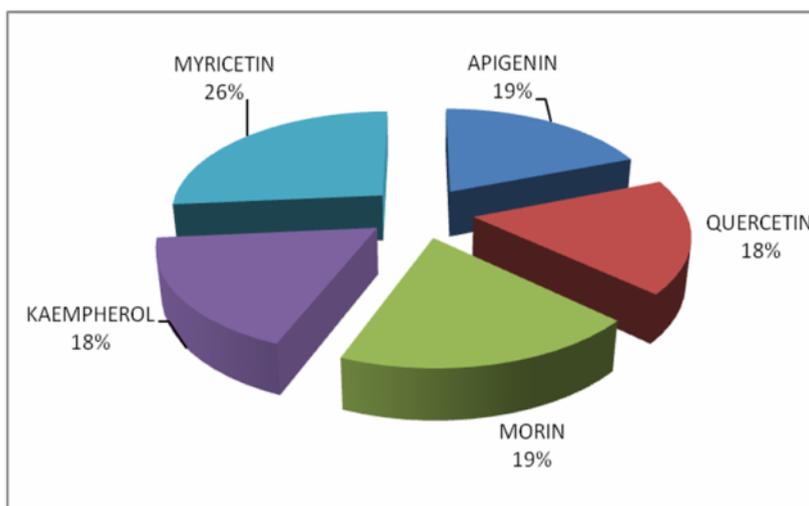


Figure 22 : Pourcentage de complémentarité des complexes ligands- β -sécrétase

- **Classement des énergies d'interactions ($E_{\text{min. dock}}$):**

$E_{\text{min. dock}}$ Myricetin < $E_{\text{min. dock}}$ Kaempherol < $E_{\text{min. dock}}$ Apigenin < $E_{\text{min. dock}}$ Quercetin < $E_{\text{min. dock}}$ Morin

Après comparaison des énergies minimales obtenues à l'aide du programme AUTODOCK 3.05 ces dernières sont reportées dans le tableau 18, le ligand Myricetin demeure le meilleur car son énergie d'interaction est la plus basse.

V-5- Les valeurs des IC₅₀ des ligands

Tableau 19 : Les valeurs expérimentales d'IC₅₀ des différents ligands [13]

COMPOSES	IC ₅₀ (μ M)
MYRICETIN	2,8 ± 0,3
QUERCETIN	5,4 ± 0,5
KAEMPHEROL	14,7± 1,3
MORIN	21,7± 1,1
APIGENIN	38,5 ± 2,6

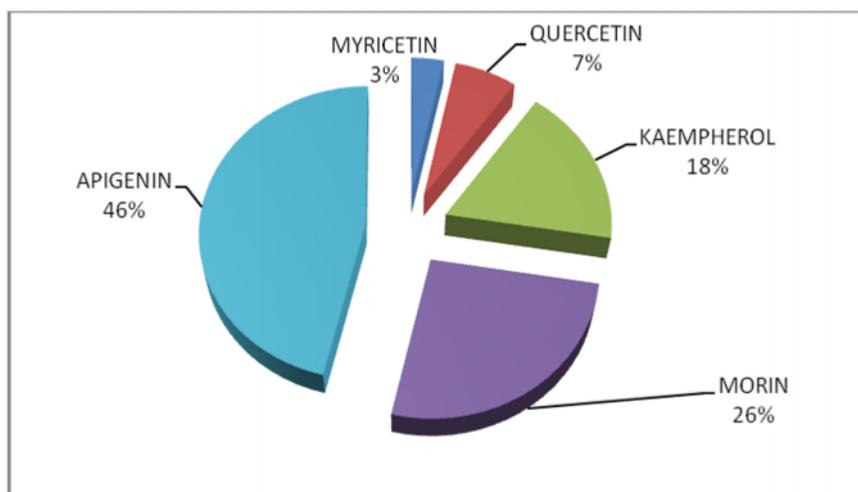


Figure 23 : Valeurs expérimentales en pourcentage d'IC₅₀ des différents Ligands

- Classement des IC₅₀ :

IC₅₀ Myricetin < IC₅₀ Quercetin < IC₅₀ Kaempherol < IC₅₀ Morin < IC₅₀ Apigenin

La valeur d'IC₅₀ avec l'inhibiteur de la co-cristallisation 5HA est 15 nM.

Cette fiabilité de Myricetin est confirmée en comparant les valeurs expérimentales des IC₅₀ dans le tableau 19 avec la valeur d'IC₅₀ de l'inhibiteur de la co-cristallisation 5HA donc on peut d'après le tableau 19 dire que la Myricetin à la plus petite valeur d'IC₅₀ = 2.8 μM et cette valeur est proche de la valeur

d'IC₅₀=15 nM de l'inhibiteur de la co-cristallisation 5HA donc présente une meilleur inhibition par rapport aux autre flavonoïdes.

Après comparaison des résultats de l'étude théorique de l'inhibition de la β-sécrétase et ceux de l'étude expérimentale, on remarque que les deux résultats sont compatibles pour le ligand Myricetin. Donc on peut déduire le classement ci-dessous des ligands flavonoïdes selon leur pouvoir inhibiteur.

Myricetin < Kaempherol < Apigenin < Quercetin < Morin

Vue les cinq structures des flavonoïdes (Figure 1) on remarque que le nombre et la position du groupement OH change au niveau des carbones 3', 4', 5', 3, qui augmente le pouvoir antioxydant [14-19].

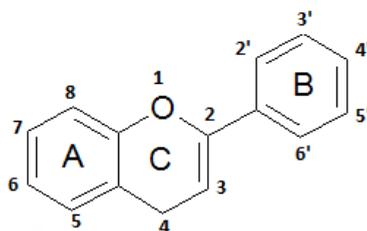


Figure 24 : Squelette de base des flavonoïdes et numérotation adoptée [20]

Des études ont suggéré que le stress oxydatif a un rôle critique dans la maladie d'Alzheimer (MA) est responsable à la neurotoxicité de β-Amyloïde [22].

Atténuation du stress oxydatif par les molécules anti-oxydantes est proposée comme un traitement thérapeutique potentielle dans la MA [23-24].

L'inhibiteur Myricetin a quatre groupements de OH dans 3', 4', 5', 3 donc il a le pouvoir antioxydant le plus élevé et forme une meilleur complémentarité avec la β-sécrétase, il est considéré comme le meilleur ligand pour l'inhibition de la β-sécrétase responsable de la formation de β-amyloïde agent des plaques séniles et par suite diminuer l'évolution de la maladie d'Alzheimer.

V-6- Résultats des dimensions de la cavité enzymatique

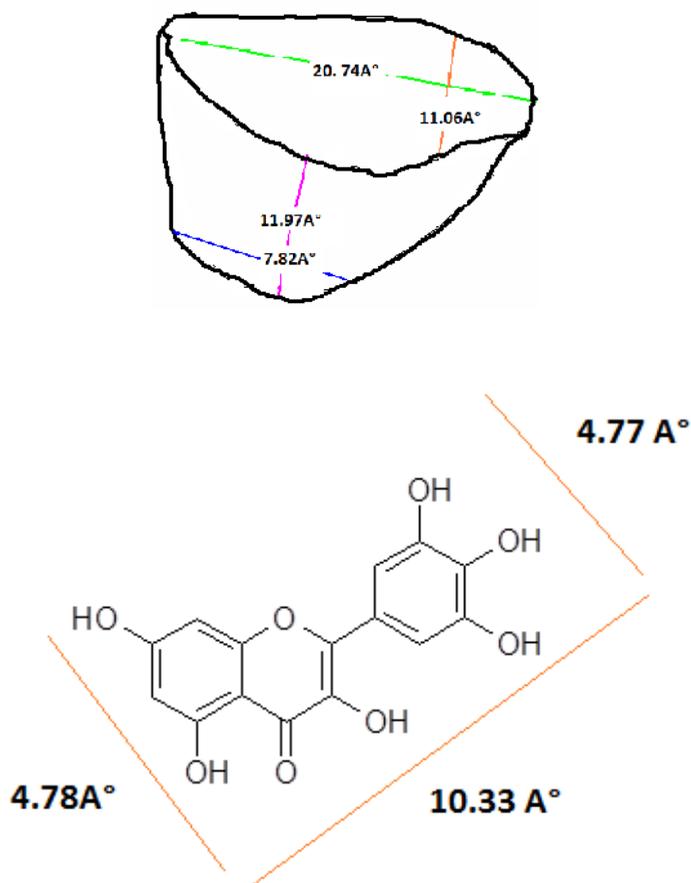


Figure 25 : Dimensions de Myricetin

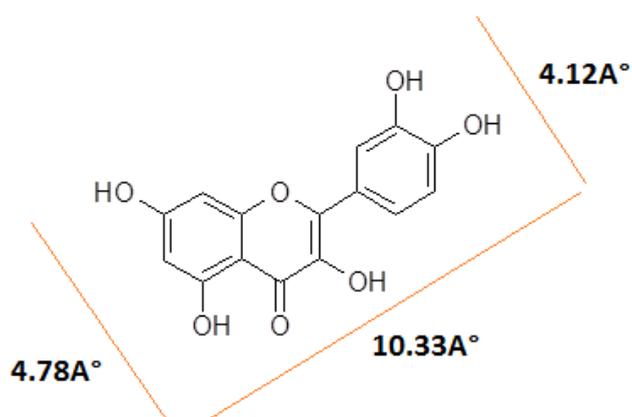


Figure 26 : Dimensions de Quercetin

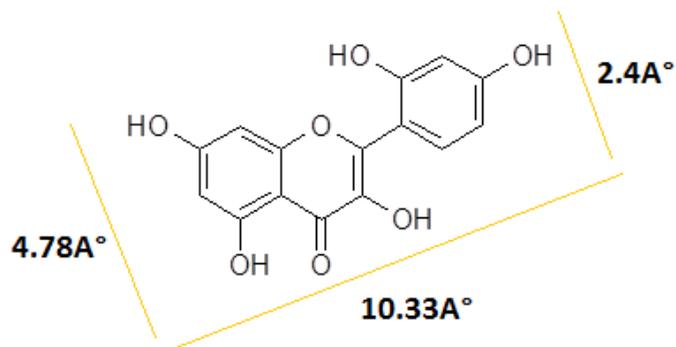


Figure 27 : Dimensions de Morin

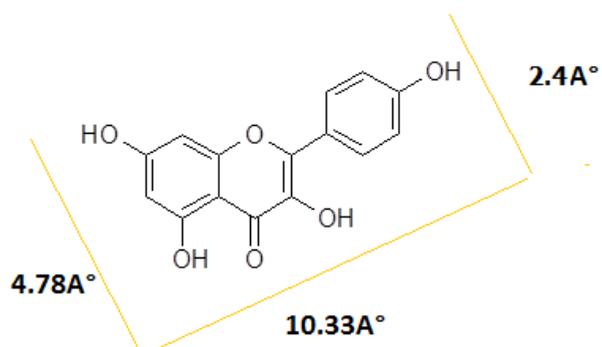


Figure 28 : Dimensions de Kaempferol

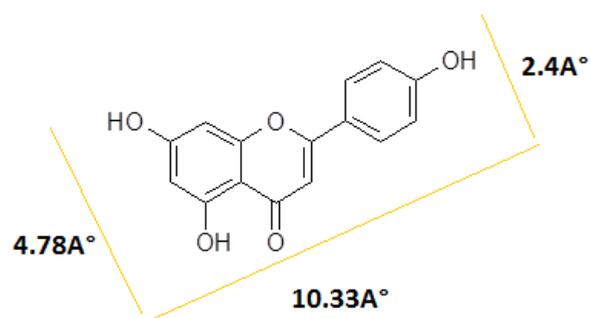
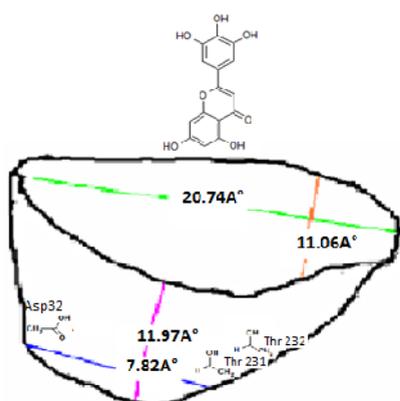
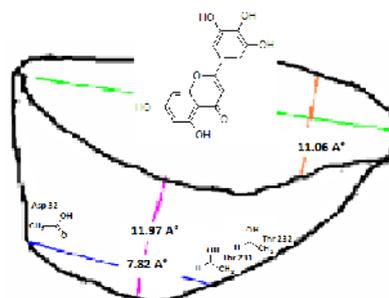


Figure 29 : Dimensions d'Apigenin

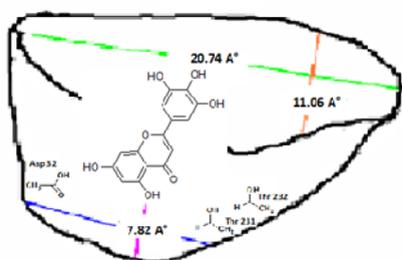
- Etape du docking :



1



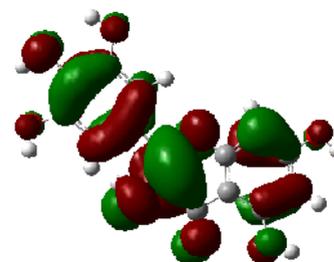
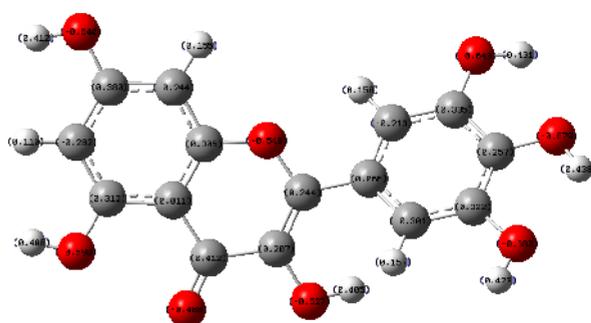
2



3

V-7- Calcul de densité électronique

Le calcul de la densité électronique a été effectué par le logiciel Gaussian 09 [23]



L'examen de la cavité enzymatique et le calcul de densité électronique confirment que la structure de Myricetin avec les quatre groupements de OH dans la position 3', 4', et 5',3 présente une forte interaction liaison hydrogène avec **Asp 32, Thr 231, Thr 232** et une meilleure complémentarité avec la β -sécrétase.

En conclusion ce travail consiste l'étude de la structure de la β -sécrétase et de ses interactions avec des inhibiteurs par modélisation moléculaire: Cas de la maladie d'Alzheimer. Au vu des résultats obtenus et des valeurs expérimentales, il ressort :

Inhibiteurs	Valeurs des $E_{interaction}$ (Kcal/mol)	Valeurs d'IC₅₀ (μ M)
MYRICETIN	-8.74	2,8 \pm 0,3
KAEMPHEROL	-6.34	14,7 \pm 1,3
MORIN	-5.82	21,7 \pm 1,1
QUERCETIN	-5.83	5,4 \pm 0,5
APIGENIN	-6.33	38,5 \pm 2,6

Le flavonoïde « Myricetin » serait le meilleur pour ralentir l'évolution de la pathologie étudiée (maladie d'Alzheimer).

Une étude comparative de la concentration en mg/L de Myricetin dans le thé infusion, le jus de tomate est représentée dans le tableau 19 [25]

Tableau 19 : La concentration en mg/L de MYRICETIN dans le thé et jus de tomate.

Type	MYRICETIN (mg/L)
Thé	6.0
Jus tomate	10

En général, les inhibiteurs de l'enzyme β -sécrétase ayant un potentiel thérapeutique ont un poids moléculaire inférieur à 600 Da [13]. Donc, la grande base de peptides inhibiteurs n'est pas considérée comme des médicaments fiables. Alors que, les flavonoïdes naturels, ont relativement un faible poids moléculaires (400 Da), peuvent représentés une catégorie d'inhibiteurs de la β -sécrétase.

Les résultats de l'étude comparative citée ci-dessus révèle une concentration élevée de Myricetin dans le jus de tomate. Ce résultat nous a encouragé à proposer un traitement naturel et fiable durant le premier stade de la maladie d'Alzheimer à base d'un flavonoïde de type flavonol (Myricetin).

REFERENCES:

- [1] Abdelli I., Sari S., Ghalem S., Molecular Modelling of Green Tea catechins Inibitors of Humain Brain Bace 1, *IBSientific Journal of Science*, **2008**, 3(2), 27-29.
- [2] Abdelli I., Sari S., Ziani Cherif C., Ghalem S., Theoretical Study of The Inhibition of beta-secretase, *Asian Journal of Chemistry*, **2007**, 19(7), 5407-5416.
- [3] Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E., A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *J Mol Biol*, **1982**,161, 269-288.
- [4] Morris G.M., Goodsell D.S., Huey R., and Olson A.J., Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4, *Journal of Computer- Aided Molecular Design*, **1996**, 10(4), 293-304.
- [5] Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., and Olson A.J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry*, **1998**, 19(14), 1639-1662.
- [6] Hussain I., Powel D. I., et all., Identification of a novel aspartic protease (Asp2) as beta-secretase, *Mol Cell Neurosci*, **1999**, 14(6), 419-27.
- [7] Sinha S., Anderson J. P., et all., Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain, *Nature*, **1999**, 402(6761), 537-40.
- [8] Vassar R., Bennett B. D., et all., Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science*, **1999**, 286(5440), 735-41.
- [9] Yan R., Bienkowski M. J., et all., Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity, *Nature*, **1999**, 402(6761), 533-7.
- [10] Siegal G., Van Duynhoven J., Baldus M., Biomolecular NMR: recent advances in liquids, solids and screening, *Curr. Opin. Chem. Biol*, **1999**, 3, 530-543.

- [11] Hirst JD., Vieth M., Kolinski A., Brooks CL., Sybyl. 1988. Tripos associate, assign St Louis, Mo, USA, 189-213. 85, Assessing energy functions for flexible docking, *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1612-1622.
- [12] Sari S., Medjahed W., Kajima Mulengi J., Ghalem S., Approach of the Interaction Enzyme-Substrate by Molecular Modelling, *Asian Journal of Chemistry*, **2007**, 19(3).
- [13] Shimmyo Y., Kihara T., Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure-activityrelationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1780, 819–825.
- [14] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, 20 (7), 933-956.
- [15] Burda S., Oleszek W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J AgricFood Chem*, **2001**, 49 (6), 2774-2779.
- [16] Van Acker S. A. B. E., Van Den Berg, D.-j., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom W. P., Van Der Vijgh W. J. F., Bast A., Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **1996**, 20 (3), 331-342.
- [17] Heim K. E., Tagliaferro A. R.; Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**, 13, (10), 572-584.
- [18] Sroka Z., Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch C*, **2005**, 60 (11-12), 833-843.
- [19] Cao G., Sofic E., Prior R. L., Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, **1997**, 22 (5), 749-760.

[20] Cook N., Samman S., Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, **1996**, 7, 66-76.

[21] Lundkvist J., Näslund J., Gamma-secretase: a complex target for Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Pharmacol*, **2007**, 7, 112–118.

[22] Commenges D., Scotet V., Renaud S., Jacqmin-Gadda H., Barberger- Gateau P., Dartigues J.F., Intake of flavonoids and risk of dementia, *Eur. J. Epidemiol*, **2000**, 16, 357–363.

[23] Ko P.C., Kilduff P.T., Higgins J.A, Milberg W., McGlinchey R., Evidence for intact selective attention in Alzheimer's disease patients using a location priming task, *Neuropsychology*, **2005**, 19, 381–389.

[24] Frisch M.J., et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

[25] George J. Volikakis., Constantinos E.Efstathiou., Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 551, 124-131.

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de l'étude des mécanismes régissant l'évolution la maladie d'Alzheimer, nous nous sommes intéressés aux interactions moléculaires entre la β -sécrétase et les inhibiteurs de type flavonoïdes à l'aide des méthodes de modélisation moléculaire.

Ce présent travail comprend cinq chapitres :

Dans le premier chapitre, la maladie d'Alzheimer est décrite ; des généralités sur cette maladie, statistiques de la maladie, historique de la maladie, les facteurs de risque, Le processus protéolytique d'APP, la protéine précurseur de l'amyloïde, la β -sécrétase l'enzyme limitante lors de la production d'amyloïde.

Au niveau de chapitre II, des généralités sur les flavonoïdes sont apportées en insistant sur les différentes classes de flavonoïdes et un aperçu sur leurs biodisponibilités et leurs implications biologiques.

Le troisième chapitre, est réservé aux méthodes de la modélisation moléculaire, dont on a tenu à mettre l'accent sur la mécanique moléculaire et le docking moléculaire.

Le chapitre IV regroupe les structures mise en jeu et les logiciels utilisés lors de cette approche.

Le chapitre V est consacré à la discussion des résultats obtenus à partir des calculs effectués dans ce travail, qui concerne l'étude théorique de l'inhibition de la β -sécrétase. La discussion est basée sur les énergies d'interaction minimale des complexes β -sécrétase- flavonoïdes obtenus à l'aide du programme AUTODOCK 3.05. L'exploitation de quelques données expérimentales en occurrence les IC_{50} pour les structures de flavonoïdes choisis pour cette étude (Apigenin, Morin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin) en se basant sur l'énergie d'interaction totale, montre un accord acceptable pour l'inhibiteur Myricetin. En effet, l'inhibiteur Myricetin ($E = -8.74 \text{ Kcal/mol}$) et ($IC_{50} = 2,8 \mu \text{ M}$) est plus actif que les autres inhibiteurs. Dans la structure des flavonoïdes le nombre et la position du groupement OH au niveau des carbones 3', 4', 5', 3, augmente le pouvoir antioxydant. Des études ont suggéré que le stress oxydatif à un rôle critique dans la maladie d'Alzheimer (M...

CONCLUSION GENERALE

neurotoxicité de β -Amyloïde. Atténuation du stress oxydatif par les molécules antioxydantes est proposée comme un traitement thérapeutique potentiel dans la MA.

L'examen de la cavité enzymatique et le calcul de densité électronique confirme que la structure de Myricetin avec les quatre groupements de OH dans la position 3', 4', 5' et 3 forment une forte interaction de liaison hydrogène avec **Asp 32, Thr 231, Thr 232** de la β -sécrétase.

Le ligand Myricetin a quatre groupements de OH dans les positions 3', 4', 5' et 3 donc il a le pouvoir antioxydant le plus élevé et donne une meilleure complémentarité avec la β -sécrétase en formant le complexe le plus stable, il est considéré comme le meilleur ligand par rapport aux autres ligands de type flavonoïde pour l'inhibition de la β -sécrétase responsable de la formation de β -amyloïde agent des plaques séniles. Une étude comparative de la concentration en mg/L de Myricetin dans le thé infusion, le jus de tomate révèle que la concentration de Myricetin dans le jus de tomate est de 10 mg/L, cette dose naturelle est très bénéfique pour diminuer l'évolution de la maladie d'Alzheimer durant le premier stade.

En perspectives des tests sur des patients en premier stades est souhaitable pour proposer une ration alimentaire à base de jus de tomate riche en Myricetin. Cette application naturelle n'a aucun effet secondaire sur la santé des malades contrairement au traitement médicamenteux. Si les résultats sont bons on peut gagner du temps de point de vue longévité des malades.

Theoretical Study of the Inhibition of β -Secretase

I. ABDELLI, S. SARI, C. ZIANI-CHÉRIF and S. GHALEM*

Laboratory of Organics Chemistry, Analyses and Natural Substances (COSNA)
Department of Chemistry, Faculty of Sciences Aboubakr Belkaid University
Tlemcen, Algeria

E-mail: s_ghalem2002@yahoo.fr; i_abdelli@yahoo.fr

The brain of the human being suffering of the Alzheimer disease undergoes modifications caused by enzymes *e.g.*, β -secretase and γ -secretase. These enzymes produce fragments of amyloid β . The inhibition of the cleavage of this amyloid β by enzymes β and γ -secretase prevents the amyloid forming deposits plates and can improve the efficiency of the system of the elimination. Our research objective is to study the inhibition of the β -secretase by the methods of molecular modelling.

Key Words: Alzheimer disease, β -Secretase inhibitors, Molecular modelling.

INTRODUCTION

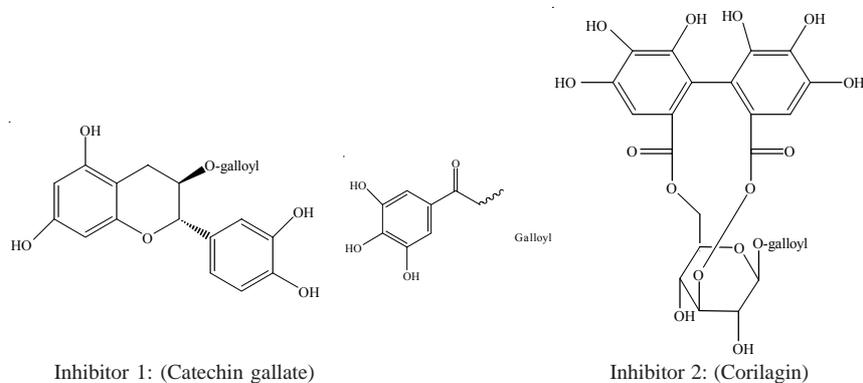
Alzheimer disease is a degenerative disease of the brain from which there is no recovery. The disease attacks nerve cells in all parts of the cortex of the brain, as well as some surrounding structures, thereby impairing a person's abilities to govern emotions, recognize errors and patterns, coordinate movement and memory. At the last, an affected person loses all memory and mental functioning¹.

β -Secretase is an enzyme that appears to be directly involved in the early development of Alzheimer disease. β -Secretase^{2,3} is a protease (an enzyme that catalyzes the splitting of interior peptide bonds in a protein).

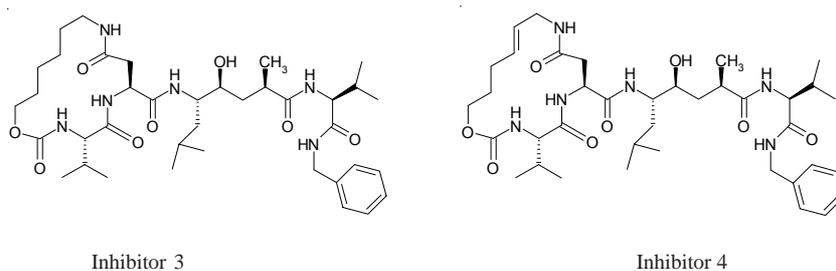
The discovery of this enzyme was made in 1999⁴⁻⁷ and may lead to the development of drugs designed (inhibitors) to block this enzyme and hopefully block the progression of Alzheimer disease.

The inhibitors used in present work were divided into 2 categories A and B on the basis of their geometries and their nature.

Category A: The inhibitors of this category are natural substances extracted the green tea⁸, their structure is represented below:



Category B: The inhibitors of this category represent the cycloamide-urethane derivatives⁹, they are obtained by synthesis. They have the following structures:



THEORETICAL APPROACH

The downloading of β -secretase was made from the data base Bookhaven Protein Data Bank (access code 1FKN) it is co-crystallized with inhibitor OM99-2.

The three-dimensional structure of β -secretase was obtained by diffraction in X-ray with a resolution (1.90 Å). It is noticed that β -secretase crystallizes in the dimer forms (Fig. 1).



Fig. 1. The dimerous form of β -secretase

With the reducing effect of molecular modelling, we simplified the model of the enzyme and retained only one monomer (Fig. 2). This monomer comprises the amino acids forming the active site (Fig. 3).

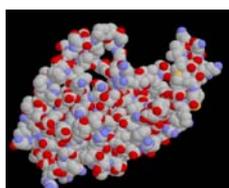


Fig. 2. Simplified model of β -secretase

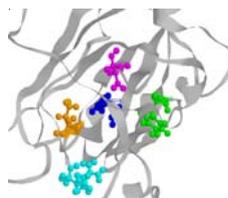


Fig. 3. Amino acids of the active site (Asp32, Tyr198, Asp228, Thr232, Arg235)

The optimization of the geometry¹⁰ of the β -secretase was carried out using the field of forces Amber99.

The main chain was maintained rigid, whereas the lateral chains remain flexible. This approximation allows the lateral chains of proteins to more easily find the position in which the interactions are the most favourable.

The value of the energy of optimization is: $E_{\text{Opt}} = -1933.20$ Kcal/mol.

The optimization of all the inhibitors was made by program EMO¹¹⁻¹⁴. The results obtained are collected in Table-1.

TABLE-1
RESULTS OBTAINED USING PROGRAM EMO

Steric energy (KJ/mol)	$E_{\text{Stretching}}$	E_{Bending}	E_{Torsion}	E_{Vdw}	$E_{\text{Electrostatic}}$	E_{Steric}
Inhib-1	7.59	44.14	-76.12	108.33	-55.73	27.61
Inhib-2	27.38	119.49	159.12	252.69	-102.46	456.22
Inhib-3	22.65	134.49	7.79	169.29	-65.09	269.15
Inhib-4	22.28	162.54	65.69	205.46	-109.28	346.70

After optimization of all the inhibitors, we made a calculation of load to attribute to each atom an electronic partial load, for it we used the software AMPAC.

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular dynamics of the β -secretase (Fig. 4): This stage is necessary to eliminate conformations the least favourable and to lead to the most stable conformation.

We began dynamics with an initialization of the system: with $t = 0$, we have $R(T) = 0$, *i.e.* the initial structure, previously minimized. Then we

heated the system up to 300 K during 1000 steps with a step of integrations of 1fs.

In 300 K, there is an equilibration. Speeds are straightened to keep the constant temperature (there is exchange between the kinetic energy and the potential energy). Then, there is production of conformations. The time of simulation of the molecular dynamics is 100 picoseconds.

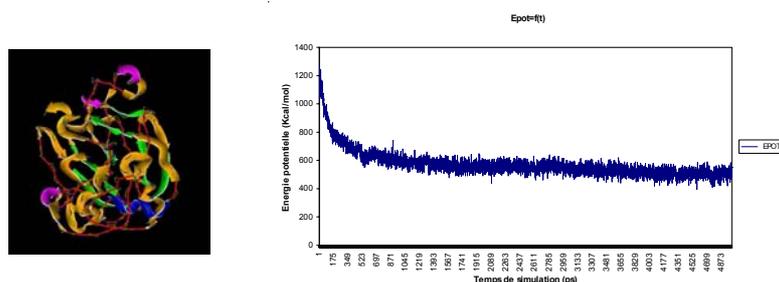


Fig. 4. Variation of the potential energy of the 1FKN only according to time

Molecular dynamics of the inhibitors:

A) Inhib-1:

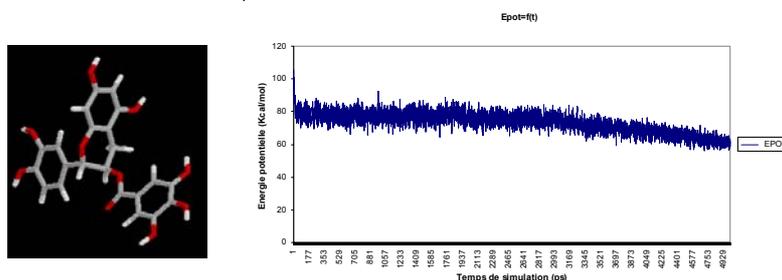


Fig. 5. Variation of the potential energy of the inhib-1 only according to time

B) Inhib-2:

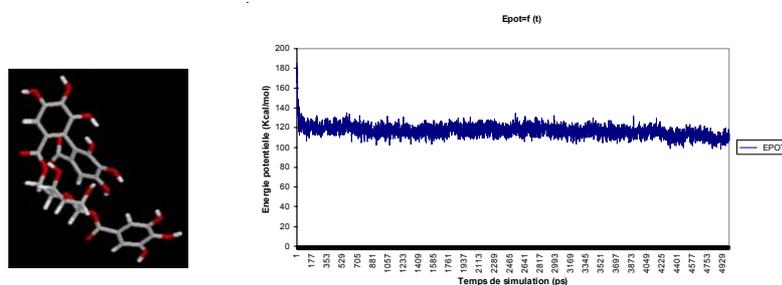


Fig. 6. Variation of the potential energy of the inhib-2 only according to time

C) Inhib-3:

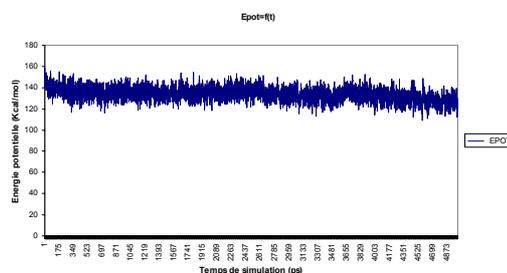
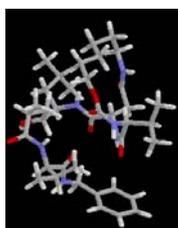


Fig. 7. Variation of the potential energy of the inhib-3 only according to time

D) Inhib-4:

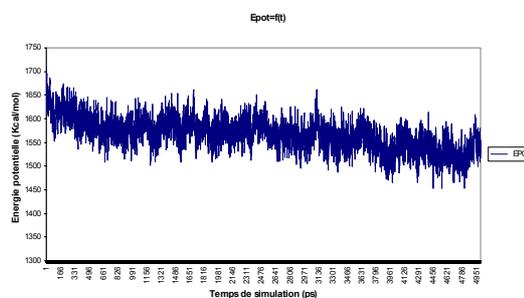
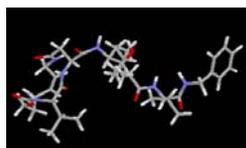


Fig. 8. Variation of the potential energy of the inhib-4 only according to time

Docking molecular: This step consists moved closer to two entities molecular that is the location of the inhibitors in the active site of β -secretase (forming of the complexes). We used the Dock program of the software ChemOffice (2000).

Once all the complexes were formed, we are going to make an optimization of the geometry and a calculation of molecular dynamics to look for the most stable conformation.

a) Complex 1FKN-Inhib-1:

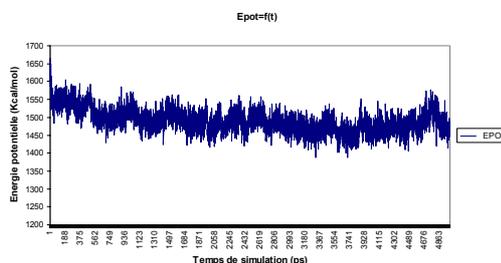


Fig. 9. Variation of the potential energy of complex 1 according to time

b) Complex 1FKN-Inhib-2:

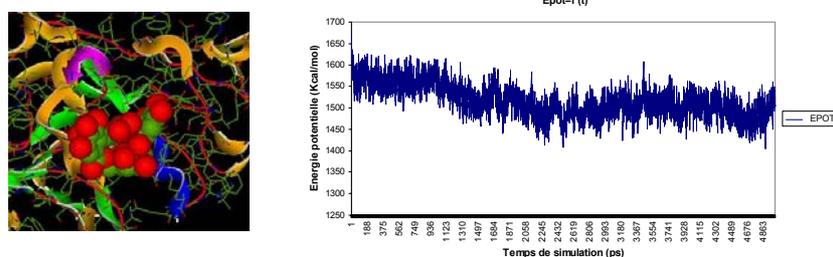


Fig. 10. Variation of the potential energy of complex 2 according to time

c) Complex 1FKN-Inhib-3:

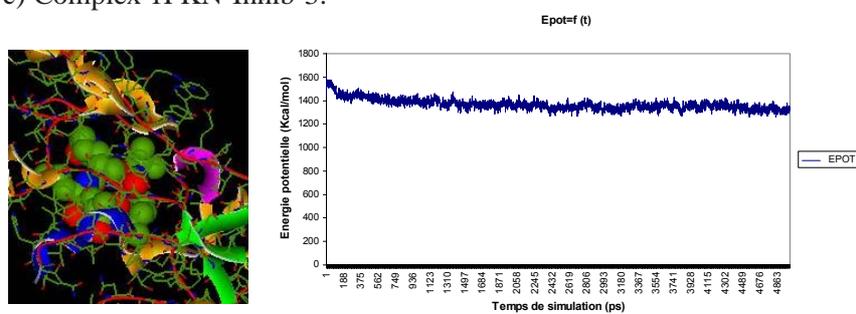


Fig. 11. Variation of the potential energy of complex 3 according to time

d) Complex 4 1FKN-Inhib-4:

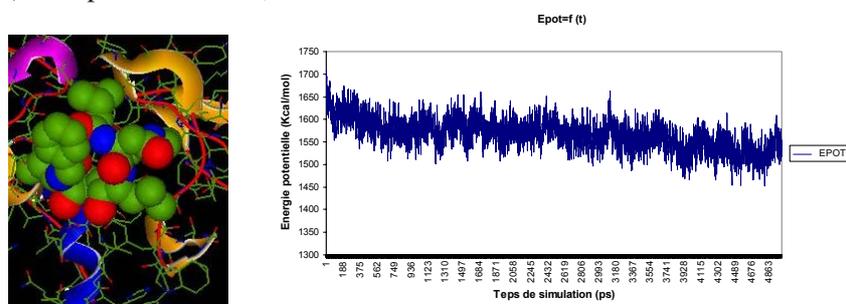


Fig. 12. Variation of the potential energy of complex 4 according to time

Distances separating the amino acids from the active site and the groups of inhibitors:

TABLE-2
DISTANCE IN Å MEASURED BETWEEN THE GROUPINGS OF INHIB1
AND THE GROUPINGS OF THE SIDE CHAINS OF AMINO ACIDS
RESPONSIBLE FOR INTERACTION

	Asp32	Tyr198	Asp228	Thr232	Arg235
Inhib1	6.10	9.62	6.02	8.75	11.94

TABLE-3
DISTANCE IN Å MEASURED BETWEEN THE GROUPINGS OF INHIB-2
AND THE GROUPINGS OF THE SIDE CHAINS OF AMINO ACIDS
RESPONSIBLE FOR INTERACTION

	Asp32	Tyr198	Asp228	Thr232	Arg235
Inhib-2	6.94	7.63	12.37	2.99	2.42

TABLE-4
DISTANCE IN Å MEASURED BETWEEN THE GROUPINGS OF INHIB-3
AND THE GROUPINGS OF THE SIDE CHAINS OF AMINO ACIDS
RESPONSIBLE FOR INTERACTION

	Asp32	Tyr198	Asp228	Thr232	Arg235
Inhib-3	3.73	24.21	10.05	8.46	8.15

TABLE-5
DISTANCE IN Å MEASURED BETWEEN THE GROUPINGS OF INHIB-4
AND THE GROUPINGS OF THE SIDE CHAINS OF AMINO ACIDS
RESPONSIBLE FOR INTERACTION

	Asp32	Tyr198	Asp228	Thr232	Arg235
Inhib-4	3.02	14.04	6.84	8.54	2.86

The energies of interactions between the β -secretase and the various studied inhibitors are calculated from the following relation:

$$E(\text{interaction}) = [E_{\text{pot}}(\text{complex enzyme - inhibitor})] - [E_{\text{pot}}(\text{enzyme}) + E_{\text{pot}}(\text{inhibitor})]$$

It is necessary to take into account also Van der Waals's interactions because it is the interactions between nondependent atoms that stabilize complex enzyme-inhibitor.

TABLE-6
RESULTS OF INTERACTIONS ENERGIES (Kcal/mol)

Inhibitors	(Kcal/mol)						Category
	$E_{\text{total pot of the complex E-I}}$	$E_{\text{total Pot of the inhibitor I}}$	$E_{\text{vdw (complex-inhibitor)}}$	$E_{\text{vdw (inhibitor)}}$	$E_{\text{vdw inter.}}$	$E_{\text{total inter}}$	
Inhib-1	1474.05	60.56	-679.25	25.58	-39.72	867.90	A
Inhib-2	1541.54	111.26	-703.89	29.09	-67.87	884.78	A
Inhib-3	1336.00	118.77	-1048.2	21.40	-420.30	671.73	B
Inhib-4	1552.51	134.45	-738.10	31.21	-104.21	872.57	B

Potential energy of the β -secretase only is: $E_{\text{pot}} = 545.48$ (Kcal/mol).
Potential energy of the β -secretase only is: $E_{\text{vdw}} = -665.11$ (Kcal/mol).

The values of K_i and IC_{50} are given below:

TABLE-7
VALUES OF K_i AND IC_{50}

Category A		Category B	
Inhibitors	IC_{50}	Inhibitors	K_i
Inhib-1	6.0×10^{-6} M	Inhib-3	25.1 nM
Inhib-2	1.6×10^{-4} M	Inhib-4	14.2 nM

In the light of the results obtained during present work, it emerges that the values obtained relating to energies of total interaction are of the same order of magnitude for both categories with the exception of the inhibitor 3.

The inhibitor 3 belonging in the category B constituted by 114 atoms, synthetic product possesses an important number of doublet and being able to interact with the residues of the active site, possesses an energy of (671.73 Kcal/mol) who can engender a conformation favourable to an important complementarity which from a consequent activity.

It is noted a peculiarity between the inhibitor 3 and the inhibitor 4, on the level of this last the presence of a double connection inserted in the cycle into 17 links which confers a relatively stable conformation of energy less low than the inhibitor 3; thus an interaction of atom nondependent is less important.

This structure presents a relatively cumbersome conformation from where a steric gene influencing the stability of the complex.

Distances measured between the groupings of the inhibitors and those of the side chains, by not considering that the most brought closer groupings show according to the inhibitor considered of the interactions variable of 2.42 to 24.21 Å.

The interactions ranging between 2.5 and 3.1 Å are regarded as strong and those ranging between 3.1 and 3.55 Å are supposed to be average. The interactions higher than 3.55 Å are weak¹⁵.

The examination of the cavity of the active site (Fig. 10) presents geometry of 8.65 Å of depth, an opening of 16.76 and 9 Å, this narrowed pocket reaching a width of 12.61 Å.

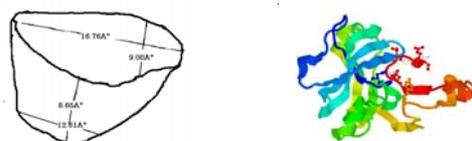


Fig. 13. Dimension of the cavity enzymatique

The category A, natural products extracts of the green tea, presents a geometry of association of cycle at 6 links and a less number of electronic doublet being able to interact with the residues of the active site.

By taking account of the various geometrical constraints, the approach according to inhibitors' considered raises difficulties being able to influence the complementarity and consequently the activity.

The exploitation of some experimental data in occurrence⁸ the IC_{50} for the structures of category A and while being based on energy of total interaction, shows an agreement acceptable for inhibitors 1 and 2. Indeed, inhibitor 1 (867.90 Kcal/mol) is more active ($IC_{50} = 6 \times 10^{-6}$ M) than inhibitor 2 (884.76 Kcal/mol) with $IC_{50} = 1.6 \times 10^{-4}$ M.

Concerning the category B, K_i (constants of inhibition)⁹ available and total energies of interaction, show the following order: inhibitor 3 (671.73 Kcal/mol) with $K_i = 25.1$ nM is more active than inhibitor 4 (872.57 Kcal/mol) with $K_i = 14.2$ nM.

The examination of the values of the energy of Van der Waal's interaction which is generally retained to explain the interactions between biological systems, show that in certain structures; mainly the category A whose geometry and characterized by a steric obstruction, the order of stability is relatively disturbed.

Inhibitor 1 (-39.72 Kcal/mol, $IC_{50} = 6 \times 10^{-6}$ M) normally more stable than inhibitor 2 (-67.87 Kcal/mol, $IC_{50} = 6 \times 10^{-4}$ M), is observed destabilizing taking into account the values of the energy of van der Waals. The same order is obtained by examining the values of the IC_{50} . Allotting this disorder in the classification to us to a competitive inhibition of with the geometry of the inhibitors.

This phenomenon is generated by a change of conformation of the enzyme (active site) which prevents the mutual connection of the substrate.

Another probable approach is that the connection of the inhibitor to the free enzyme with a site meadow of the active site can prevent the connection of the substrate by steric obstruction which is probably the present case.

Conclusions

This modest work consists in studying the inhibition of β -secretase which is an enzyme involved in the Alzheimer's disease by method of molecular modelling.

Within sight of the results obtained and experimental values recorded in the bibliography, it arises:

1st classification: while basing itself on the energy of total interaction.

Inhib-3 > Inhib-1 > Inhib-4 > Inhib-2

2nd classification: while basing itself on the energy of van der Waals's interaction.

Inhib-3 > Inhib-4 > Inhib-2 > Inhib-1

Thus according to these 2 classifications, we can say that the inhibitor 3 would be probably the best to slow down the evolution of studied pathology (Alzheimer's disease).

REFERENCES

1. C. Belisle and B. Rivard, The insanity of the Alzheimer type and other attacks cognitive. Ed. Formed, MI (1999).
2. A.K. Ghosh, L. Hong and J. Tang, *Curr. Med. Chem.*, **9**, 1135 (2002).
3. M.S. Wolfe, *J. Med. Chem.*, 44 (2001).
4. I. Hussain, D. Powell and et al, *Mol. Cell Neurosci.*, **14**, 419 (1999).
5. S. Sinha, J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensaaari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue and V. John, *Nature*, **402**, 537 (1999).
6. R. Vassar, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.-C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers and M. Citron, *Science*, **286**, 735 (1999).
7. R. Yan, M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashler, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson and M.E. Gurney, *Nature*, **402**, 533 (1999).
8. S.Y. Jeon, K. Bae, Y.H. Seong and K.S. Song, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3905 (2003).
9. A.K. Ghosh, T. Devasamudram, L. Hong, C. De Zutter, X. Xu, V. Weerasena, G. Koelsch, G. Bilcer and J. Tang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 15 (2005)
10. D.A. Case, D.A. Pearlman, J.W. Caldwell, T.E. Cheatham III, W.S. Ross, C.L. Simmerlig, T.A. Darden, K.M. Merz, R.V. Stanton, A.L. Cheng, J.J. Vincent, M. Crowley, V. Tsui, R.J. Radmer, Y. Duan, J. Pitera, I. Massova, G.I. Seibel, U.C. Singh, P.K. Weiner and P. A. Kollman, Amber6, University California, San Francisco, USA (1999).
11. A. Bouraoui, M. Fathallah, B. Blaive and R. Gallo, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1211 (1990).
12. A. Bouraoui, M. Fathallah, F.M. Henni, B. Blaive and R. Gallo, in ed.: J.L. Rivail, Modeling of Molecular Structures and Properties. Proceeding of an International Meeting Nancy, France, 11-15, September, Studies in Physical and Theoretical Chemistry, Vol. 71, pp. 381-393 (1989).
13. A. Zinelabidine, A. Bouraoui, M. Fathallah, F.M. Henni, B. Blaive and R. Gallo, *J. Mol. Struct. (Theochem.)*, **286**, 267 (1993).
14. B. Blaive, G. Legsaï and R. Lai, *J. Mol. Struct.*, **354**, 245 (1995).
15. A. Imberty, K.D. Hardman, J.P. Carver and S. Pérez, *Glycobiology*, **1**, 631 (1991).

(Received: 19 October 2006;

Accepted: 18 June 2007)

AJC-5717

Molecular Modelling of Green Tea Catechins Inhibitors of Human Brain BACE1

I. Abdelli*, S. Sari. & S. Ghalem.*

Abdelli, Sari & Ghalem are with UNIVERSITY ABOU BEKR BELKAID - TLEMEN DEPARTEMENT OF CHEMISTRY. Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA)

Abstract

The research and the synthesis of new chemical compounds are often associated by a molecular modelling study. The molecular modelling is an allowing technique, not only to represent the properties and the chemical reactions but also to treat the models of the structures in two or three dimensions. It implies the use of the theoretical methods of calculation (molecular mechanics, molecular dynamic, and quantum mechanics) allowing to determine the geometry, the configuration of the atoms of a molecule and to evaluate the properties physicochemical of the molecule. Our work consists to study by the methods of molecular modelling the derivatives of catechin which is a natural substance extracted the green tea. They are inhibitors of b-secretase (BACE1) enzyme implied in Alzheimer disease.

Citation: I. Abdelli., S. Sari. & S. Ghalem. "Molecular Modelling of Green Tea Catechins Inhibitors of Human Brain BACE1" IBSscientific Journal Of Science Volume 3(2) pp 27,29 2008

Copyright: © I. Abdelli et al. This is an open-access article. Unrestricted use, distribution or reproduction in any medium of the article is permitted provided the original work is properly cited.

Article Submitted: 08 Oct 2007 **Accepted:** 09 March 2008

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* **Correspondence:** i_abdelli@yahoo.fr s_ghalem2002@yahoo.fr

Alzheimer disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disease, affecting approximately 20 millions people worldwide. As a progressive disorder, it gradually robs the patient of cognitive function including memory and thinking ability, ultimately leading to death [1a-3]. AD account for 60% to 70% of cases of progressive cognitive impairment in elderly patients. It is more common among women than men by a ratio of 1.2 to 1.5. In the United State alone, the number of new cases per year has been estimated to 360000 equating 40 new cases every hour [4].

The accumulation of the β -amyloid peptide ($A\beta$) in the brain is the central event leading to the development of AD [5]. $A\beta$ is a 40/42-residue fragment of the brain transmembrane protein β -amyloid precursor protein (APP), released by two proteases known as the β - and γ -secretases (Figure 1). Currently, there is a great deal of interest in the development of inhibitor drugs against β -secretase for several reasons. The activity of this protease is an early step in the pathogenesis pathway common to all familial and sporadic forms of AD. The recent identification of β -secretase to be an aspartic protease has also raised the hope that its drug development can be as successful as that of HIV protease, another aspartic protease. Finally, the absence of phenotype in mice devoid of a functional β -secretase gene suggests that the inhibition of this protease during clinical treatment is physiologically tolerable [6-8].

Summary

Younes Mokrab

Postdoctoral Associate, Department of Biochemistry Oxford

Molecular modelling is becoming an increasingly powerful tool for modern 'rational' drug discovering and drug design. The last ten years saw a remarkable advancement in the knowledge of protein three-dimensional structures at the atomic level, notably for proteins playing essential biological functions such as enzymes, ion channels and transporters. Therefore, it has become possible to rationally target specific proteins with small chemical compounds, potentially identifying new lead drugs. In the present issue, Ghalem and Abdelli present a short illustration on this subject, studying the interaction of a key human enzyme, B-secretase with potential inhibitors from Green Tea.

IDENTIFICATION OF β - SECRETASE

The cloning of a new human aspartic protease identified to be β -secretase was independently reported by five laboratories [9-13]. There was remarkable agreement from these works in the properties of this new protease, including its presence in the brain, its activity in an acidic environment, its cellular co-localization with APP possibly in endosomes, the cleavage at the β -secretase site of APP, and the faster cleavage of Swedish mutant of APP than the native APP. This and other evidence led to the conclusion that this new protease was indeed the long sought β -secretase. Since the name β -secretase did not appropriately reflect its protease nature, several new names were given. The name memapsin 2 [13] is rooted in the "MEMbrane Aspartic Protease of the pepSIN family" and the number 2 distinguishes it from a homologous protease memapsin 1. This name conforms with the nomenclature of aspartic proteases recommended by the IUBMB Enzyme Nomenclature [14], e.g., pepsin, gastricsin, cathepsin etc. Other names used were BACE 1, an acronym based on " β -site APPcleaving enzyme" [9], ASP-2 [10, 12] and 'membrane-bound aspartic protease' [11]. The structures of β -secretase with amino acids of the active site are represented in the (Figures 2 and 3).

THEORETICAL APPROCH

In the course of searching for BACE1 (β -secretase) inhibitors from natural products, the ethyl acetate soluble fraction of green tea, witch was suspected to be rich in catechin content, showed potent inhibitory activity. The structures of the inhibitors [15] are represented in the (Figure 4).

- (1) : (+)-Catechin
- (2) : (-)-Catechin
- (3) : (+)-Epicatechin
- (4) : (-)-catechin gallate.

All calculations were carried with Gaussion 03W, version 6.0 [16]. A conformational analysis was performed, for inhibitors, on all rotatable bonds using an option "scan" in the EMO program, and then the found structures were minimized using Molecular Force Field EMO (MM2-

Allinger) and fully optimized at DFT level using hybrid B3LYP functional density with 6-31G* basis set and POP=NPA [17-20].

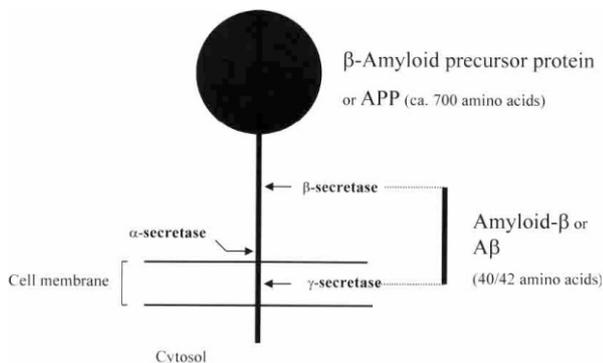


Figure 1 : Schematic presentation of the production of Aβ involving γ-, β -secretase (BACE1), the development of the Alzheimer's disease.

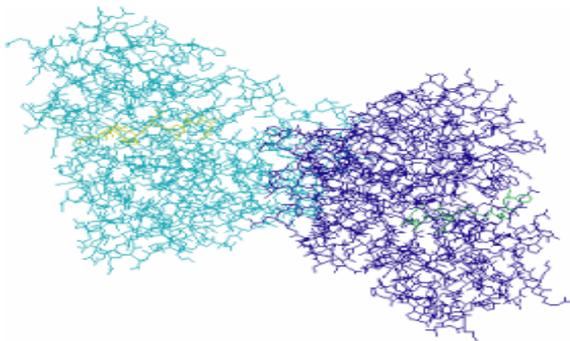


Figure 2: Structure of β-secretase (code pdb 1FKN)

Comparing these values of energy, we remark that the catechin gallate (which represent the lowest value of IC50= 6.0 10⁻⁶) has the low value of energy (-1676.1204571 eV). We can explain this difference in values by the structure of the inhibitors, we notices that all the inhibitors are cycles with 6 links which to differentiate by the groupings R1 and R2. Thus according to these resulted one can say the catechin gallate can present a better activity by contribution at the other inhibitors

CONCLUSION

This modest work consist in studying the inhibition of Bace1 which is an enzyme involved in the Alzheimer disease by methods of molecular modelling. Within sight of the results obtained and experimental values recorded in the bibliography, it arises that the catechin gallate would be probably the best to slow down the evolution of pathology (Alzheimer disease).

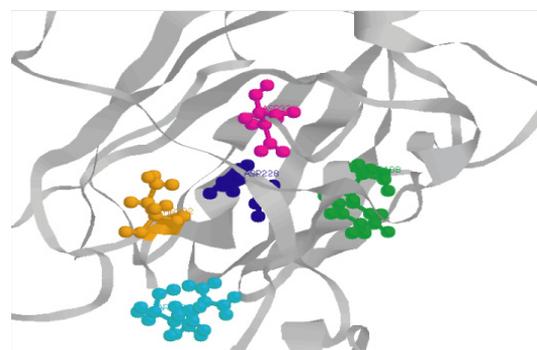


Figure 3: Amino acids of active site of β-secretase

RESULTS AND DISCUSSION

The IC50 values are presented in the Table 1. To check the fundamental structure-activity relationships, the inhibitory activities of authentic catechins such as (+)-catechin (1), (-)-catechin (2), (+)-epicatechin (3), (-)-catechin gallate (4) were tested [15]. As a result 1, 2 and 3 showed relatively low activity regardless of their stereochemistry (Table 1). Therefore, at least, a pryrogallol moiety in the catechin skeleton appeared to be essential for the stronger inhibitory activity (compound 4 IC50=6.0 10⁻⁶). Of the purpose of our work which consists has to study this activity of various inhibitors by the theoretical methods one basing itself on the values of energy of activity.

INHIBITORS	IC50 (M)
(+) Catechin	3.5 10 ⁻⁵
(-) Catechin	3.0 10 ⁻⁵
(+) Epicatechin	2.8 10 ⁻⁵
(-) Catechin gallate	6.0 10 ⁻⁶

TABLE 1: IC50 Values of catechins as BACE1 inhibitors

In the light of the results obtained during our work, it arises that the values obtained relating to energies Table2 are in the same order of magnitude for all inhibitors.

INHIBITORS	ENERGY DFT (eV)
(+) Catechin	-1031.041268
(-) Catechin	-1031.0400527
(+) Epicatechin	-1031.0387096
(-) Catechin gallate	-1676.1204571

TABLE 2: Energy Values of catechins as BACE1 inhibitors

REFERENCES

- [1a] J.L. Cummings, G. Cole, "Alzheimer Disease", 2002, JAMA, 287: 2335-8.
- [1b] D.T. Villard, J.C. Morris, "The diagnosis of Alzheimer's", 1998, Alz. Dis Re, 3: 142-52.
- [2] D.J. Selkoe, "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy", 2001, Physiological Reviews, 81: 741-66.
- [3] D.J. Selkoe, P.J.R. Lansbury, "Biochemistry of Alzheimer's disease and prion diseases". 1999, In: G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher, M.D. Uhler 6th Ed, Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects, Philadelphia, Lipincott-Raven, 949-68.
- [4] R. Brookmeyer, S. Gray, C. Kawas., "Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset", 1998, Am J public Health, 88: 1337-42.
- [5] D.J. Selkoe, Nature 399A, 1999, 23-31.
- [6] H. Cai, Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D.R. Borchelt, D.L. Price, P.C. Wong, Nature Neuroscience, 2001, 4: 233-234.
- [7] Y. Luo, B. Bolon, S. Kahn, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J. Louis, Q. Yan, W.G. Richards, M. Citron, R. Vassar, Nature Neuroscience, 2001, 4: 231-232.
- [8] S.L. Roberds, J. Anderson, G. Basi, M.J. Bienkowski, D.G. Branstetter, K.S. Chen, S.B. Freedman, N.L. Frigon, D. Games, K. Hu, K. Johnson-Wood, K.E. Kappeman, T.T. Kawabe, I. Kola, R. Kuehn, M. Lee, W. Liu, R. Motter, N.E. Nichols, M. Power, D.W. Robertson, D. Schenk, M. Schoor, G.M. Shopp, M.E. Shuck, S. Sinha, K.A. Svensson, G. Tatsuno, H. Tintrup, J. Wijsman, S. Wright, L. McConlogue, Human Mol. Genetics, 2001, 10: 1317-24.
- [9] S.L. Roberds, J. Anderson, G. Basi, M.J. Bienkowski, D. G. Branstetter, K.S. Chen, S.B. Freedman, N.L. Frigon, D. Games, K. Hu, K. Johnson-Wood, K.E. Kappeman, T.T. Kawabe, I. Kola, R. Kuehn, M. Lee, W. Liu, R. Motter, N.E. Nichols, M. Power, D.W. Robertson, D. Schenk, M. Schoor, G.M. Shopp, M.E. Shuck, S. Sinha, K.A. Svensson, G. Tatsuno, H. Tintrup, J. Wijsman, S. Wright, L. McConlogue, 2001 Human Mol. Genetics, 10: 1317-24.
- [10] R. Yan, M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, M.E. Gurney, 1999, Nature, 402: 533-7.
- [11] S. Sinha, J. P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensaari, S. Wang, D. Walker and V. John, 1999, Nature, 402: 537-40.
- [12] J. Hussain, D. Powell and D.R. Howlett, 1999, Mol. Cell Neurosci, 14: 419-27.
- [13] X. Lin, G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, J. Tang, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 1456-60.
- [14] International Union of Biochemistry, Molecular Biology Enzyme Nomenclature, Academic Press, San Diego; also at website: www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/3423.html#23 1992.
- [15] So-Young Jeon, KiHawan Bae, Yeon-Hee Seong and Kyung-Stik Song, "Green Tea Catechins as a BACE1 (=Secretase) Inhibitor", 2003, Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters, 13: 3905-3908.
- [16] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A.Jr. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V.Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J.Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, P.H. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, D.A. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, O. Cui, A.G.

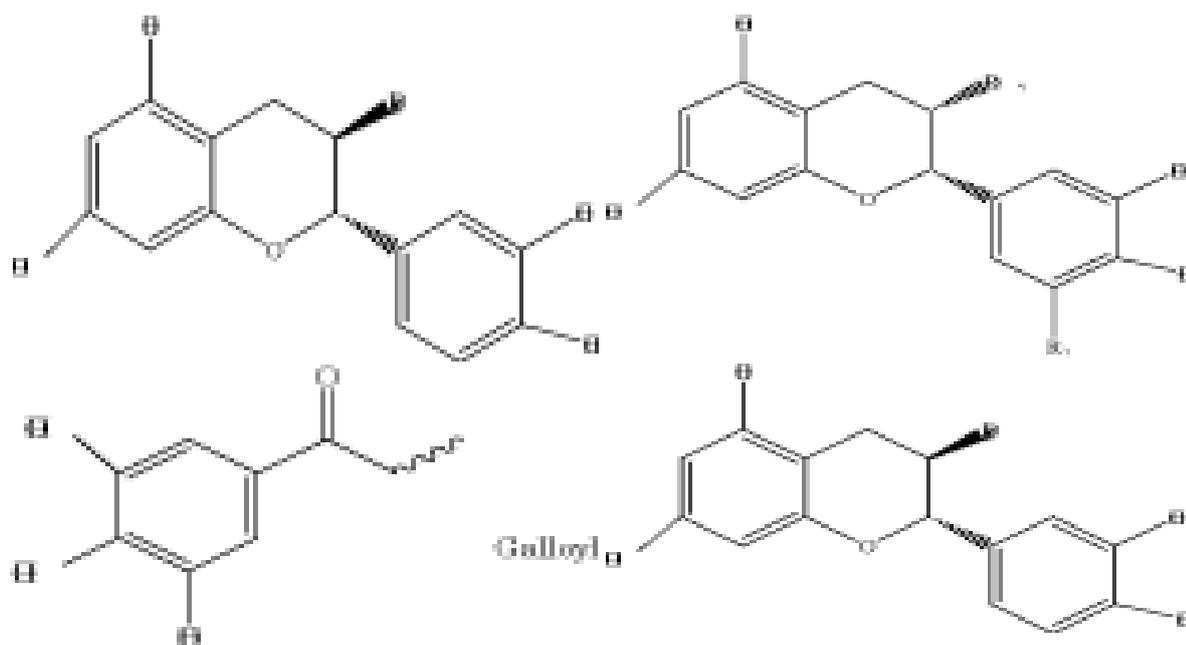


Figure 4: Structures of the various inhibitors. A: 1: R1=H, R2=H, 2 : Enantiomer of 7; B: 3: R1=H, R2=H

[11] S. Sinha, J. P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensaari, S. Wang, D. Walker and V. John, 1999, *Nature*, 402 : 537-40.

[12] J. Hussain, D. Powell and D.R. Howlett, 1999, *Mol. Cell Neurosci*, 14: 419-27..

[13] X. Lin, G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, J. Tang, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 1456-60.

[14] International Union of Biochemistry, *Molecular Biology Enzyme Nomenclature*, Academic Press, San Diego; also at website: www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/3423.html#23 1992.

[15] So-Young Jeon, KiHawan Bae, Yeon-Hee Seong and Kyung-Stik Song, "Green Tea Catechins as a BACE1 (–Secretase) Inhibitor", 2003, *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters*, 13: 3905-3908.

[16] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A.Jr. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V.Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J.Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, P.H. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, D.A. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian 03, Revision C.02; Gaussian: Wallingford, CT, 2004.

[17] A. Bouraoui, M. Fathallah, B. Blaive and R. Gallo, 1990, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, Vol. V (1211).

[18] A. Bouraoui, M. Fathallah, F. M. Henni, B. Blaive and R. Gallo, in ed.: J.L. Rivail, "Modelling of Molecular Structures and Properties", 1989, *Proceeding of an International Meeting Nancy, France*,

11,15, September, *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, 71: 381.

[19] A. Zinelabidine, A. Bouraoui, M. Fathallah, F. M. Henni, B. Blaive and R. Gallo, 1993, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 286: 267.

[20] B. Blaive, G. Legsaí and R. Láí, 1995, *J. Mol. Struct.* 354: 245.

Theoretical study of corrosion inhibition by bipyrazolic derivatives

S. Sari.* , I. Abdelli. & S. Ghalem.*

Sari, Abdelli & Ghalem are with UNIVERSITY ABOU BEKR BELKAID - TLEMCEM DEPARTEMENT OF CHEMISTRY. Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA)

Abstract

Corrosion is a field which touches all kinds of materials (metals, ceramics, polymers) in variable environments (aqueous medium, atmosphere, high temperatures). We can not stop corrosion but we can control it and slow down it by using inhibitors to prolong the lifespan of protected surface. The use of the organic inhibitors is one of the most practical methods for protection against corrosion in particular in acid medium. Corrosion inhibitors may be divided into three broad classes, namely oxidizing, precipitation and adsorption inhibitors [1]. Compounds containing nitrogen, oxygen, sulphur and phosphorous in the conjugated system have particularly been reported as efficient corrosion inhibitors [2, 3]. The choice of the inhibitors was based on the fact that these compounds contains π -electrons and heteroatoms such as N, O and S, which involve greater adsorption of the inhibitor molecules onto the surface of mild steel [4].

Citation: S. Sari. I. Abdelli.,& S. Ghalem. "Theoretical study of corrosion inhibition by bipyrazolic derivatives" IBScientific Journal Of Science Volume 3(2) pp 30,31 2008

Copyright: © S. Sari et al. This is an open-access article. Unrestricted use, distribution or reproduction in any medium of the article is permitted provided the original work is properly cited.

Article Submitted: 08 Oct 2007 **Accepted:** 09 March 2008

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* **Correspondence:** sari_souad@yahoo.fr s_ghalem2002@yahoo.fr

Long experience and voluminous research have been devoted to find the easiest way to slow down iron and steel attack in acid. The use of inhibitors tasks more and more attention until now. The efficiency of an organic compound as corrosion inhibitor depends not only on the characteristics of the environment in which it acts, the nature of the metal surface and electrochemical potential at the interface, but also on the structure of the inhibitor itself, which includes the number of adsorption active centres in the molecule, their charge density, the molecule size, the mode of adsorption, the formation of metallic complexes and the projected area of the inhibitor on the metallic surface [5-6].

The molecular weight of the inhibitor has a direct influence on its inhibition efficiency. The increase in molecular weight of the inhibitor is due to an increase in the length of the hydrocarbon chain of amines [7], nitriles [8] or mercaptants. The rise of the inhibition efficiency is due to the inductive effect of the methyl groups. The effect of the molecular configuration encountered in compounds like sulphides and aliphatic amines has also studied [9].

Pyrazolic compounds are good inhibitors of iron corrosion in sulphuric and hydrochloric acid [10]. Their inhibiting effect is closely related to the molecular structure containing two nitrogen atoms in the pyrazolic ring. The aim of this work is to study theoretically the inhibition of the bipyrazolic compounds [11], which are synthesised and tested as a corrosion inhibitors of Armeo Iron [11], and the effect of the length of the chain between pyrazolic rings.

THEORETICAL APPROACH

Summary

Younes Mokrab

Postdoctoral Associate, Department of Biochemistry Oxford

Corrosion is an undesirable phenomenon which affects a wide range of industrial materials. Because it is caused by a complexity of factors inherent in the environment, a major focus has been on countering it using chemical compounds that decelerate the processes involved. In the current issue, Sari and Ghalem present a theoretical study for the use of the bipyrazolic class of chemical compounds as inhibitors for corrosion.

A conformational analysis, for all structures of inhibitors was performed using an option « scan » in the EMO program (Energy of MOI-ecule) and the found structures were optimized at DFT level using hybrid functional density B3LYP with 6-31G* basis set and POP=NPA (Gaussian 03). The structure of the studied bipyrazolic compounds are shown in figure 1.

RESULTS AND DISCUSSION

To investigate the influence of electronic structure on the efficiency of the compounds, some parameters such as the energies of molecular orbital, (high occupied molecular orbital energy), ELUMO (lowest unoccupied molecular orbital energy) and the dipole moment (μ) were carried out. The results are given in table 1. The energy of HOMO is often associated with the electron donating ability of a molecule. High value of E HOMO is likely to indicate a tendency of the molecule to donate electrons to appropriate acceptor molecules. Therefore the energy of LUMO indicates the ability of the molecule to accept electrons. The lower is the value of E LUMO, the more probable it is that the molecule accept electrons [12]. Consequently, less negative HOMO energy and the smaller energy gap (E LUMO - E HOMO) are reflected in a stronger chemisorptions bond and perhaps greater inhibition efficiency [13]. For the dipole moment (μ), lower value of (μ) will favour accumulation

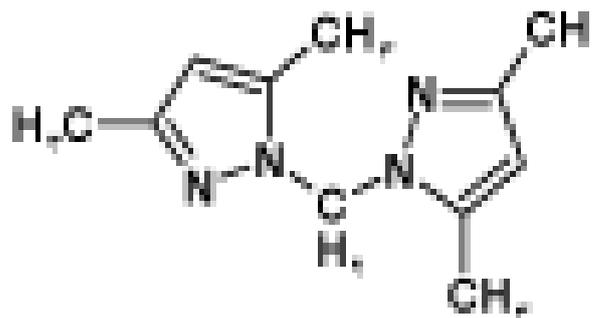


Figure 1 : Molecular structure of bipyrazole compounds studied. (A) Bis(3,5-dimethylpyrazolyl)methane (inh1).

of the inhibitor in the surface layer and therefore higher inhibition efficiency [14]. Meanwhile, several authors' state that the inhibition efficiency increases with increasing values of the dipole moment [15-16]. On the other hand, survey of literature reveals that several irregularities appeared in case of correlation of dipole moment with inhibitor efficiency [17-18]. The results obtained with theoretical calculation show that inh3 is the best inhibitor.

The inhibition efficiencies obtained can be explained by the length and the nature of the carbonic chain joining the two pyrazolic cycles. In fact, the bipyrazolic compounds differ by the number *n* of CH₂ groups between the pyrazolic cycles. The number *n* is equal to 1, 3 and 4 for the compounds 1, 2 and 3, respectively. It is clear that the maximum of inhibition is obtained for *n*=4 and on the both sides the efficiency decreases for *n*=1 and 3, respectively. This result is related to the high flexibility of the molecule with four CH₂; at *n*=1, the molecule loses its flexibility. The existence of two oxygens in compounds 4 and 5 has no effect and is accompanied by an augment in the efficiency.

Compound	E HOMO (eV)	E LUMO (eV)	ΔE (eV)	μ (D)
Inh1	-0.22968	0.01640	0.24608	0.1490
Inh2	-0.21848	0.02305	0.24153	2.5541
Inh3	-0.21592	0.02205	0.23797	3.5183
Inh4	-0.22307	0.02454	0.24761	4.7127
inh5	-0.22195	0.02096	0.24291	2.7986

Table1. Calculated quantum chemical indices

CONCLUSION

We can conclude that with higher alkyl chain length, the inhibition becomes high effective.

The band gap difference of 0.23797 eV, which is in favour of inh3, indicates that inh3 molecule can easily transfer an electron from HOMO level to LUMO level. However, we remark that this difference is principally supported by an increase of LUMO energy of inh1 indicating its lowest donor effect.

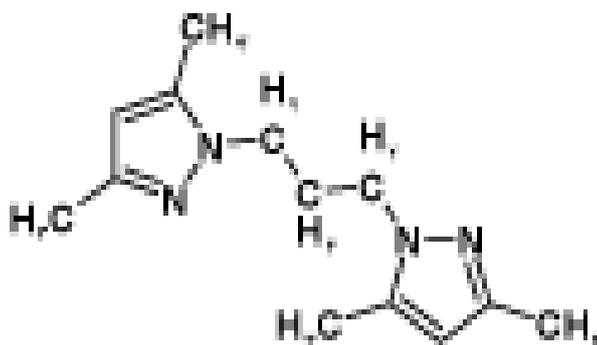


Figure 2: (B) 1,3-Bis (3,5-dimethylpyrazolyl) propane (inh2).

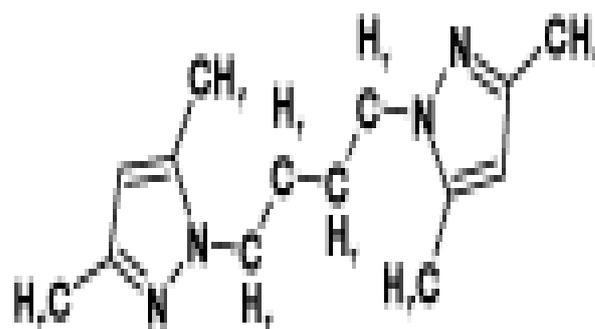


Figure 3: (C) 1,4-Bis(3,5-dimethylpyrazolyl) butane (inh3).

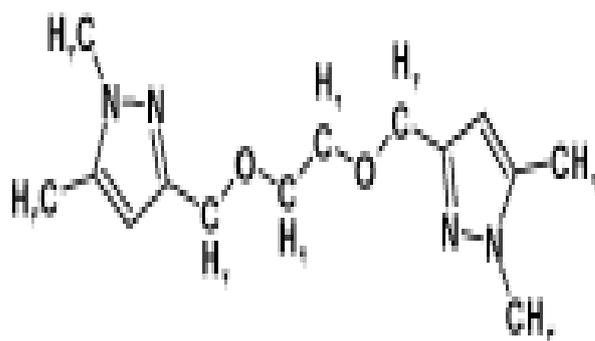


Figure 4: (D) 1,6-bis [1,5-dimethylpyrazol-3-yl] 2,5-dioxahexane (inh4).

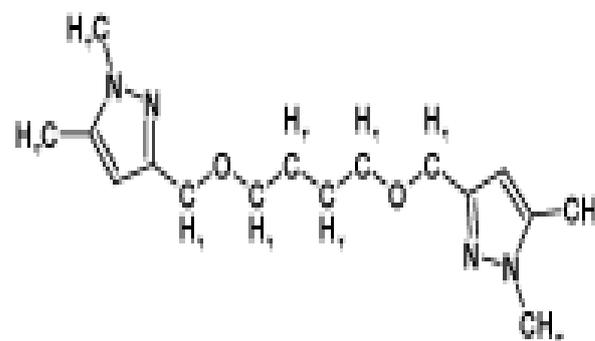


Figure 5: (E) 1,8-bis[1,5-dimethylpyrazol-3-yl] 2,7-dioxaoctane (inh5)

REFERENCES

- [1] J.M. Sykes, 1990, Br. Corros. J, 25: 175.
- [2] L. Larabi, Y. Harek, M. Traisnel, A. Mansri, 2004, J. Appl. Electrochem, 34: 833.
- [3] H.I. Wong, H. Fan, J. Zheng, Mater. 2004, Chem. Phys. 77: 655.
- [4] L. Larabi, Y. Harek, O. Benali, S. Ghalem, 2005, Progress in Organic Coatings, 54: 256-262.
- [5] A.Aouniti, B. Hammouti, M. Brighli, S. Kertit, F. Berhili, S. El Kadiri, A. Ramdani, 1996, J. Chim. Phys, 93: 924.
- [6] B.Hammouti, R. Salghi, S. Kertit, 1998, J. Electrochem. Soc. Of India, 47: 31.
- [7] S. Sankarapavinasan, F. Pishapinadon, M.F. Ahmed, 1991, Corrosion. Sci, 32: 193.
- [8] V. Carassiti, F. Zucchi, G. Trabaneli, 1970, 3 SEIC, Ann. Univ. Ferrara, N.S. Sez, 5: 525.
- [9] D.M.J.Incorvia, 1985, 6 SEIC, Ann. Univ. Ferrara, 8 : 81.
- [10] W.A.Badawy, N.M. Hefny, S.S. El Egamy, 1990, Corros. Sci, 36 : 978.
- [11] F. Touhami , 2000, Corrosion Science, 42 : 929-940.

- [12] I.Lukovits, K. Palfi, E. Kalman, 1997, Corrosion, 53 : 915.
- [13] H.F.Finley, N.Hackerman, 1960, J. Electrochem, Soc, 107: 259.
- [14] N.Khalil, Electrochim. Acta, vol. V (48), pp 2635, 2003.
- [15] M. Langrenée, B. Mernari, N. Chaibi, M. Traisnel, H. Vezin, F. Bentiss, 200, Corros.Sci, 43 : 951.
- [16] M. A. Quraishi, R. Sardar, 2003, J. Appl. Electrochem, 33: 1163.
- [17] K.F. Khaled, N. KBabié-Samardzija, Hackerman, 2005, Electrochim. Acta, 50: 2515.
- [18] G. Bereket, E. Hur, C. Ogretir, 2002, J. Mol. Struct. (Theochem), 578: 79.

الملخص

إن مرض الزهايمر هو عطب التشابكات العصبية الناتج عن تراكم ببتيد β أميلويد (BA) من منهج البروتين البروتيو ليتيك عن طريق كسر روابط APP بواسطة أنزيم BAC1 (β secretase). يعتبر تثبيط أنزيم (β secretase) من أهم مناهج معالجة مرض الزهايمر لمنع إنتاج الأميلويد (BA). جاءت فكرة اقتراح استعمال وادماج الفلافونويد الطبيعيين في تحديد نشاط الأنزيم (β secretase) من أهم محفز على تثبيط تطور هذا المرض. في هذا الصدد جاءت هذه المساهمة من أجل دراسة وتفعيل قدرة الفلافونويد على وقف نشاط هذا المرض بواسطة تقنيات النمذجة الجزيئية.

الكلمات المفتاحية: β secretase- الفلافونويد- مرض الزهايمر- تقنيات النمذجة الجزيئية.

Abstract

Generation and accumulation of the amyloid β peptide ($A\beta$) following proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) by BACE-1 (Beta-site APP Cleaving Enzyme-1, β -secretase) is a main causal factor of Alzheimer's disease (AD). Consequently, inhibition of BACE-1, a rate-limiting enzyme in the production of $A\beta$, is an attractive therapeutic approach for the treatment of AD. In this study, we discovered that natural flavonoids act as non-peptidic β -secretase inhibitors and potently inhibit β -secretase activity and reduce the level of secreted and consequently decrease the progression of AD. Our research consists to study with the method of molecular modelling (mechanic molecular- docking molecular) the inhibition of β -secretase.

Key words: Alzheimer disease, β -secretase, flavonoids, molecular modeling.

Résumé

L'accumulation du peptide β amyloïde (βA) suivant, le processus protéolytique de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par BACE-1 (beta-site APP enzyme de clivage-1, β -sécrétase) est le principal facteur de la maladie d'Alzheimer (MA). Par conséquent, l'inhibition de la BACE-1, une enzyme limitante dans la production de βA , est une approche thérapeutique attractive pour le traitement de la MA. Dans cette étude, nous avons découvert que les flavonoïdes naturels sont de bons inhibiteurs de β -sécrétase qui réduisent le taux de la sécrétion de βA dans les neurones corticaux primaires et par suite diminuer l'évolution de la MA. Le présent travail consiste à étudier l'inhibition de la β -sécrétase par les méthodes de modélisation moléculaire (mécanique moléculaire- Docking moléculaire).

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, β -sécrétase, flavonoïdes, modélisation moléculaire.