

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE POPULAIRE ET DÉMOCRATIQUE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE TLEMCEM

Faculté des Sciences

Département de Chimie



MÉMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme

De MASTER EN CHIMIE

Option : **Chimie Organique**

Présenté par

M^{lle} EL HADJ SAID kenza

Sujet

Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire

Soutenu le 15/10/2016, devant le Jury composé de :

Présidente	BEDRANE Sumeya	Professeur	UABT
Encadreur	MERAD Nouria	Maitre de Conférences	UABT
Examineurs	BENADALLAH Mohamed	Maitre de Conférences	UABT
	MOSTEFA-KARA Bachir	Professeur	UABT

Dédicace :

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail et avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail

- ✓ A mes chers parents
- ✓ A mes frères
- ✓ A ma famille
- ✓ A mes professeurs
- ✓ A mes amis
- ✓ Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.
- ✓ A madame MERAD BOUSSALAH Nouria pour m'avoir encadrée. Merci

Remerciements

Je présent travail a été réalisé au sein de laboratoire COSNA (Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses) dans l'équipe de modélisation moléculaire de la faculté des sciences, Département de chimie, de l'université de Tlemcen sous la direction de Monsieur le professeur S .GHALEM

Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude envers Dr MERAD BOUSSALAH Nouria pour m'avoir encadrée. Merci énormément pour la patience illimitée et considérable envers ma personne et pour son suivie rigoureux et ses précieux conseils.

Toute ma reconnaissance pour Mr. Noureddine MISSOUM pour son aide et mes remerciements les plus vifs pour le laboratoire de synthèse en chimie organique.

Un merci bien particulier adressé également à mes professeurs, toute l'équipe de modélisation moléculaire et à tous ceux qui ont contribué à ce modeste travail.

Merci à tous

Sommaire

Introduction générale.....
CHAPITRE 1 : LES ENZYMES ET LES DERIVES PYRAZOLIQUES

1- ENZYMES :.....	
1-1. Introduction	
1-2. Inhibition enzymatique	
1-3.L'Acétylcholinestérase.....	
2- LES DERIVES PYRAZOLIQUES.....	
2-1. Introduction	
2-2. Activités biologiques de composés pyrazoliques.....	
2-3. Les dérivés pyrazoliques en tant qu'inhibiteurs d'enzymes.....	

CHAPITRE 2 : LES METHODES DE LA MODELISATION MOLECULAIRE

Introduction	
1- METHODES QUANTIQUES.....	
1-1 méthode ab-initio (Hartree-fock-rootmann).....	
1-2 méthodes semi empiriques	
2- MECANIQUE MOLECULAIRE.....	
2-1. Champ de force en mécanique moléculaire.....	
2-2. Différents champ de force en mécanique moléculaire.....	
3- DYNAMIQUE MOLECULAIRE.....	
3-1. Principe.....	
3-2. Un calcul de dynamique moléculaire.....	
4- DOCKING MOLECULAIRE (ARRIMAGE).....	

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....

Introduction.....	
1. La démarche à suivre.....	
2. Méthodologie des calculs	
2.1. Préparation de l'enzyme	
2.2. Préparation des inhibiteurs.....	
2.3. Etude de docking moléculaire.....	
3. Résultats et discussions.....	
4. Conclusion.....	
Références.....	

Toute vie dépend du bon fonctionnement d'une grande variété de catalyseurs organiques ou enzymes. Les structures biologiques correspondent à des fonctions bien définies et la vie d'un organisme dépend du rôle des structures biologiques.

La maladie d'Alzheimer est à l'origine d'un important déficit cholinergique, neurotransmetteur particulièrement impliqué dans la mémorisation et dans l'attention.

Un des moyens d'augmenter l'activité du système cholinergique est d'éviter la dégradation de l'acétylcholine en bloquant la cholinestérase.

Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase (tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine), de la famille des cholinergéniques, ont pour action de ralentir l'activité des acétylcholinestérase pour maintenir un taux élevé d'acétylcholine, fortement réduit chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer.

Notre travail consiste à étudier l'inhibition de l'acétylcholinestérase par des dérivés pyrazoliques par Docking moléculaire qui est une des méthodes de la modélisation moléculaire.

Avec le développement des outils informatiques, 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 a pour objectif essentiel de prédire la conformation (position et orientation relative) la plus favorable du ligand au sein de son récepteur ⁽¹⁾ comme il peut servir à l'optimisation de molécules et au criblage de bases de données. En pharmacie, la découverte et la mise au point de nouvelles substances médicamenteuses peuvent 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 ⁽²⁾.

La plupart des programmes utilisent une approche semblable : une molécule est fixe dans l'espace tandis que la seconde est déplacée par un ensemble de translations et de rotations. Chaque configuration est alors évaluée par une fonction de score en termes de

complémentarité de surface, d'interaction électrostatique, de répulsion de van der Waals ... De manière générale, le protocole de docking peut être décomposé de la façon suivante :

- représentation du système
- procédure de recherche (searching)
- criblage par fonction de score (scoring)

Le but principal de ce travail est une initiation au docking moléculaire qui est une des méthodes de la mécanique moléculaire qui permette de simuler les interactions entre protéines et ligands. Pour étudier ces interactions, nous avons choisi un programme de docking moléculaire qui est Autodock vina implanté dans UCSF Chimera (Version 2013). Ce programme a été développé pour aider à la mise au point de molécules à activité thérapeutique. Il s'agit de calculer l'interaction entre des composés de petit poids moléculaire (inhibiteurs) et des récepteurs protéiques de types enzymatiques.

Le premier chapitre de ce travail chapitre est réservé à un rappel sur les enzymes et particulièrement l'acétylcholinestérase ainsi qu'un aperçu sur l'intérêt biologique des composés pyrazoliques.

Dans le deuxième chapitre de ce travail, nous avons donné un aperçu sur les différentes méthodes de la modélisation moléculaire (méthodes quantiques et méthodes non-quantiques). Dans le troisième chapitre, nous avons présenté les résultats de l'étude de l'interaction entre l'acétylcholinestérase et des dérivés pyrazoliques par le programme Autodock vina implanté dans UCSF Chimera. Pour cette étude, on s'intéresse à déterminer le mode d'interaction du complexe pour la fixation des différents inhibiteurs de cette 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 ⁽³⁻⁵⁾.

ENZYMES ET DERIVES PYRAZOLIQUES

LES ENZYMES

I.1.1. Introduction

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses. Ces réactions s'effectuent dans des conditions « douces » ou, normalement, elles seraient très lentes.

Si elles ont lieu, c'est parce qu'elles sont catalysées par des macromolécules biologiques : les enzymes.

Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseur cellulaire. Elles sont constituées des milliers d'acides aminés liés en une chaîne linéaire. Ces acides aminés diffèrent dans leur nature chimique, sont liés entre eux par des liens covalents appelés liens peptidiques. Un catalyseur est une substance qui modifie la vitesse d'une réaction chimique mais qui se retrouve inchangée à la fin de la réaction. En termes plus techniques, Un catalyseur est une substance qui abaisse l'énergie d'activation d'une réaction chimique.

Une enzyme est une protéine fabriquée par l'organisme qui permet l'activation ou l'accélération de réactions chimiques. Il en existerait environ 15.000 protéines chez l'homme. Ces enzymes jouent un rôle dans toutes les fonctions, comme la digestion avec des enzymes intervenant dès le stade buccal comme les amylases contenues dans le suc sécrété par les glandes salivaires puis les différentes enzymes digestives qui décomposent les grosses molécules en substrats plus petits qui pourront être incorporés par l'organisme. D'autres enzymes ont des rôles dans la purification du sang, l'élimination de substances toxiques... En cas d'absence ou de déficit en une enzyme de l'organisme, la fonction exercée est défaillante : on parle d'enzymopathie.

L'enzyme, lors de son interaction avec le substrat, modifie la réactivité moléculaire en formant un complexe enzyme-substrat, elle forme un état intermédiaire. Il existe en effet au sein de ces structures en 3D, que sont les enzymes, des sites de fixation où le substrat se fixe et des sites de réaction (ou catalyse) où la réaction est facilitée. Ces sites sont constitués de radicaux d'acides aminés formant la chaîne protéique de l'enzyme. Ces acides aminés rapprochés grâce au repliement dans l'espace de la chaîne protéique forment le site actif. Donc, l'enzyme facilite la réaction du substrat en diminuant l'énergie d'activation, ceci en passant par un ou plusieurs états intermédiaires.

Selon les réactions catalysées, les enzymes peuvent être classées en six grandes catégories : Oxydoréductases, Transférases, Hydrolases, Lyases, Isomérases et Ligases. Et on peut distinguer trois catégories d'enzymes : Les enzymes métaboliques, les enzymes digestives et les enzymes alimentaires.

I.1.2. Le Site Actif

L'activité des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif qui a la forme d'une cavité ou d'un sillon.

Le site actif d'une enzyme est la région privilégiée de l'enzyme qui interagit avec le substrat. Les acides aminés du site actif peuvent être divisés en deux groupes :

- Ceux qui interviennent à la reconnaissance spatiale du substrat, en formant avec lui des liaisons non-covalentes (site de fixation).
- Ceux qui participent à la transformation chimique du substrat en produit (site catalytique).

Le placement des fragments (atomes) dans le site actif est basé sur le principe de complémentarité stérique et électronique entre ligand et récepteur.

Les enzymes jouent le rôle centrale dans la régulation des processus biologiques, elles ont souvent besoin de cofacteurs qui sont indispensables pour le déroulement de la réaction.

I.1.3. Les Cofacteurs

Le cofacteur est un corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique pour transporter ou compléter un substrat, accepter un produit et comme participant à la structure de l'enzyme. Les cofacteurs peuvent être organique (flavine, hème) ou inorganiques (ion métallique, fer, soufre)

Certaines cofacteurs sont des molécules plus complexes synthétisées par les cellules nous les appellerons coenzymes.

I.1.4. Les Coenzymes

Les coenzymes sont des molécules organiques non protéiques bien plus petites que les monomères protéiques, ils comportent généralement dans leur structure des hétérocycles.

Parmi lesquels on distingue :

- Les groupements prosthétiques : liés par covalence à l'apoenzyme (enzyme inactive sans cofacteur).

- Les Co-substrats ou coenzymes libres car facilement liés à la protéine, et fixés réversiblement au site actif par des liaisons faibles.

Les cofacteurs sont des molécules que l'organisme fabrique à partir des vitamines que nous obtenons principalement par l'alimentation.

I.1.5. Les Effecteurs

Les ligands qui peuvent modifier la vitesse de la réaction sans être des cofacteurs indispensables, nous les appellerons effecteurs. Les effecteurs peuvent être des molécules ou des atomes quelconques, minéraux ou organiques. Ceux des effecteurs qui accélèrent la réaction sont les activateurs et ceux qui la ralentissent sont les inhibiteurs.

La modulation (inhibition ou activation) de l'activité enzymatique est un mode de régulation primordial de soies métaboliques dans la cellule, d'autant que les inhibiteurs naturels sont multiples : antibiotiques, toxines, drogues, poisons....

I.2. Inhibition Enzymatique

Un inhibiteur enzymatique est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. Il peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place et rendre l'enzyme moins active.

L'inhibiteur des enzymes joue un rôle important dans le contrôle des mécanismes biologiques des voies métaboliques. La liaison d'un inhibiteur peut empêcher un substrat de se fixer au site actif de l'enzyme.

L'inhibition de l'enzyme peut être classée en deux catégories principales : inhibition réversible et inhibition irréversible, selon que l'élimination de l'inhibiteur restaure ou non l'activité initiale de l'enzyme.

I.2.1. Inhibition Enzymatique Réversible

L'activité enzymatique peut être retrouvée en enlevant l'inhibiteur

Les inhibiteurs réversibles sont classés en :

- Inhibiteur compétitif,
- Inhibiteur non compétitif,
- Inhibiteur incompétitif.

- **Inhibiteur compétitif** : (fixation exclusive) L'inhibiteur ressemble au substrat et entre en compétition avec lui pour s'introduire dans le site actif. ⁽⁶⁾
 - Type d'inhibition rencontrée le plus fréquemment;
 - L'inhibiteur est très similaire au Substrat (i.e. *analogue structurel*)
 - L'inhibiteur et le substrat sont en compétition pour le même site de liaison sur l'enzyme: le site actif (figure 1)

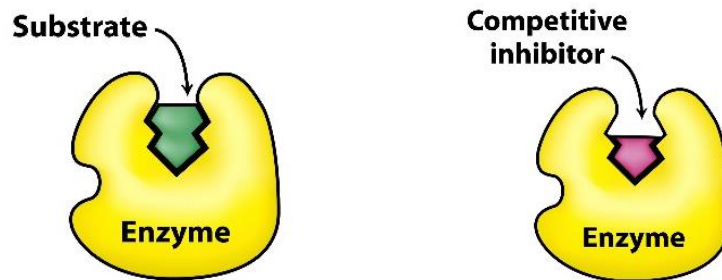


Figure 1

- **Inhibiteur non-compétitive** : (fixation non exclusive) peut se fixer sur l'enzyme [E] et sur le complexe Enzyme-Substrat [ES] (mais n'est pas en compétition avec le substrat [S] pour sa fixation à l'enzyme) il ne peut être déplacé par augmentation de la concentration du substrat [S]. ⁽⁷⁾
 - L'inhibiteur (I) et le substrat (S) lient des sites différents sur l'enzyme (E);
 - La liaison de l'inhibiteur (I) sur l'enzyme E n'affecte pas la liaison de S sur E (et vice versa); (figure 2)

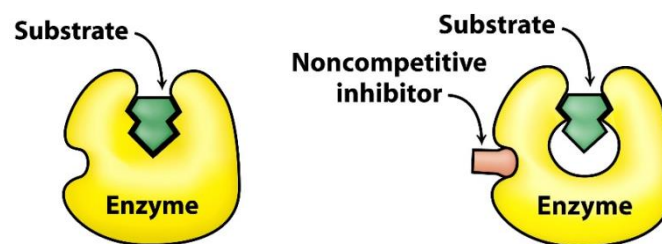


Figure 2

- **Inhibiteur incompétitif** : Un inhibiteur incompétitif ne se fixe que sur le complexe ES (le site de fixation de I est induit par celle de S). ⁽⁸⁾
 - I peut seulement lier le complexe Enzyme-substrat (ES), *pas* l'enzyme libre (figure 3).

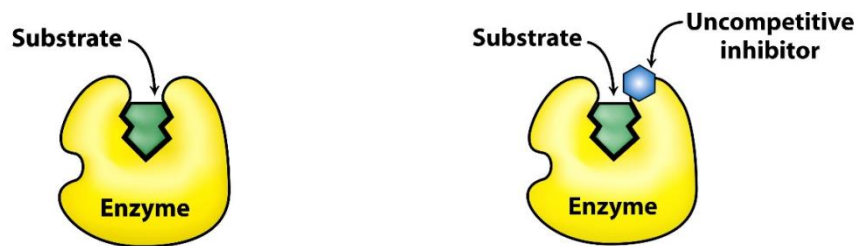


Figure 3

I.2.2. Inhibition Enzymatique Irréversible

Les inhibiteurs irréversibles lient l'enzyme de manière covalente et l'inactivent de façon permanente.

I.3. L'Acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme naturellement présente chez l'homme qui entraîne la destruction de l'acétylcholine, évitant ainsi une action excessive de celle-ci (régulation).

En biochimie une **cholinestérase** est une enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse d'un ester de la choline (acétylcholine, butyrylcholine) en choline et en acide acétique. En physiologie, cette réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation.

L'importance de l'acétylcholinestérase (AChE) dans la transmission de l'influx nerveux et les conséquences de son inactivation, principalement avec certains gaz neurotoxiques, les pesticides et les métaux lourds sont bien connus ⁽⁹⁾. Ces dernières années, les biocapteurs basés sur le principe de l'inhibition de l'AChE ont été largement rapportés pour une gamme d'inhibiteurs, tels que des pesticides, des médicaments et des neurotoxines. ^(10,11)

Le terme de cholinestérase a été proposé en 1932 pour décrire une enzyme capable d'hydrolyser l'acétylcholine⁽¹²⁾. Quelques années plus tard, des commissions internationales de nomenclature biochimique ont entériné l'existence de deux formes distinctes de ChE qui diffèrent par leur origine, leur structure, leur spécificité d'action et leur fonction physiologique.

I. 3.1. Rôle Physiologique et Structure de l'acétylcholinestérase

L'AChE est exprimée dans de nombreux tissus, mais c'est à la jonction neuromusculaire ou dans les synapses reliant certains neurones qu'elle remplit son rôle le mieux connu.

Une synapse cholinergique fonctionne schématiquement en quatre temps. Le neurotransmetteur, l'Acétylcholine (ACh), est d'abord libéré, diffuse à travers la fente synaptique, se lie réversiblement au récepteur nicotinique et est finalement hydrolysé (Figure 4). C'est lors de cette dernière étape qu'intervient l'AChE. Elle remplit sa fonction cholinergique en assurant la terminaison de la transmission de l'influx nerveux au sein des jonctions neuromusculaires et des synapses cholinergiques⁽¹²⁾. Cette action est réalisée par l'hydrolyse de son substrat, l'acétylcholine (ACh), en acétate et choline (Figure 4)⁽¹³⁾, elle libère la fente synaptique en vue d'une éventuelle nouvelle transmission, permettant ainsi le passage des informations^(14,15).

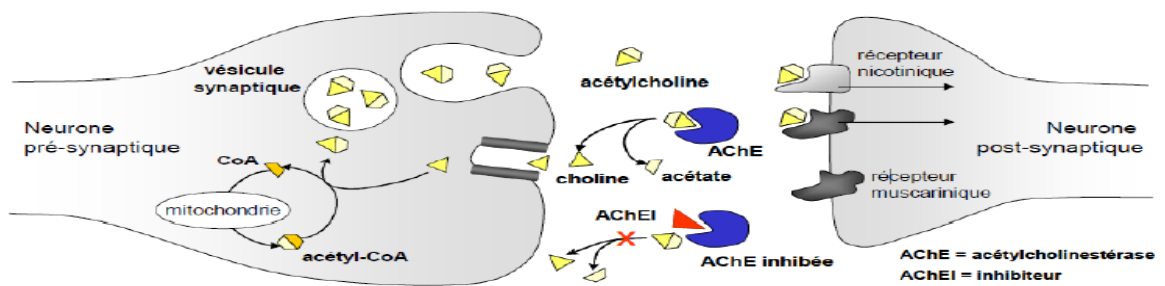


Figure 4 : Schéma d'une synapse et mécanisme de neurotransmission cholinergique (14,15).

L'AChE est parmi les enzymes les plus rapides de la nature, avec un turn-over de 1000 à 20000 molécules par secondes selon l'espèce considérée.

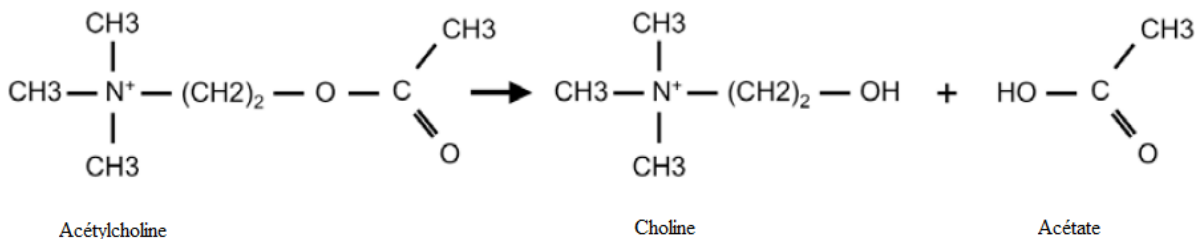


Figure 5 : mécanisme catalytique de l'acétylcholinestérase

Elle appartient à la famille des hydrolases et elle est exprimée au niveau du système nerveux central et des muscles, son rôle comme décrit ci-dessus est d'hydrolyser le neurotransmetteur acétylcholine afin de terminer la transmission de l'influx nerveux et restaurer ainsi l'excitabilité des synapses cholinergiques.

L'acétylcholinestérase est une protéine complexe qui possède un centre actif, une multitude de sites périphériques et de nombreux domaines hydrophobes (Figure 3).

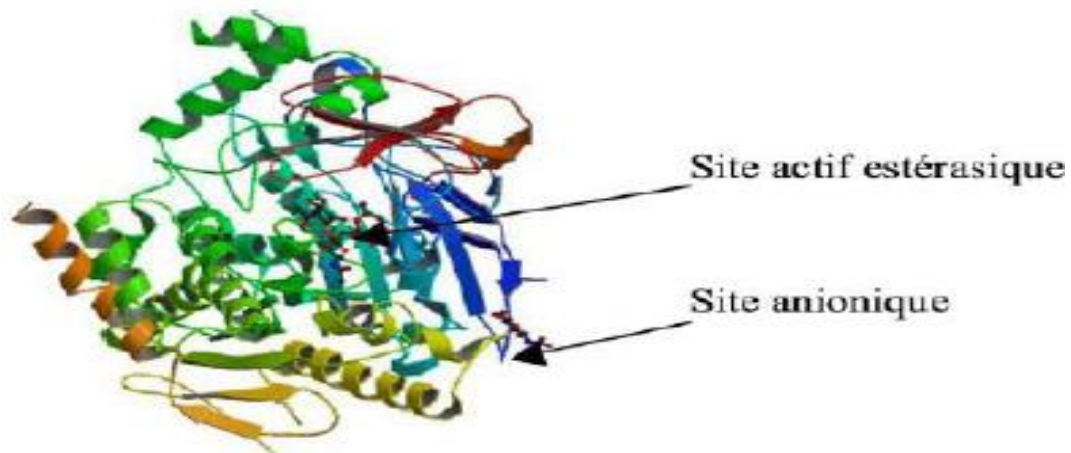


Figure 6: Représentation schématique de l'Acétylcholinestérase ⁽¹⁶⁾

La machinerie catalytique de l'AChE se trouve au fond d'une gorge profonde (environ 20 Å) et étroite (environ 5 Å) et comprend le groupement hydroxyle de la sérine qui réagit avec l'ACh, on distingue deux sous-sites : le site anionique et le site estérasique.

Le site estérasique correspond au locus au niveau duquel la portion acétyl de la molécule d'ACh se fixe et forme l'intermédiaire tétraédrique. L'ACh est alors clivée, libérant ainsi la choline et l'intermédiaire enzyme acylée. Ensuite a lieu la déacétylation, qui régénère l'enzyme libre en libérant l'acétate ⁽¹⁷⁾.

I.3.2. Inhibition de l'Acétylcholinestérase

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont une classe de substances qui empêchent la rupture de l'acétylcholine. Ils agissent en inhibant l'enzyme acétylcholinestérase qui est présente dans les régions autour des neurones pour contrôler les niveaux d'acétylcholine dans le cerveau.

L'acétylcholine est un neurotransmetteur du cerveau impliqué dans la transmission des messages vers les centres de la mémoire, du raisonnement et d'autres processus de la pensée. Elle est un des composants qui intervient dans la dégradation de l'acétylcholine après livraison du message.

Les faibles niveaux d'acétylcholine sont associés à des troubles de la mémoire, comme la maladie d'Alzheimer ainsi que d'autres formes de troubles mentaux.

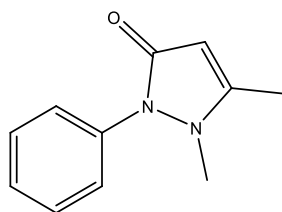
La maladie d'Alzheimer est à l'origine d'un important déficit cholinergique, neurotransmetteur particulièrement impliqué dans la mémorisation et dans l'attention.

Un des moyens d'augmenter l'activité du système cholinergique est d'éviter la dégradation de l'acétylcholine en bloquant la cholinestérase.

I. LES DERIVES PYRAZOLIQUES

II.1. Introduction

Les pyrazoles ont une illustre histoire; en 1883, un chimiste allemand Ludwig Knorr a été le premier à découvrir l'activité antipyrétique du dérivé du pyrazole chez l'homme, il a nommé ce composé l'antipyrine. Quand il a tenté de synthétiser des dérivés de quinoléine ayant une activité antipyrétique, antipyrine, il a obtenu accidentellement le (2,3-diméthyl-1-phényl-3-pyrazoline-5-one)(fig.7) qui a une activité analgésique, antipyrétique et antirhumatismale ce qui a stimulé l'intérêt du pyrazole en chimie ⁽¹⁸⁾.



2,3-diméthyl-1-phényl-3-pyrazoline-5-one

Figure 7

Le premier dérivé pyrazolique naturel a été isolé par des chercheurs japonais Kosuge et Okeda en 1954, jusqu'à leur découverte, on pensait que les pyrazoles ne pouvaient être obtenus naturellement. Ils ont isolé 3-éthyl-1*H*-pyrazole (a) à partir de *Houttuynia cordata*, une plante des «pipéracées» famille d'Asie tropicale; laquelle a montré une activité

antimicrobienne. Ils ont également isolé la 1-pyrazolyle-alanine (b), un acide aminé, à partir de graines de pastèque (*Citrullus vulgaris*) (fig.8) ⁽¹⁹⁾



Figure 8

Les dérivés pyrazoliques jouent un rôle important dans la chimie médicinale. En effet, les antinéoplasiques, anti-inflammatoires, antipsychotiques, antimicrobiens, antiviraux, analgésiques et les agents antifongiques portant le fragment pyrazole ont été largement utilisés en tant que médicaments thérapeutiques (fig.9).

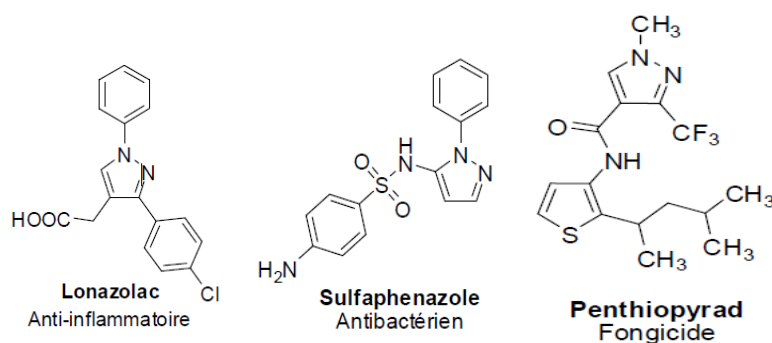


Figure 9

Aussi, beaucoup de pyrazoles sont impliqués dans les processus d'une importance vitale, des antagonistes de récepteurs, des inhibiteurs de divers types de kinases, etc.

Par exemple, la phénylbutazone est utilisée pour le traitement des formes assez complexes de l'arthrite, et la métamizole est bien connue comme analgésique (fig.10) ⁽²⁰⁾

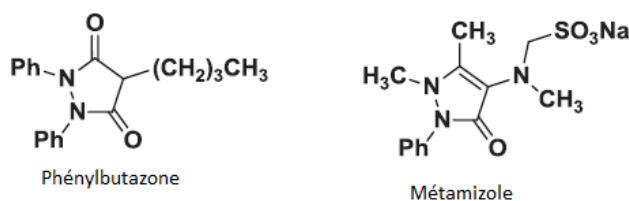


Figure 10

Le large éventail d'activités biologiques associées au pyrazole a fait de lui un synthon important dans le domaine de la chimie organique. De nombreuses méthodes ont été développées pour la préparation de pyrazoles substitués.

II-2. Activités Biologiques de Quelques Composés Pyrazoliques

Maggio et al. ont synthétisé et étudié l'activité anti-inflammatoire d'une série de composé à base de pyrazole (fig.11). Ces composés ont montré une bonne activité anti-inflammatoire (21)

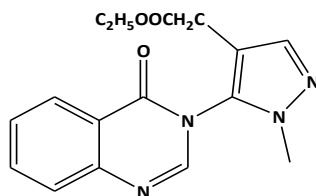
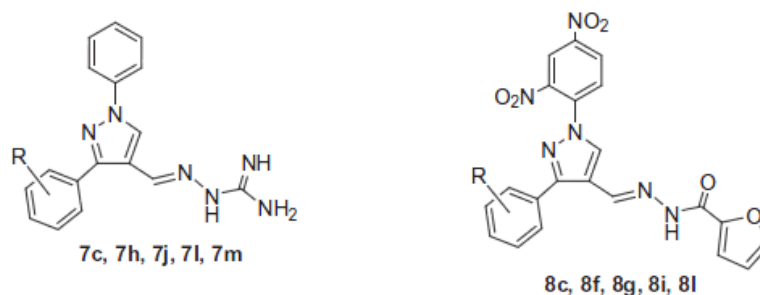


Figure 11

Trois séries des dérivés du 1,3-diaryl pyrazole comportant une fraction de l'aminoguanidine ou du furan-2-carbohydrazides ont été synthétisés et évalués pour leur activités anti-inflammatoire et antibactérienne (fig.12).

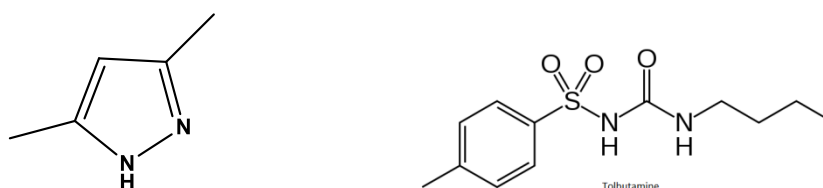
Ces composés présentent un large spectre d'activité inhibitrice. En outre, les composés 7l ont montré la plus grande activité anti-inflammatoire, plus importante que celle des médicaments de référence comme l'ibuprofène et l'indométacine (22).



R= a: 4-OCH₃ b: 3-OCH₃ c: 4-CH₃ d: 3-CH₃ e: 2,4-(CH₃)₂ f: 2-Br g: 3-Br h: 4-Br i: 2-F j: 4-F k: 2-Cl l: 3-Cl m: 4-Cl n: 2,4-(Cl)₂ o: H p: 2-NO₂

Figure 13

En 1965, Gerritsen et Dulin ont découvert que le 3,5-diméthylpyrazole, comme un agent Hypoglycémique administré par voie orale, était cinquante-quatre fois plus efficace que le Tolbutamide en injectable sur les rats (23)



II.3. Les dérivés pyrazoliques en tant qu'Inhibiteurs d'Enzymes :

Les dérivés pyrazoliques ont joué un rôle commercial dans la chimie des hétérocycles. Ils ont été utilisés comme des synthons dans le domaine de la chimie organique et la conception des médicaments.

La série de composés de 1-acétyla-3,5-diphényle-4,5-di hydro-(1H)-pyrazole (A) ont été étudiés pour leurs capacités à inhiber sélectivement les mono amines oxydases (fig.15) (24).

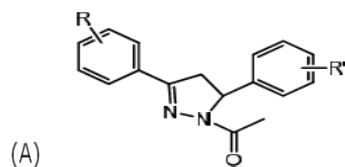


Figure 15

Les monoamines oxydases (MAO) sont un groupe des oxydoréductases, et ses inhibiteurs sont des antidépresseurs utilisés dans la maladie de Parkinson.

Les monoamines sont des neurotransmetteurs dérivés d'acides aminés comportant un groupement éthylamine, leur localisation est principalement dans le système nerveux central.

Bouabdellah I.a synthétisé et caractérisé des tripodes à jonctions azote-carbone-azote (a) et azote-carbone-carbone, monocentriques (b) et bicentriques symétriques (c et c') et dissymétriques (d) en utilisant les dérivés pyrazoliques (fig.16) (25).

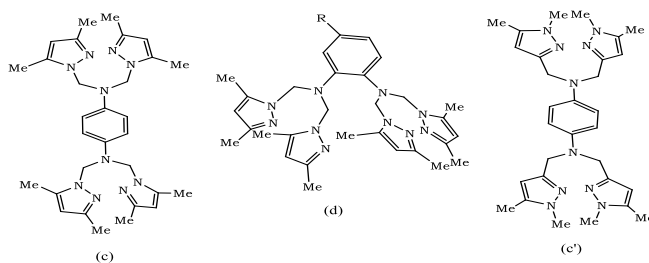
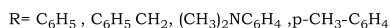
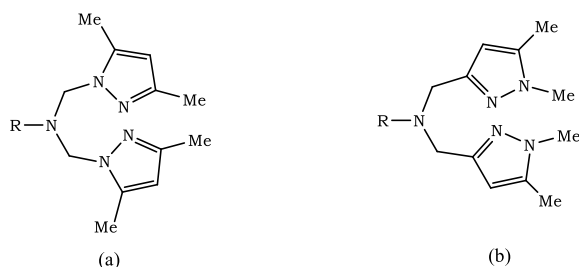


Figure 16

La plupart des composés synthétisés ont montré une forte inhibition de plusieurs souches de bactérie à Gram positif et une faible inhibition des souches de bactérie à Gram-négative.

Bekhit et Abdel-Aziem ont préparé des séries de dérivés du 1H-pyrazole et des composés réputés pour leurs activités analgésiques et anti inflammatoire. Certains de ces composés ont montré une activité antiinflammatoire sans ou avec un minimum d'effet ulcérogénique en comparant avec des médicaments standard comme l'indométacine qui est un inhibiteur sélective envers la COX-2 (26).

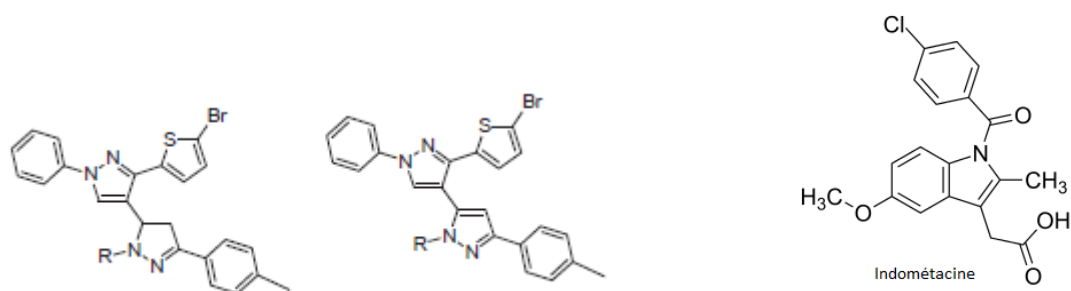


Figure 17

Tariq harit et all. (27) ont mis en évidence des ligands tridentés à base de pyrazole (schéma x). Ces composés, avec le produit de base qui est le 1- hydroxyméthyl-3,5 diméthyle pyrazole (c), ont été testés comme inhibiteurs contre une variété d'enzymes hyperactives qui est l'uréase, l'acétylcholinestérase, l' α -chymotrypsine, la buturylcholinestérase, la β -glucuronidase et la phosphodiétrérase.

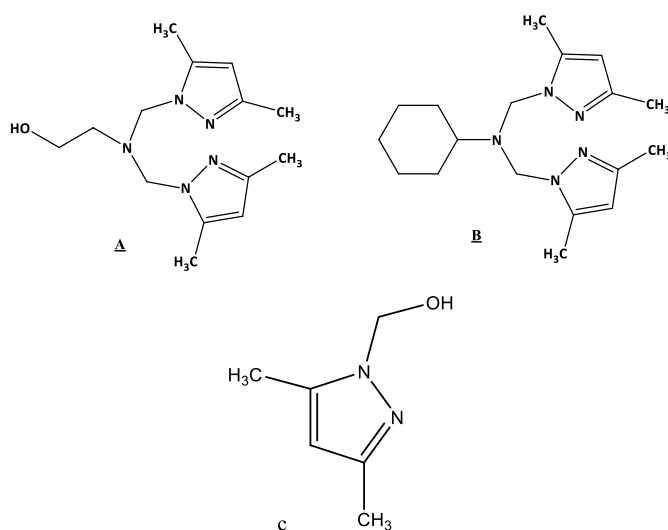


Figure 18

Cette série de tripode montre une activité significative contre l'uréase et la butyrylcholinestérase. Elle est beaucoup plus importante que celle contre le β -glucuronide.. Cependant le composé **B** s'avère être un faible inhibiteur de la β -glucuronide. Ceci est éventuellement dû à la nature de la chaîne latérale. Dans ce cas, le cyclohexyle peut avoir des interactions hydrophobes avec le site actif de l'enzyme.

Les résultats de ces tests montrent que dans ce cas, l'activité inhibitrice de ces tripodes dépend de la nature de la jonction entre les deux pyrazoles.

Les résultats de cette étude nous ont encouragés à comparer l'inhibition de ces trois composés contre l'acétylcholinestérase par docking moléculaire.

I. INTRODUCTION

On définit la modélisation moléculaire comme une application des méthodes théoriques et des méthodes de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simples et utilisables rapidement ou au contraire, elles peuvent être extrêmement complexes et demandent des centaines d'heures de calcul sur un ordinateur même sur un superordinateur.

Les méthodes de la modélisation moléculaire comprennent : les méthodes quantiques, la mécanique moléculaire et la dynamique moléculaire.

La mécanique quantique est le prolongement de la théorie des quanta, issue des travaux de Planck, de leur interprétation par Einstein et de leur application à la théorie atomique par Bohr et Sommerfeld. Elle explique la quantification de certaines grandeurs (énergie, moment cinétique).

L'objectif de la mécanique quantique est principalement de déterminer l'énergie et la distribution électronique ⁽²⁸⁾.

La chimie quantique définit la structure moléculaire comme un noyau autour duquel gravitent des électrons, qui sont décrits par leur probabilité de présence en un point et représentés par des orbitales ⁽²⁸⁾. Les équations de la chimie quantique sont basées sur la résolution de l'équation de SCHRODINGER qui s'écrit pour les états stationnaires ⁽²⁹⁾.

$$H\Psi = E\Psi$$

Ou :

H : Hamiltonien total d'une molécule comportant N noyaux et n électrons.

Ψ : Fonction d'onde de la molécule.

E : Energie totale d'une molécule.

II. METHODES QUANTIQUES

L'objectif de la mécanique quantique est principalement de déterminer l'énergie et la distribution électronique. La chimie quantique définit la structure moléculaire comme un noyau autour duquel gravitent des électrons, qui sont décrit par leur probabilité de présence en un point et représentés par des orbitales. Les équations de la chimie quantique sont basées sur la résolution de l'équation de SCHRODINGER qui s'écrit pour les états stationnaires.

II.1. Méthodes Semi Empiriques

Une méthode semi-empirique est une méthode dans laquelle une partie des calculs nécessaires aux calculs Hartree-fock est remplacé par des paramètres ajustés sur des valeurs expérimentales.

Les méthodes semi-empiriques (CNDO/2, INDO, MINDO/3, MNDO, AM1, PM 3 et SAM1) ne considérant que les électrons de la couche de valence ; les électrons des couches internes sont inclus dans le cœur nucléaire.

II.2. Méthodes *ab-initio*

Les méthodes Hartree-fock-oothann sont des méthodes non empiriques, toutes les intégrales sont rigoureuses et il n'y a pas d'approximation à faire sauf celle de Born Oppenheimer et l'approximation OM-CLOA.

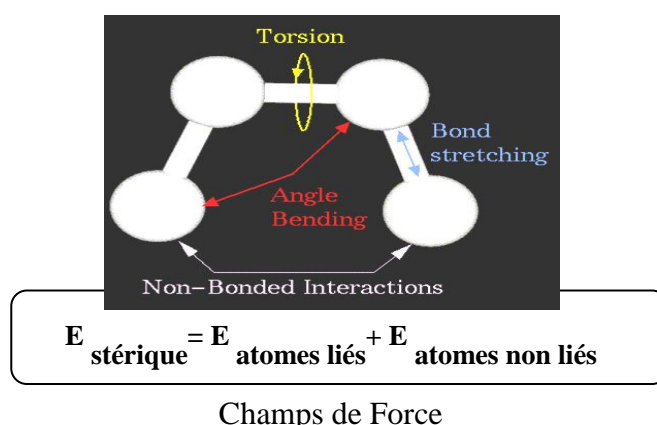
Dans les méthodes *ab-initio*, toutes les particules (noyau et électrons) sont traitées explicitement. On n'utilise aucun paramètre empirique dans le calcul de l'énergie.

III. MECANIQUE MOLECULAIRE

La mécanique moléculaire est une méthode non quantique, mais elle a un intérêt pour les grands systèmes, comme dans le cas des systèmes biologiques qu'on ne peut aborder avec les méthodes quantiques⁽³⁰⁾. La mécanique moléculaire (MM) est appelée parfois « calcul par champ de force empirique »^(31,32).

La mécanique moléculaire est basée sur l'approximation de Born-Oppenheimer selon la quelle les électrons sont beaucoup plus rapides que les noyaux et ces derniers sont donc implicitement traités.

La mécanique moléculaire ressemble aux modèles de type « **tiges et boules** ». L'idée directrice de cette méthode est d'établir, par le choix des fonctions énergétiques et des paramètres qu'elles contiennent un modèle mathématique, le « CHAMP DE FORCE » qui représente aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire ⁽³³⁾.



III.1. Champ de Force en Mécanique Moléculaire

On appelle champ de force le modèle mathématique représentant l'énergie potentielle d'une molécule en mécanique moléculaire. Les champs de force expriment réellement la moyenne les interactions électroniques entre les atomes ⁽³⁴⁾. Il désigne à la fois l'équation mathématique (fonction d'énergie potentielle) et les paramètres qui la composent ⁽³⁵⁾. 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. En outre, le paramétrage vise souvent à ce que le champ de force puisse traiter de manière réaliste une catégorie particulière de composés.

III.2. Différents Champ de Force en Mécanique Moléculaire

Différents champs de force utilisent le même type de termes énergétiques mais différents paramètres. On peut ainsi trouver des champs destinés plus spécialement à la modélisation de petites molécules organiques, de macromolécules comme les protéines.....

- **MM2 / MM3 (Allinger):** champ de force développé par Allinger et Coll. ⁽³⁶⁾ molécules organiques.
- **CHARM (BIO⁺) :** développé par Karplus et Col, pour le calcul de biomolécules.
- **AMBER (Kollman):** protéines et acides nucléiques

IV. DYNAMIQUE MOLECUALIRE

La Dynamique Moléculaire simule, à partir des lois de la mécanique classique, les trajectoires des atomes en phase cristalline, en solution ou en phase gazeuse ^(37,38). Elles donnent l'évolution d'un système dans l'espace conformationnel au cours du temps.

IV.1. Principe

Les simulations de la dynamique moléculaire consistent à calculer les positions et les vitesses d'un système d'atomes ⁽³⁹⁾.

En dynamique moléculaire classique ^(40,41), chaque atome de la molécule est considéré comme une masse ponctuelle dont le mouvement est déterminé par l'ensemble des forces exercées sur lui par les autres atomes en fonction du temps.

IV.2. Calcul de la Dynamique Moléculaire

Le calcul de la dynamique moléculaire se compose de quatre phases distinctes :

Initialisation : la dynamique moléculaire requiert un jeu de coordonnées et vitesses initiales .La géométrie de départ utilisée provient d'une structure établie expérimentalement lorsque c'est possible, sinon elle est générée à partir du champ de force utilisé.

Thermalisation : Il s'agit de chauffer le système pour l'amener à la température souhaitée. On utilise comme structure initiale la structure minimisée. Une montée en température demande en général 2 à 10 ps de simulation.

Equilibration : C'est une phase importante au cours de la quelle on stabilise la température du système, il y a alors un échange important entre l'énergie potentielle et l'énergie cinétique. C'est une phase ou on contrôle régulièrement la température que l'on

ramène dans la fenêtre souhaitée. La température de déviation se fait suivant un processus de relaxation ou la température est recalculée après chaque étape et ramenée à la température de référence.

V. DOCKING MOLECULAIRE (ARRIMAGE)

LES SIMULATIONS DE DOCKING

V.1. Principes Théoriques

Le Docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique. Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine, le terme Docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand »

Le docking moléculaire a pour but de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur ⁽⁴²⁾.

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (figure 6).

- Le Docking (la première étape) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- Le Scoring (la deuxième) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées

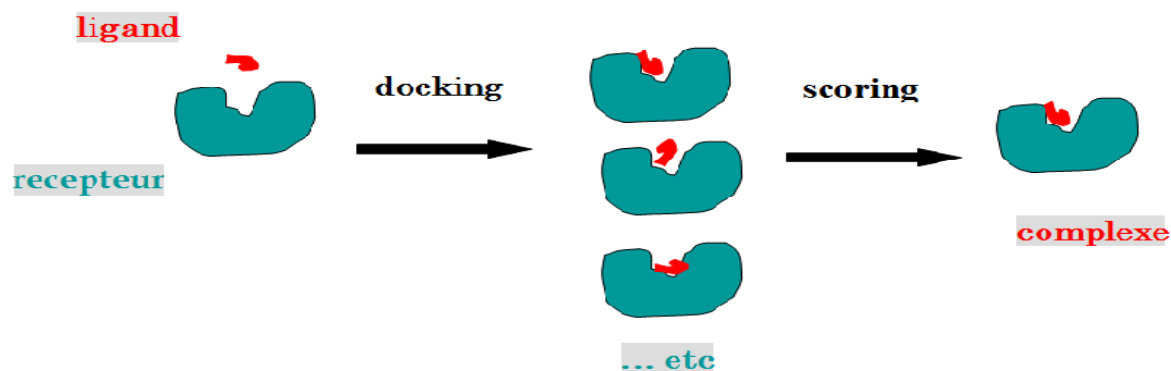


Figure 19

V.2. Algorithmes de Docking

En principe, un docking peut être fait de façon « manuelle » directement par le modélisateur, en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine à l'aide d'une interface graphique. Ensuite, la géométrie de l'ensemble est optimisée de manière à corriger les problèmes stériques et obtenir un complexe énergétiquement stable. Cette approche est appliquée quand on a une idée précise du mode d'interaction réel du ligand ⁽⁴³⁾

Néanmoins, le plus souvent, le mode d'interaction réel n'est pas connu. Dans ce cas tester manuellement toutes les conformations et orientations des ligands s'avère impossible d'un point de vue pratique, même en considérant la protéine comme un corps rigide. Pour contourner cette difficulté, les algorithmes de docking ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association « protéine-ligand » les plus favorables ⁽⁴⁴⁾

Les algorithmes de docking peuvent être séparés en deux grandes classes : ceux qui ne tiennent pas compte de la flexibilité de la protéine, en traitant celle-ci comme un corps rigide, et ceux qui sont capables de prendre en compte, partiellement la flexibilité du récepteur.

Dans les procédures de docking considérant la protéine comme un corps rigide, la flexibilité du ligand seule est prise en compte pour l'obtention de complexes. Selon la méthode utilisée pour générer les conformères du ligand et les placer dans la cavité catalytique du récepteur, les algorithmes peuvent être sous-divisés en algorithmes de simulation de la mécanique moléculaire et ceux de la dynamique moléculaire ⁽⁴⁵⁾ de forme, systématique et stochastique. Plusieurs articles de revue décrivant le principe, les points forts et les limitations de ces méthodes ⁽⁴⁶⁾. Toutefois, cette classification doit être considérée avec précaution, puisque un bon nombre d'algorithmes combinent plus d'une méthode pour la génération et l'échantillonnage de conformères du ligand. Dans la plupart des cas, l'utilisation d'algorithmes considérant la protéine comme un corps rigide mène à de bons résultats, principalement quand la protéine a une flexibilité

limitée. En effet, dans de tels cas, la structure cristallographique peut être considérée comme plus représentative de l'état de la protéine dans son environnement naturel, ce qui augmente les chances de simuler correctement la complexation des ligands ⁽⁴⁷⁾.

Certaines protéines présentent naturellement des régions de grande flexibilité, subissant des réarrangements considérables en présence d'un ligand. Dans ce cas, négliger la flexibilité de la protéine peut mettre en péril la fiabilité des résultats de docking, et rend nécessaire l'utilisation d'approches capables de tenir compte de la flexibilité du système entier ⁽⁴⁸⁾. Des méthodes indirectes ou directes, où la flexibilité de la protéine est partiellement ou totalement prise en compte, sont décrites dans la littérature. Néanmoins, ces méthodes ne sont pas souvent utilisées car le gain en précision par rapport aux algorithmes traditionnels est généralement trop petit par rapport à l'augmentation du temps de simulation ⁽⁴⁹⁾

V.3. Fonctions de Score

La procédure de docking permet de générer une liste de complexes représentant les modes d'association favorables entre le ligand et le récepteur macromoléculaire. L'étape suivante consiste à évaluer ces complexes, afin de trouver celui ou ceux les plus susceptibles de reproduire au mieux le mode d'association réel. L'association entre protéines et ligands est gouvernée par plusieurs paramètres thermodynamiques :

- les interactions hydrophobes,
- les interactions électrostatiques,
- les liaisons hydrogène,
- les effets de solvation et les effets d'entropie.

Théoriquement, le complexe est favorable si la variation d'énergie libre globale de complexation est négative ($\Delta G_{\text{complexation}} < 0$).

En pratique, l'évaluation de l'énergie libre des complexes est une tâche souvent coûteuse d'un point de vue informatique, ce qui limite son utilisation en routine ⁽⁵⁰⁾. De ce fait, des méthodes approximatives ont été développées pour distinguer (évaluer et classifier) les meilleurs complexes parmi ceux générés par une procédure de docking : les fonctions de score. Selon les principes utilisés dans leur conception, les fonctions de score sont classées en : fonctions de score basées sur des champs de force, fonctions de score knowledge-based et fonctions de score empiriques. Ces fonctions de score sont construites à partir de règles fondées sur une analyse statistique des complexes protéine-ligand résolus expérimentalement.

La fonction PMF (Potential of Mean Force) fait partie de cette classe de fonction ⁽⁵¹⁾

Il s'agit d'une technique de classement de complexes qui combine les résultats individuels de plusieurs fonctions de score afin de compenser les faiblesses des uns avec les forces des autres, en augmentant ainsi la fiabilité du résultat final.

Le principe consiste à vérifier la fréquence à laquelle chaque complexe apparaît parmi les X complexes les mieux classés selon différentes fonctions de score (X = 5 ou 10 le plus souvent). D'un point de vue statistique, plus cette fréquence est élevée pour un certain complexe, plus la probabilité que ce complexe représente le réel mode d'interaction protéine-ligand est élevée, vu qu'il est reconnu comme tel par plusieurs fonctions de score distinctes ⁽⁵²⁾.

Un grand nombre de programmes (commerciaux ou non) de docking moléculaire sont disponibles. Parmi ceux-ci, nous citerons par exemple AUTODOCK , FLEXX , GOLD , DOCK , SURFLEX , MOLEGRO VIRTUAL DOCKER , UCSF CHIMERA et Schrödinger (Glide) etc. Ils diffèrent les uns des autres sur la manière de représenter le système moléculaire et la manière de déterminer le score de docking (fonction de score).

V.4. Etapes de Docking Moléculaire

Deux approches sont principalement employées pour la modélisation du système protéine-ligand.

La première étape consiste au téléchargement des structures chimiques des cibles à traiter (Enzyme dans notre cas), pour cela il est nécessaire d'aller directement à la Bank PDB (<http://www.pdb.org>) et déterminer où sont déposées les structures de ces cibles.

En suite, la PDB contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayons X), soit par RMN. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la Bank, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée.

Après le téléchargement de la cible (PDB), nous utilisons un logiciel de visualisation pour voir avec quels ligands l'enzyme est Co-cristallisé (eau, ligands, ion,...).

La deuxième étape, concerne les structures du (ou des) ligand(s) utilisé(s) lors du docking moléculaire. Il y a deux grandes bases de données de structures chimiques des ligands. La première représente ces structures par les programmes d'informatique de modélisation moléculaire, où les différentes structures sont générées par optimisation de géométrie. Ces structures sont gouvernées par les lois de la chimie quantique. Dans le deuxième cas, elles sont obtenues à partir des bases de données comme Pub Chem Project ou

autres bases de données des structures. Ces dernières ont différentes extensions comme PDB (Protein Data Bank), SDF, ...ect.

V. 5. Choix de Logiciel D'UCSF CHIMERA

Dans le domaine de docking moléculaire, plusieurs logiciels ont été utilisés pour étudier les différentes interactions existantes entre deux entités moléculaires (Enzyme-ligands). Chimera est un logiciel récemment développé et a donné de bons résultats (algorithme génétique). La fonction de score de Chimera est une fonction empirique. Ce type de fonction nous permet de choisir les composés ayant la plus grande probabilité d'interagir avec la cible, ne nécessite pas une grande puissance de calcul, ce qui permet de cribler la cible plus rapidement. Ainsi se démarque par sa capacité à mieux évaluer les ponts H ainsi que les interactions électrostatiques. La procédure d'accueil est composée de trois éléments :

- a) L'identification de site de liaison.
- b) La recherche de la meilleure pose parmi les poses possibles.
- c) La fonction de score .

V.6. Protocole Générale de Docking

Les approches utilisées actuellement sont exclusivement calculatoires et évaluées par des outils de visualisation. Ces approches peuvent être décomposées en quatre à cinq phases successives (figure 1) :

- Choix du mode de représentation des protéines (tout atome, pseudo-atome, grille, etc.),
- Exploration conformationnelle (corps-rigide position/orientation du ligand et/ou flexible position/orientation/forme du ligand),
- Minimisation de la fonction d'évaluation de l'énergie d'interaction (ou fonction de score) des conformations issues de l'exploration,
- Regroupement par ressemblances et classification par évaluation plus fine du score, accompagnée d'une étape non automatique d'évaluation visuelle des résultats lorsque le score ne permet pas de discriminer la conformation native des différentes conformations générées.
- Une étape optionnelle d'affinement des complexes sélectionnés par minimisation ou dynamique moléculaire.

- Un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de modes de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison.

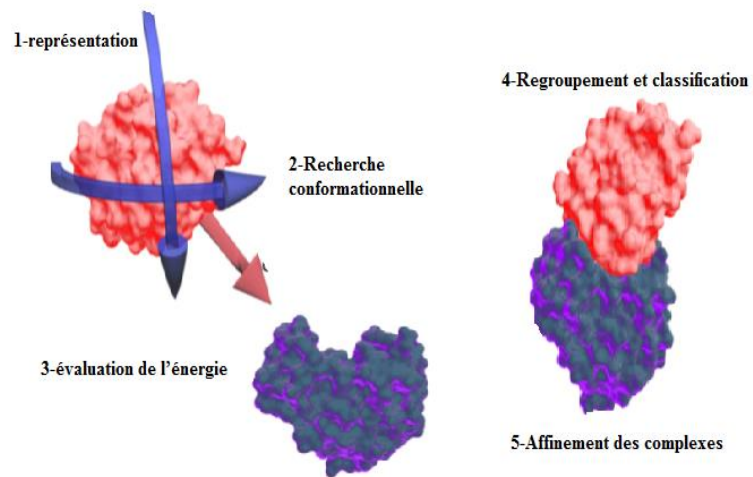


Figure 20 : Protocole général de docking ⁽⁵³⁾

RESULTATS ET DESCUSSION

I. Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement c'est définir quels sont les résidus mis en jeu:

- L'affinité entre deux molécules.
- Les distances entre les acides aminés du site actif de l'enzyme et ceux des inhibiteurs.
- L'énergie d'interaction.

De même, la découverte de nouvelles drogues activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisation moléculaire, regroupées sous le nom d' "Amarrage" ou « Docking moléculaire » ont été développées.

La flexibilité des molécules biologiques résulte de la haute dimensionnalité des systèmes, mais aussi de l'intervention d'un grand nombre d'interactions faibles (Van der Waals, liaison hydrogène, effet hydrophobe, ...). Il est connu qu'elle fait partie intégrante de la dynamique des macromolécules et de leur bon fonctionnement. La négligence de ce paramètre dans les calculs introduit des erreurs, il convient donc de déterminer la flexibilité intrinsèque d'une molécule mais aussi de pouvoir l'introduire, au moins partiellement, dans une procédure de docking.

Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée

Le docking reste une étape importante dans la compréhension des réactions biologiques et par suite la conception de médicaments. Les approches dans le cadre du docking sont basées sur le concept "clé-serrure".

Ce travail consiste à étudier les interactions entre les trois inhibiteurs et l'acétylcholinestérase par les méthodes de la modélisation moléculaire.

Dans ce chapitre nous avons englobé tous les résultats de calcul effectués dans ces trois études et la discussion que nous allons engager est basée sur les énergies d'interactions, les distances entre certains groupements de la chaîne latérale de l'enzyme et ceux d'inhibiteurs.

II. LA DEMARCHE A SUIVRE

II.1. PREPARATION DE L'ENZYME

- * Téléchargement des enzymes à partir de la base de données Bookhaven Protein Data Bank .
- * Simplification une des deux chaînes.
- * Elimination des molécules d'eau.
- * Elimination des inhibiteurs de la Co-cristallisation.

II. 2.PREPARATION DU LIGAND

Les ligands (inhibiteurs) sont dessinés en utilisant le logiciel Chemdraw8.0

L'optimisation de la géométrie du ligand a été effectuée à l'aide du champ de forces (MM+) implanté dans le logiciel Hyperchem7.5 version professionnelle pour déterminer la conformation la plus stable.

II.3. DOCKING MOLECULAIRE

Le logiciel UCSF Chimera l'interface AutoDock Vina est utilisé pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'inhibition. Nous avons analysé les énergies de la conformation des composés pyrazoliques et de l'enzyme acétylcholinestérase (5FOQ)

Les paramètres du calcul AutoDock Vina sont :

- L'état initial du ligand (position, orientation et conformation aléatoire ou précise) ;
- Dimensions de la grille à utiliser ;
- Enfin lancer le processus de Docking ;

A la fin de chaque cycle d'exploration, AutoDock Vina va enregistrer la meilleure interaction avec le ligand.

Pour permettre l'exécution des calculs ligand-récepteur à l'aide du logiciel UCSF Chimera et son champ de force AMBERff03.r1 avec l'interface AutoDock Vina, qui est un programme pour l'amarrage moléculaire et criblage virtuel, on doit suivre les étapes suivantes :

- Les noms des fichiers contenant le récepteur et ligand.
- Représenter la macromolécule acétylcholinestérase (5FOQ) avec ses hydrogènes polaires ainsi que les charges partielles de tous ses atomes,

AutoDock Vina utilise une méthode de gradient d'optimisation sophistiquée dans sa procédure d'optimisation locale.

Le gradient donne en fait l'algorithme d'optimisation d'un « sens de l'orientation » à partir d'une seule évaluation ⁽⁵⁴⁾ et un programme de simulation d'amarrage de ligand rigide sur un récepteur rigide.

On remarque que acétylcholinestérase (5FOQ) cristallise sous la forme d'un dimère. Nous avons simplifié le modèle de l'enzyme par élimination des molécules d'eau et des hétéroatomes de la Co-cristallisation, le modèle de l'enzyme retenu est un monomère. La protéine ainsi préparée est enregistrée dans un fichier au format mol2 (Figure 24).

III. METHODOLOGIE DES CALCULS

III.1. PREPARATION DE L'ENZYME

Le téléchargement de l'enzyme de l'acétylcholinestérase a été fait à partir de la base de données Bookhaven Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb)

La PDB contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayons X), soit par RMN. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la Bank, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée.

L'enzyme de l'acétylcholinestérase a deux cordes (chaines), sont similaires, avec 8336 atomes.

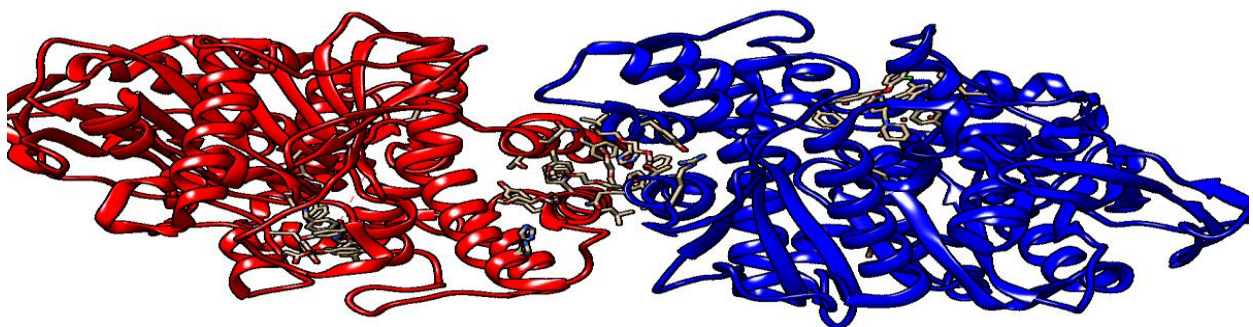


Figure 21 : L'enzyme l'acétylcholinestérase (5FOQ) non simplifiée

L'élimination des molécules d'eau et les inhibiteurs de Co-cristallisation, nous permet d'obtenir un modèle simplifié de l'enzyme.

Notre étude est basée sur la simplification d'enzyme comme une étape clé et essentielle pour accélérer et simplifier les calculs. Alors on élimine une des deux chaînes (figure 22) avec les molécules de Co-cristallisation et les molécules d'eau (figure 23).

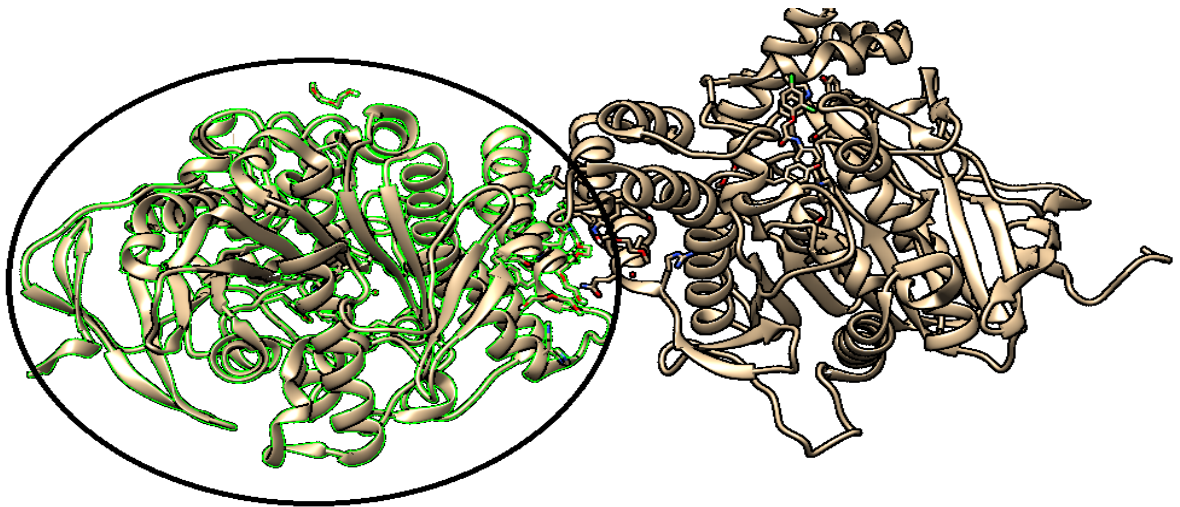


Figure 22 : les deux chaînes (A, B) de l'acétylcholinestérase

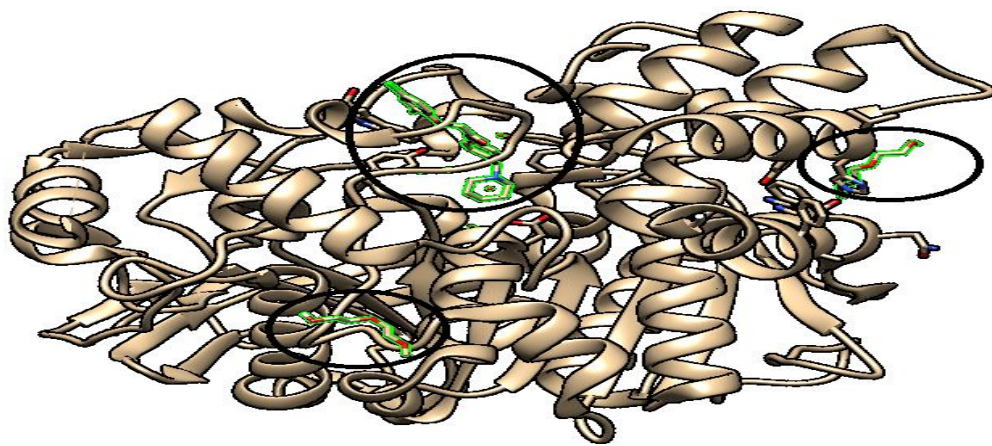


Figure 23 :L'enzyme de l'acétylcholinestérase avec les résidus

Avec l'effet réducteur de la modélisation moléculaire, le modèle des enzymes est simplifié on retient seulement un monomère pour la 5FOQ (figure 24)

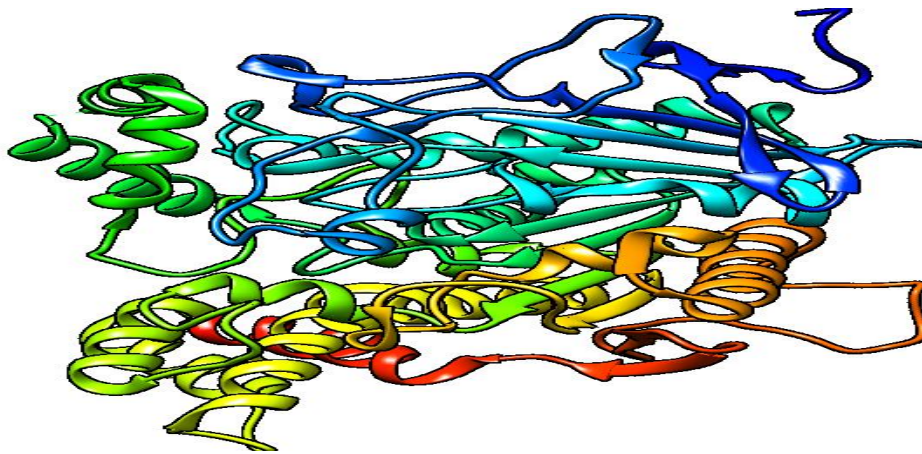


Figure 24 : L'acétylcholinestérase simplifiée

III .2. PREPARATION DES INHIBITEURS

Les inhibiteurs utilisés dans notre travail sont des dérivés pyrazoliques.

Les dérivés pyrazoliques ont joué un rôle crucial dans la chimie des hétérocycles. Ils ont été utilisés comme des synthons dans le domaine de la chimie organique et la conception des médicaments.

Les trois inhibiteurs(Figure 25) sont optimisées par Hyperchem (Mécanique Moléculaire), le champ de force utilisé est (MM+), Ils sont enregistrés au format pdb ou mol2.

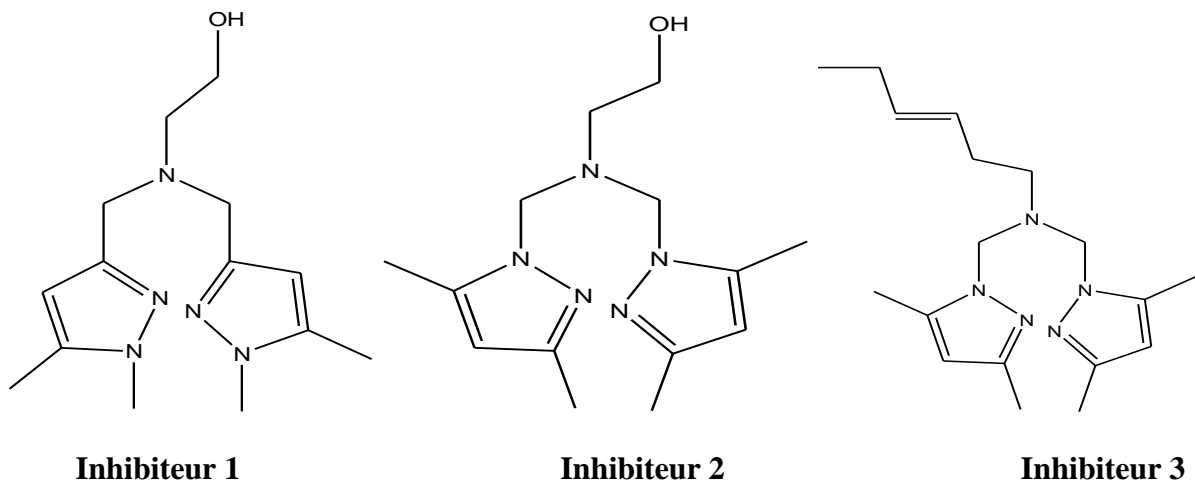


Figure 25 : Les trois inhibiteurs utilisés

L'activité inhibitrice des tripodes contre les enzymes dépend bien de la nature de la chaîne latérale que de la jonction entre les deux pyrazoles.

III .3. ETUDE DE DOCKING MOLECULAIRE

Le docking moléculaire a pour but de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur.

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (figure 26).

- La première étape (le docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- La deuxième étape (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées.

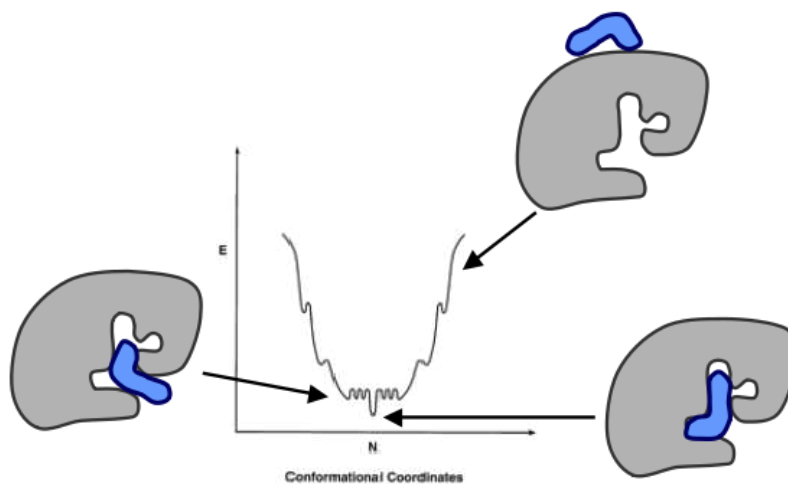


Figure 26 : Principe général d'un programme de docking

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

Pour obtenir de meilleurs sites de liaison potentiels dans l'acétylcholinestérase, un maximum de cinq cavités a été détecté en utilisant des paramètres par défaut (logiciel). Le volume de la région est donné dans le tableau 1. Le volume de la cavité 1 (289.28 \AA^3) s'est avérée être supérieur à ceux des autres cavités.

Tableau 1: volume des différentes cavités :

Cavité	Volume (Å ³)
Cavité 01	289.28
Cavité 02	171.52
Cavité 03	99.32
Cavité 04	96.25
Cavité 05	32.76

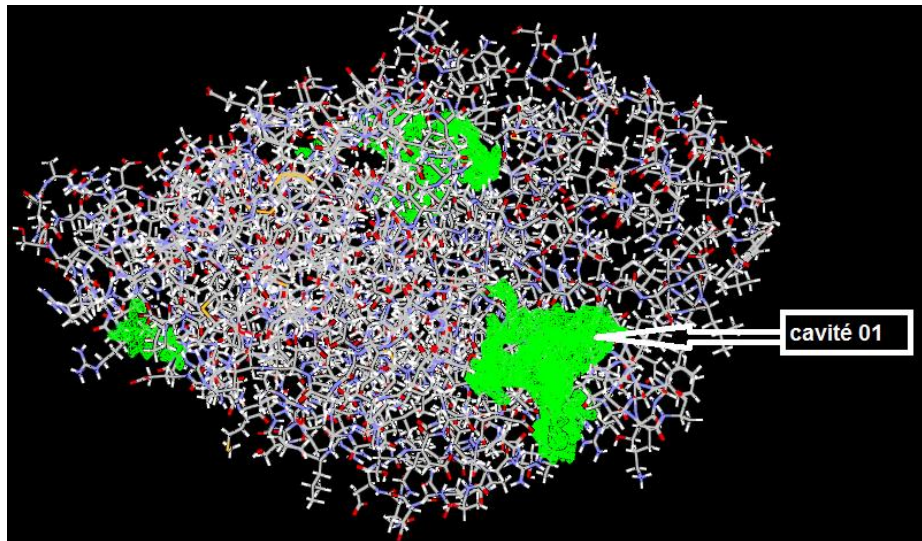


Figure 27 : les cavités enzymatiques

L'étude de l'interaction entre les acides aminés du site actif de l'enzyme l' AchE et les inhibiteurs pour former un complexe stable est réalisée à l'aide du logiciel Chimera et dans un box de paramètres connus pour préciser la surface des calculs.

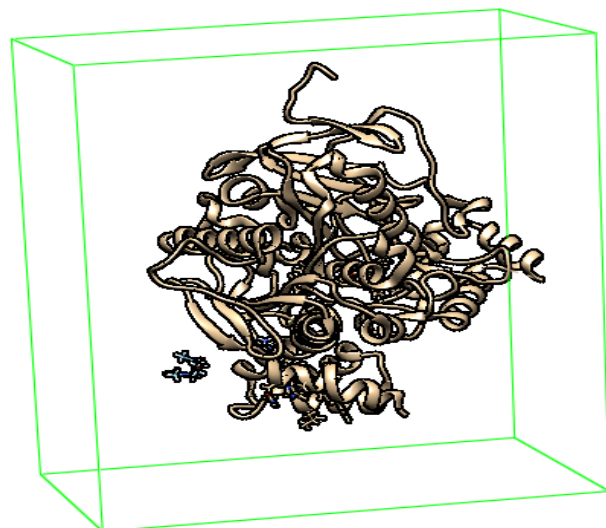
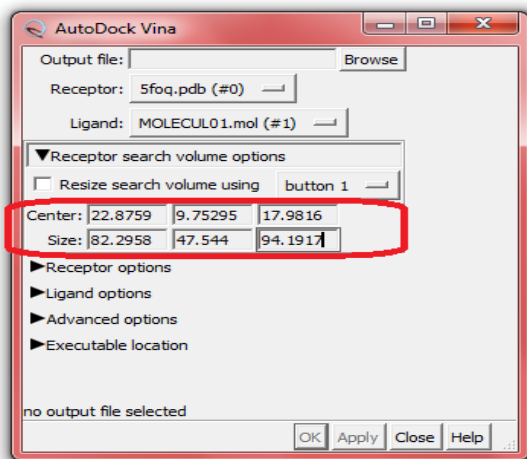


Figure 28: le box de calcul

La formation d'un complexe stable dépend de la fixation de l'inhibiteur dans le site active. La figure 29 présenté ci-dessous montre que l'inhibiteur-L1 prend la forme de la cavité enzymatique formé par les résidus du site actif, ce qui signifie qu'il y a des interactions qui stabilisent le complexe et par la suite, une meilleure fixation de ce l'inhibiteur au niveau du site actif.

Les interactions entre le site actif de la AchE et différents inhibiteurs sont calculées lors de l'amarrage moléculaire, ils sont présentés dans le tableau 2 suivant:

Tableau 2 : Résultats de docking moléculaire des trois inhibiteurs avec l'acétylcholinestérase

ligands	L1	L2	L3
Score kcal /mol	-9,0	-8,9	-7,1

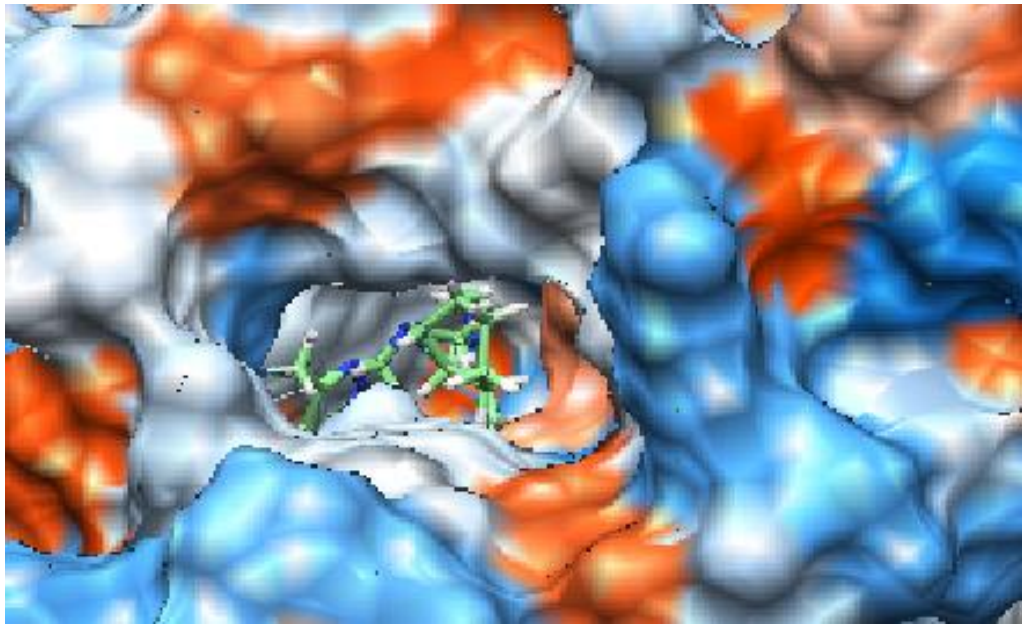


Figure 29 : complexe Inhibiteur –enzyme

Les résultats de cette étude montrent que les énergies des complexes Enzyme-Ligand 1 et Enzyme-Ligand 2 sont respectivement **-9,00 Kcal / mol** et **-8,90 Kcal / mol** alors que celle du complexe enzyme-Ligand 3 est plus basse et elle est de **-7,10 Kcal / mol**. Donc les ligands L1 et L2 sont meilleurs inhibiteurs que le ligand 3. Les ligands L1 et L2 possèdent un groupement hydroxyle à l'extrémité de la chaîne latérale du ligand, et donc peuvent former, contrairement au ligand L3, des liaisons hydrogène, liaisons fortes, avec les acides aminés du site actif de l'acétylcholinestérase.

Cavité enzymatique

Notez que nous pouvons discuter de la complémentarité en augmentant ou en diminuant la taille de l'intervalle de la poche du site actif, dans notre cas, la poche enzymatique possède une largeur de 11,48 Å et une profondeur de 18.25Å.

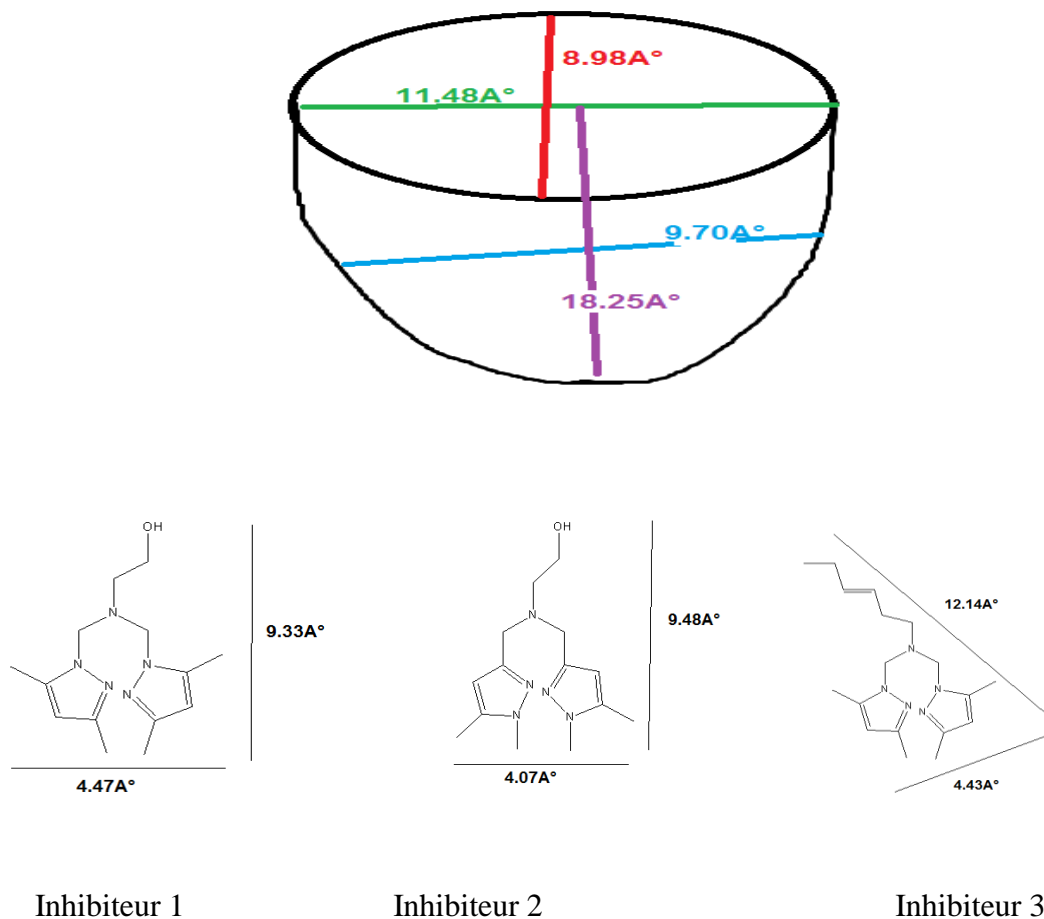


Figure 30 : les dimensions des trois inhibiteurs

V. CONCLUSION

L'étude de docking moléculaire a été réalisée avec UCSF Chimera qui est un programme extensible pour la visualisation et l'analyse des structures moléculaires. L'optimisation de la géométrie de l'acétylcholinestérase a été réalisée en utilisant le champ de force AMBERff03.r1 et par des calculs d'énergie AutoDock Vina implantées dans le logiciel UCSF Chimera (www.cgl.ucsf.edu/chimera) AutoDock Vina, un programme pour l'amarrage moléculaire et criblage virtuel, permet l'exécution des calculs ligand-récepteur. AutoDock Vina utilise une méthode de gradient d'optimisation sophistiquée dans sa procédure d'optimisation locale. Le gradient donne en fait l'algorithme d'optimisation d'un "sens de l'orientation" à partir d'une seule évaluation et un programme de simulation d'amarrage de ligand flexible sur un récepteur rigide.

Les résultats de cette étude montrent que les ligands possédant un groupement hydroxyle (L1 et L2) forment des complexes « enzyme-ligand » plus stables que le ligand 3 et par conséquent sont de meilleurs inhibiteurs.

Conclusion générale :

L'acétylcholinestérase est une enzyme naturellement présente chez l'homme qui entraîne la destruction de l'acétylcholine. L'acétylcholine est un neurotransmetteur du cerveau impliqué dans la transmission des messages vers les centres de la mémoire, du raisonnement et d'autres processus de la pensée. Les faibles niveaux d'acétylcholine sont associés à des troubles de la mémoire, comme la maladie d'Alzheimer ainsi que d'autres formes de troubles mentaux.

Les inhibiteurs de la cholinestérase (IAC) sont des médicaments pris **quotidiennement** pour modifier les **symptômes de la maladie d'Alzheimer**. Ce sont des substances qui inhibent la dégradation de l'acétylcholine, un important neurotransmetteur associé à la mémoire, en bloquant l'enzyme acétylcholinestérase.

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés aux interactions moléculaires entre l'acétylcholinestérase souvent abrégé en "AChE", [enzyme](#) impliquée dans la transmission de l'influx nerveux et les différents composés pyrazoliques utilisés comme inhibiteurs à l'aide du Docking moléculaire qui est une des méthodes de la modélisation moléculaire.

Cette étude comprend trois chapitres :

Le premier chapitre est réservé à un rappel sur les enzymes, principalement l'acétylcholinestérase, et les composés pyrazoliques.

Dans le deuxième chapitre, nous exposons les méthodes de modélisation moléculaire (les méthodes quantiques et les méthodes non quantiques). Dans le domaine de la modélisation moléculaire, Le docking est une méthode qui prédit l'orientation d'une molécule par rapport à une autre pour avoir le complexe le plus stable. Il est fréquemment utilisé sur l'étude de la cible moléculaire des médicaments et réduire les essais expérimentaux.

Dans le troisième chapitre, nous discutons les résultats de notre étude théorique portant sur les énergies d'interactions entre l'acétylcholinestérase et les dérivés pyrazoliques moyennant le docking moléculaire. Le ligand L1 s'avère être le meilleur inhibiteur parmi les trois ligands car il forme le complexe le plus stable avec l'acétylcholinestérase.

Les références

1. D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson, Efficient unbound docking of rigid molecules, 2002.
2. De Oliveira E. B. Simulation moléculaire appliquée à l'acétylation de flavonoïdes catalysés par des lipases : influence des structures de la lipase et des flavonoïdes sur la régiosélectivité de la bioconversion. Thèse de doctorat d'université : Procédés biotechnologiques et alimentaires. Nancy Institut National Polytechnique de Lorraine. France, 2009, 187 p.
3. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S. and al . Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comput. Chem, 1998, 19 , 1639-1662.
Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. J Mol Biol, 1996, 261 , 470-489.
Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Development and validation of a .genetic algorithm for flexible docking. J. Mol. Biol, 1997, 267 , 727-48.
4. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S. and al . Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comput. Chem, 1998, 19 , 1639-1662.
Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. J Mol Biol, 1996, 261 , 470-489.
Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Development and validation of a .genetic algorithm for flexible docking. J. Mol. Biol, 1997, 267 , 727-48.
5. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S. and al . Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comput. Chem, 1998, 19 , 1639-1662.
Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. J Mol Biol, 1996, 261 , 470-489.
Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Development and validation of a .genetic algorithm for flexible docking. J. Mol. Biol, 1997, 267 , 727-48.
6. Liu G.D., Lin Y.H., Anal. Chem. 2006, 78, P. 835.
7. Pavlov V., Xiao Y., Willner I., Nano Lett. 2005, 4, P. 649.
8. Du D., Ding J.W., Cai J., Zhang A.D., Sens. Actuators B-Chem. 2008,134, P. 908.

9. Da Vies D. R., Green A. L., *Biochem. J.* 1956, 63, P.529.
Childs A. F., Da Vies D. R., Green, A. L., Rutland J. P., *Brit. J. Pharmacol.*, 1955,10, P.462.
10. Anzolini, Ieira.C.C., Corr A., Cardoso C.L., Cass Q.B., *J. Med. Chem.* 2013, 56, P. 2038
Kandimalla V.B., Ju H.X., *Chem. Eur. J.* 2006, 12, P. 1074.
11. Anzolini, Ieira.C.C., Corr A., Cardoso C.L., Cass Q.B., *J. Med. Chem.* 2013, 56, P. 2038
Kandimalla V.B., Ju H.X., *Chem. Eur. J.* 2006, 12, P. 1074.
12. Silman I., Sussman J.L., 2005, 5, P. 293.
13. Benoît Sanson « La Dynamique Structurale De L'acétylcholinestérase : Etude Réalisée Par Cristallographie Aux Rayons X Et Une Méthode Spectroscopique Complémentaire »
Thèse Doctorat, Université Joseph Fourier, 2009
- 14-15. Aurélie Urbain, Isolement De Xanthonés Et Coumarines Inhibitrices De L'acétylcholinestérase, Respectivement A Partir De *Gentianella Campestris* (L.) Börner Et *Gentianella Amarella* (L.) Börner Ssp. *Acuta* (Michx.) J.M.Gillett (*Gentianaceae*), Et *Peucedanum Ostruthium* (L.) Koch (*Apiaceae*), Université De Genève,2007.
Bocquené G, Galgani F, Walker C.H. In : *Biomarqueurs En Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris1997, P. 209-/240
16. Kryger G., Silman I., Sussman J. L. *Structure* 1999, 7, P. 297.
17. Jacques-Philippe Colletier, Étude Des Relations Structure – Dynamique – Fonction Au Sein De L'acétylcholinestérase, Thèse Doctorat, Université Joseph Fourier, 2006.
18. K. Ajay Kumar*, P. Jayaroopa, *Pyrazoles: Synthetic Strategies And Their Pharmaceutical Applications-An Overview*, *International Journal Of Pharmtech Research Coden (Usa): Ijprif* Issn : 0974-4304 Vol.5, No.4, Pp 1473-1486, Oct-Dec 2013
19. K. Ajay Kumar*, P. Jayaroopa, *Pyrazoles: Synthetic Strategies And Their Pharmaceutical Applications-An Overview*, *International Journal Of Pharmtech Research Coden (Usa): Ijprif* Issn 0974-4304 Vol.5, No.4, Pp 1473-1486, Oct-Dec 2013
20. S, .Güniz Küçükgül*, Sevil S, Enkardes, *Recent Advances In Bioactive Pyrazoles*, *European Journal Of Medicinal Chemistry* 97 (2015) 786-815.
21. J B. Maggio, G. Daidone, D. Raffa, S. Plescia, L. Mantione, V.M. Catena Cutuli, N.G. Mangano, A. Caruso, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 7376742
22. Ya-Ru Li, Chao Li, Jia-Chun Liu, Meng Guo, Tian-Yi Zhang, Liang-Peng Sun, Chang-Ji Zheng , Hu-Ri Piao, *Synthesis And Biological Evaluation Of 1,3-Diaryl Pyrazole Derivatives As Potential Antibacterial And Anti-Inflammatory Agents*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25 (2015) 5052–5057

23. G.C. Gerritsen, W.E. Dulin, *Diabetes* 14 (1963) 507-515.
24. G.C. Gerritsen, W.E. Dulin, *Diabetes* 14 (1963) 507-515.
25. Güniz Küçükgülzel*, Sevil S, Enkardes, *Recent Advances In Bioactive Pyrazoles, European Journal Of Medicinal Chemistry* 97 (2015) 786-815.
26. A.A. Bekhit, T. Abdel-Aziem, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 1935-1945.
27. M. El Kodadi, M. Benamar, I. Bouabdellah, *New Synthesis Of Two Tridentate Bipyrazolic Compounds And Their Cytotoxic Activity Tumor Cell Lines, Naturel Product Research*, 21 (11) 947- 952, 2007
28. J. Debord, *Introduction A La Modélisation Moléculaire*, 37-41 ;2004
29. B. Donald, K. Boyd, B. Lipkowitz, *Molecular Mechanics. The Method And Its Underlying Philosophy* .J. Chem. Educ. ,59,269 .1982
30. P. Chaquin, *Manuel De Chimie Théorique, Application A La Structure Et La Réactivité En Chimie Moléculaire* ,190 .2000
31. J.E. Williams, P. Von, R. Schleyer, *Ann. Rev. Phys. Chem.* ,19,531 .1968
32. U. Burkert Et N.L. Allinger ; *Molecular Mechanics* ,American Chemical Society, Washington, D, C .1982
33. J.S. Lomas, *L'actualité Chimique* , La Mécanique Moléculaire, Une Méthode Non Quantique Pour Le Calcul De La Structure Et De L'énergie D'entité Moléculaire, 7 .1986
34. F. Jensen ; *Introduction To Computational Chemistry* , John Wiley And Sons, Chichester. 1999
35. G.L. Warren, C. Webster Andrews, A.M. Capelli, B. Clark, J. Lalonde, M.H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S.F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I.D. Wall, J.M. Woolven, C.E. Peishoff, M.S. Head. *A Critical Assessment Of Docking Programs And Scoring Functions. Journal Of Medicinal Chemistry*, 2006, 49, 5912-5931
36. B. Coupez, R.A. Lewis. *Docking And Scoring - Theoretically Easy, Practically Impossible? Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13, 2995-3003.
- 37-38 D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson, *Efficient Unbound Docking Of Rigid Molecules*, 2002.
39. N. Moitessier, P. Eglebienne, D. Lee, J. Lawandi, C.R. Corbeil. *Towards The Development Of Universal, Fast And Highly Accurate Docking/Scoring Methods: A Long Way To Go. British Journal Of Pharmacology*, 2008, 153.
- 40.-41 S.J. Teague. *Implications Of Protein Flexibility For Drug Discovery. Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2, 527-541.
42. C.R. Corbeil, P. Englebienne, N. Moitessier. *Docking Ligands Into Flexible And Solvated Macromolecules-1. Development And Validation Of Fitted 1.0. Journal Of*

Chemical Informatic Modelling, 2007, 47, 435-449.

43. A. Jain. Scoring Functions For Protein-Ligand Docking. Current Protein And Peptide Science, 2006, 7, 407-420.
44. R.D. Clark, A. Strizhev, J.M. Leonard, J.F. Blake, J.B. Matthew. Consensus Scoring For Ligand/Protein Interactions. Journal Of Molecular Graphics And Modelling, 2002, 20, 281-
45. M. Feher. Consensus Scoring For Protein-Ligand Interactions. Drug Discovery Today, 2006, 11, 421-428.
46. B. Florent, Cours On Line;" Le Docking Moléculaire", Université De Paris7,Itodys(Cnrs Umr 7086), 2014.
47. Férey N, Bouyer G, Martin C, Drif A, Bourdot P, Ammi M, Nelson J, Burkhardt J-M, Autin L. Docking De Protéines En Réalité Virtuelle : Une Approche Hybride Et Multimodale. 2e Soumission A Rsti, 2008,P 10
- 48 . R.D. Clark, A. Strizhev, J.M. Leonard, J.F. Blake, J.B. Matthew. Consensus Scoring For Ligand/Protein Interactions. Journal Of Molecular Graphics And Modelling, 2002, 20, 281-
49. M. Feher. Consensus Scoring For Protein-Ligand Interactions. Drug Discovery Today, 2006, 11, 421-428.
50. D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson, Efficient Unbound Docking Of Rigid Molecules, 2002.
51. M. Feher. Consensus Scoring For Protein-Ligand Interactions. Drug Discovery Today, 2006, 11, 421-428.
52. B. Florent, Cours On Line;" Le Docking Moléculaire", Université De Paris7,Itodys(Cnrs Umr 7086), 2014.
53. Férey N, Bouyer G, Martin C, Drif A, Bourdot P, Ammi M, Nelson J, Burkhardt J-M, Autin L. Docking De Protéines En Réalité Virtuelle : Une Approche Hybride Et Multimodale. 2e Soumission A Rsti, 2008,P 10

