

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

**Etude de l'effet inhibiteur de quelques extraits et
molécules sur l'acétylcholinestérase : maladie
d'Alzheimer**

Présenté par : Lamrani Meriem

Devant le jury :

Président(e) : YOUSFI Mohamed (Pr).

Rapporteur : Dr BENAROUS Khadidja (MCA).

Co-Rapporteur : LINANI Abdelrahmane (Ing)

Examineur (rice)s : NIA Samira, (MCB)

Soutenu publiquement le :21/ 06/ 2018.

Remerciements

En premier lieu, louange à notre DIEU le tout puissant de m'avoir aidé à terminer ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice Dr.BENAROUS KHADIDJA qui m'a orienté et soutenu durant l'élaboration de ce travail. Sans sa conviction et sa ténacité, jamais ce dernier n'aurait vu le jour.

Mes vifs et sincères remerciements à mon co-promoteur Mr.LINANI ABDELRAHMANNE pour son soutien.

Je remercie également tous les membres du jury :Professeur YUCEFI MOHAMED, Docteur NIYA Samira

d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et Merci de l'attention que vous avez accordé à mon mémoire.

J'adresse un remerciement particulier à monsieur le responsable du laboratoire de biologie de l'université Amar Telidji pour son aide, sans oublier le responsable du CTS de l'hôpital Hmida Benadjila..

Je présente mes meilleurs remerciements aux enseignants de notre département qui nous ont aidés tout au long de notre cursus universitaire.

Mes derniers remerciements, vont à tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À Qui j'offre mon éducation et ma réussite, source de sagesse et de tendresse, ma très chère maman. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

À Mon père, celui qui m'a appris le respect et le sens du devoir.

À Mon mari, aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entouré. Cher mari j'aimerai bien que tu trouves dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères car grâce à ton aide et à ta patience avec moi que ce travail a pu voir le jour...

À ma chère sœur NOUR EL HOUDA, celle que j'aime profondément.

À Toute ma famille ; mes grand- parents, mes tantes et mes oncles et leurs familles

À ma belle-famille ; mes beaux-parents, mes beaux-frères et leurs familles et ma belle-sœur HIBA.

À Tous mes chers amis de tous les temps et tous mes collègues de l'université et en particulier ma chère KAOUTHAR,

À Mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université dont leurs conseils précieux m'ont aidé à réussir et à bien faire mes choix,

À Tous ceux qui ont contribué de loin et de prêt à l'élaboration de ce document.

Meriem.

RÉSUMÉ

Notre travail s'inscrit dans le courant de la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ; cible thérapeutique validée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. À partir de ces approches, nous avons testé l'inhibition de l'AChE par plusieurs extraits naturels et des molécules pures. Dans la première partie, nous avons estimé la quantité des composés phénoliques, des terpènes et des alcaloïdes à partir des extraits des graines de Cresson. Les résultats ont montré qu'ils contiennent des quantités considérables de ces composés. Dans la deuxième partie, nous avons étudié leurs effets inhibiteurs sur l'activité de l'AChE, les résultats ont confirmé la capacité d'inhiber l'enzyme avec des valeurs variant d'IC₅₀ de 0,59±0,043mg/ml à 1,73±0.074mg/ml. Ces résultats sont accompagnés par l'étude bio-informatique en déterminant le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif de l'AChE, Le docking moléculaire a donné les mêmes résultats que les études in vitro avec des distances de 0,7Å à 2,1 Å pour les molécules étudiées (lepidine B, quercétine et donépézil).

Les mots clés : acétylcholinestérase; inhibition ; IC₅₀ ; composés phénoliques ; alcaloïdes ; terpènes ; docking moléculaire ; maladie d'Alzheimer.

Liste des abréviations

- A β : peptide amyloïde- β ;
- AChE : acétylcholinestérase ;
- ACh : acétylcholine ;
- ACTI : acétylthiocholine iodide ;
- ADN : acide désoxyribonucléique ;
- APP : Amyloïd Precursor Protein ;
- DNF : Dégénérescences neuro-fibrillaires ;
- DTNB : acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque ;
- IC50 : la constante inhibitrice à 50% ;
- MA : maladie d 'Alzheimer ;
- PDB : banque de données de protéine ;
- TNB : 2-nitro-5-thiobenzoate ;
- T/M : tour par minute.

Liste des figures

- Figure 1** : Schéma représentatif du clivage de la protéine APP par trois sécrétases: α , β , γ . .. 4
- Figure 2** : Plaques amyloïdes β révélées en immunohistochimie par des anticorps anti-amyloïde β .
d'après (Serrano-Pozo *et al.*, 2011)..... 5
- Figure 3** : Dégénérescences neurofibrillaires révélées en immunohistochimie par des anticorps anti- tau (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). 5
- Figure 4** : Illustration de la cascade amyloïde. Illustration issue de la revue (Forlenza *et al.*, 2010).
..... 6
- Figure 5** : Graines, plante de Cresson alénois (*Lepidium sativum*)..... 16
- Figure 6** : Organigramme résumant les différentes étapes de l'extraction des alcaloïdes à partir des graines de cresson (*Lepidium sativum*)..... 17
- Figure 7** : Organigramme résumant les différentes étapes de l'extraction des composés phénoliques et des terpènes à partir des graines de cresson (*Lepidium sativum*).18
- Figure 8** Le schéma réactionnel de l'hydrolyse de l'Acétylcholine par AChE..... 18
- Figure 9** : Organigramme résumant le protocole d'extraction de l'acétylcholinestérase de cerveau du bovin (*Bos taurus*) (Santos *et al.*, 2016). 19
- Figure 10** : Le schéma réactionnel du mécanisme de la méthode d'Ellman..... 20
- Figure 11** : Représentations graphiques de l'inhibition de la réaction catalysée par l'AChE..26
- Figure 12** : les acides aminés du site actif de l'acétylcholinestérase humain (PDB ID : 1b41)
.....29
- Figure13** : Docking moléculaire du médicament donépézil (couleur bleu ciel) avec 1b41 : distance entre O-Ser203.....H-Doné = 1 Å° ; O-Ser203.....H-Doné = 1,8 Å° ; N-His447.....H-Doné =2 Å°30
- Figure14** : Docking moléculaire de l'inhibiteur lepidine B (couleur vert) avec 1b41 ; distance entre O-Ser203.....H-Lepi = 0,7 ; N-His447.....H-Lepi = 2,1 ; N-His447.....H-Lepi= 1,6.....31
- Figure15** : Docking moléculaire de l'inhibiteur quercétine (couleur gris) avec 1b41 : distance entre O-Ser203.....O-C7-Quer = 2,9 ; O-Glu334.....O-C3'-Quer = 1,8.....31

Liste des tableaux

Tableau 1. facteurs génétiques et maladies d'Alzheimer (Maitre <i>et al.</i> , 2017).	8
Tableau 2. Les médicaments de la MA mise en marché (Roguet <i>et al.</i> , 2016).	12
Tableau 3. Classification botanique de la plante du cresson alénois (<i>Lepidium sativum</i>).....	16
Tableau 4. Teneur, aspect et couleur des différents extraits.....	23
Tableau 5. Les valeurs d'IC50 pour les divers extraits et molécules étudiées sur l'AChE....	24
Tableau 6. Les valeurs d'IC50 de quelques extraits et molécules pures selon la littérature...	28
Tableau 7. Les résultats de doking.....	29

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	3
1. DÉFINITION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER (MA)	4
2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MA	4
2.1. PLAQUES AMYLOÏDES	4
2.2. DÉGÉNÉRESCENCES NEURO-FIBRILLAIRES DNF	5
2.3. CASCADE AMYLOÏDE	6
3. ETIOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	6
3.1. AGE	6
3.2. LES ANTÉCÉDENTS FAMILIAUX	7
3.3. LES FACTEURS GÉNÉTIQUES	7
3.4. FACTEURS TOXIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX	8
3.5. SEXE	8
4. SYMPTÔMES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	9
4.1. SYMPTÔMES COGNITIVES	9
4.1.1. TROUBLE DE LA MÉMOIRE	9
4.1.2. TROUBLE DU LANGAGE (APHASIE)	9
4.1.3. DIFFICULTÉ À EFFECTUER LES TÂCHES FAMILIÈRES, TROUBLES DU GESTE (APRAXIE)	9
4.1.4. TROUBLES DE RECONNAISSANCE (AGNOSIE)	9
4.2. TROUBLES PSYCHO-COMPORTEMENTAUX	10
4.2.1. HALLUCINATION ET DÉLIRES	10
4.2.2. L'ERRANCE ET DES OBJETS ÉGARÉS	10
4.2.3. ANXIÉTÉ ET LES TROUBLES D'HUMEUR	10
5. TRAITEMENT DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	10
5.1. LES MÉDICAMENTS UTILISÉS ACTUELLEMENT	11
5.1.1. LES ANTICHOLINESTIRASIQUES	11
5.1.2. LES ANTI-GLUTAMATES (ANTAGONISTE DES RÉCEPTEURS NMDA)	11
5.2. LES RECHERCHES EN COURS	13
5.2.1. LES THÉRAPEUTIQUES À L'ESSAI CIBLANT LES PEPTIDES B-AMYLOÏDES	13

5.2.2. LES THÉRAPEUTIQUES À L'ESSAI CIBLANT LA PROTÉINE TAU	13
5.2.3. LE CIBLAGE DE L'APOLIPOPROTÉINE E4	13
5.2.4. AUTRES CIBLES POSSIBLES APPARTENANT À DES MÉCANISMES RÉPUTÉS ACCESSOIRES	14
MATÉRIELS ET MÉTHODES	15
1. MATÉRIEL VÉGÉTAL	16
GRAINES DE CRESSON ALÉNOIS : LEPIDIUM SATIVUM.	16
DESCRIPTION DE LA PLANTE ET LE SYSTÈME BOTANIQUE	16
2. PRÉPARATION DES EXTRAITS	17
2.1. PRÉTRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON	17
2.2. EXTRACTION	17
3. EXTRACTION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉrase DU CERVEAU BOVIN (BOS TAURUS):	18
4. ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉrase :	19
4.1. PRINCIPE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE L'ACHE:	19
4.2. TESTS D'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ D'ACHE :	20
5. DOCKING MOLÉCULAIRE	21
RÉSULTATS ET DISCUSSION	22
1. RENDEMENT D'EXTRACTION EN MÉTABOLITES SECONDAIRES	23
2. INHIBITION DE LA RÉACTION CATALYSÉE PAR L'ACHE	24
3. DOCKING MOLÉCULAIRE	28
CONCLUSION GÉNÉRALE	32
CONCLUSION GÉNÉRALE	33
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Certains voient en elle un « problème majeur de société », d'autres la qualifient de « maladie de la mémoire » ou de « retour en enfance ». Elle, c'est la maladie d'Alzheimer, décrite pour la première fois par le psychiatre du même nom en 1906, après avoir étudié le cerveau d'une de ses patientes décédée à 56 ans, suite à la perte précoce et progressive de l'ensemble de ses facultés mentales (Doudrich *et al.*, 2006).

La maladie d'Alzheimer est la pathologie neurodégénérative la plus fréquente qui affecterait plus de 50 millions de personnes dans le monde en 2015 dont la moitié dans les pays occidentaux dans lesquels l'âge moyen de la population est élevé (Maitre *et al.*, 2017).

De nombreuses études indiquent que les lésions engendrées lors de la maladie d'Alzheimer touchent principalement les voies cholinergiques. Il en résulte une diminution parfois massive des taux de neurotransmetteurs circulant dans le cerveau. Le déficit en acétylcholine peut atteindre jusqu'à 90% dans les stades sévères de la maladie (Khan, 2009 ; Y-M. Liu *et al.*, 2017).

Pour compenser le déficit en acétylcholine, les médecins font habituellement appel aux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE). Ces molécules empêchant la dégradation de l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique ont montré leur efficacité en soulageant quelques symptômes liés à la maladie d'Alzheimer (Singh *et al.*, 2013).

Ces dernières années, un grand nombre d'inhibiteurs de l'AChE ont été signalés à partir de sources naturelles à l'origine synthétique (Chen *et al.*, 2007). Un grand nombre d'alcaloïdes naturels ont été trouvés comme des inhibiteurs d'acétylcholinestérase (X.C. He *et al.*, 2007).

Plusieurs classes de composés naturels et des extraits ont été également rapportés comme des inhibiteurs d'AChE (Mukherjee *et al.*, 2007). Certains d'entre eux ont montré un potentiel de développement de molécule pour le traitement de la Maladie d'Alzheimer (Mukherjee *et al.*, 2007).

Les inhibiteurs, tels que le donépézil, le rivastigime, le tarcine et la galanthamine, sont les principaux et la classe la plus développée de médicaments de thérapie de la maladie d'Alzheimer approuvés jusqu'ici. Ces médicaments ont été approuvés par La Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis et l'Agence européenne des médicaments pour le traitement des symptômes de la maladie d'Alzheimer (Y. Li *et al.*, 2015).

C'est à cette approche du traitement par inhibition de l'AChE que nous nous intéressons dans ce travail. Alors notre travail vise à démontrer l'effet inhibiteur de quelques extraits et molécules pures sur l'acétylcholinestérase, dont notre étude englobe deux parties:

La première partie est basée principalement sur l'extraction des alcaloïdes, des composés phénoliques et des terpènes à partir des graines de Cresson alénois (*Lepidium sativum*), par différents solvants.

La deuxième partie est consacré à étudier le pouvoir inhibiteur de ces extraits et d'autres molécules pures (Quercitine, acides ascorbique, acide salysalique) contre l'AChE, suivies des résultats et leur discussion et se terminera par une conclusion générale et perspectives.

Afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de l'AChE, nous avons fait appel aux approches par criblage virtuel *in silico*. Ces méthodes consistent à prédire l'affinité d'un très grand nombre de molécules (collectées en chimio-thèques) pour le site actif ciblé, ce qui est plus facile à mettre en œuvre pour un coût bien moindre que les criblages expérimentaux. Le criblage virtuel s'est développé pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs car les industries pharmaceutiques consacrent près de 10% de leur budget à la recherche de médicaments assistée par ordinateur. Parmi les logiciels de criblage virtuel, nous citons AutoDock Vina, Glide, FlexX et Gold (Arrault A, 2007). Ce dernier a été utilisé, dans ce travail, afin de confirmer la vertu de certains inhibiteurs de l'AChE par criblage virtuel.

L'objectif majeur de cette étude est de chercher et d'analyser la capacité d'inhibition de l'AChE par des extraits et des molécules pures naturelles y-compris des composés phénoliques et des alcaloïdes afin d'atteindre le but de trouver un traitement contre la maladie d'Alzheimer.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Définition de la maladie d'Alzheimer (MA)

Affection neurologique chronique, d'évolution progressive, caractérisée par une altération cérébrale irréversible aboutissant à un état démentiel. Elle se traduit par une dégénérescence nerveuse d'évolution inéluctable, causée par une diminution du nombre de neurones avec atrophie cérébrale et présence de « plaques séniles » (Wainsten *et al.*, 2017).

2. Physiopathologie de la MA

Deux types de lésions cérébrales sont observés en histologie dans la MA : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques amyloïdes. Il est désormais admis que ces lésions sont les déclencheurs de la survenue d'autres processus pathologiques, qui seront décrits plus loin. Toutefois les phénomènes à l'origine de l'apparition de ces lésions ne sont pas encore connus, et l'influence des DNF et des plaques sur la cascade neurodégénérative est encore à l'étude.

2.1. Plaques amyloïdes

Ces plaques, appelées aussi plaques séniles ou plaques neuritiques, correspondent à l'accumulation extracellulaire anormale du peptide amyloïde- β ($A\beta$). Cette protéine résulte d'un clivage anormal par des bêta-sécrétases et gamma-sécrétases d'une glycoprotéine membranaire, l'Amyloïd Precursor Protein (APP) (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Le schéma expliquant ce clivage est représenté dans la figure 01.

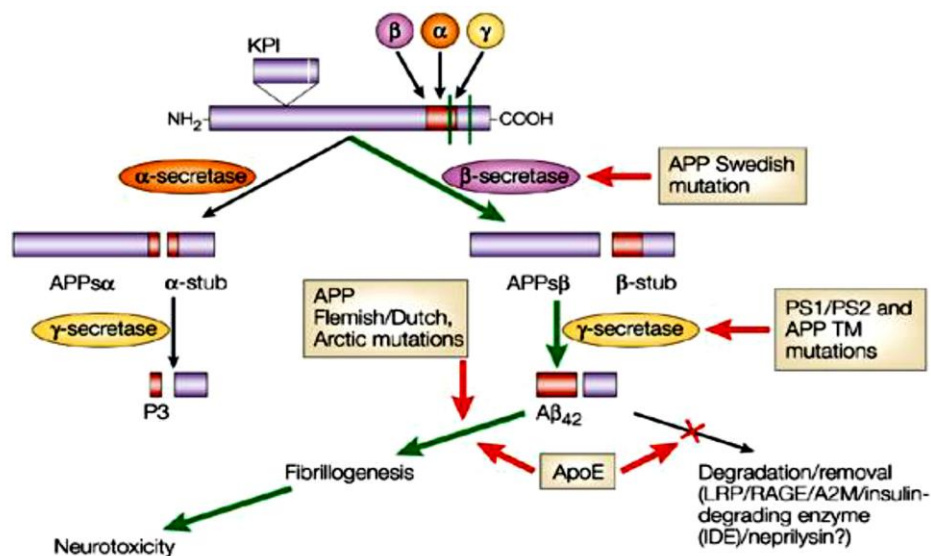


Figure 1. Schéma représentatif du clivage de la protéine APP par trois sécrétases: α , β , γ . 20 (Sisodia et Hyslop, 2002).

La protéine A β existe sous deux formes correspondant en fait à deux longueurs : A β 40 et A β 42. La forme A β 42 a une tendance fortement à s'auto-agréger et favorise alors l'apparition de plaques amyloïdes (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

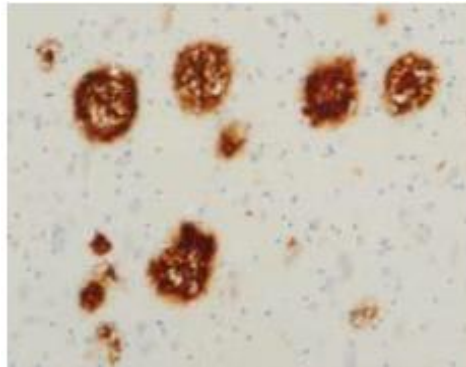


Figure 2. Plaques amyloïdes β révélées en immunohistochimie par des anticorps anti-amyloïde β . D'après (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

2.2. Dégénérescences neuro-fibrillaires DNF

Leur apparition serait due à une augmentation de la capacité de phosphorylation de la protéine tau (constituant essentiel à stabilité du cytosquelette et au transport axonal rapide). Hyper-phosphorylée, cette protéine tau se détache des microtubules pour se conformer en paire de filaments hélicoïdaux pathologiques, s'agrégeant en amas de neurofibrilles (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). (Figure 3).

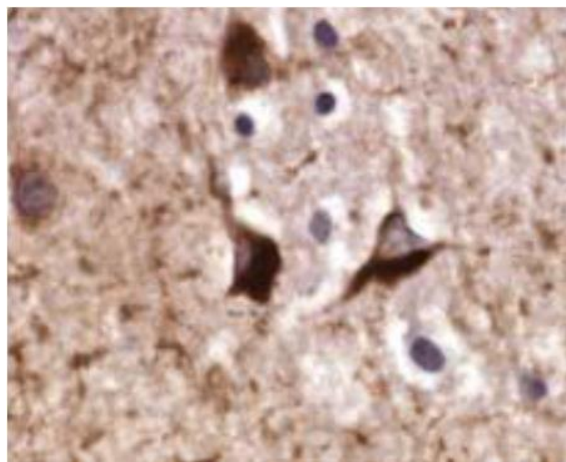


Figure 3. Dégénérescences neurofibrillaires révélées en immunohistochimie par des anticorps anti- tau (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

2.3. Cascade amyloïde

En 1992, Hardy et Higgins ont posé l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy et Higgins, 1992), modèle désormais largement repris dans d'autres travaux : celui-ci considère la production puis l'agrégation d'amyloïde- β comme phénomène à l'origine des autres atteintes cérébrales qui surviennent dans la MA. Les pathologies associées à la protéine tau sont alors considérées comme pouvant être un des processus en aval de cette cascade amyloïde

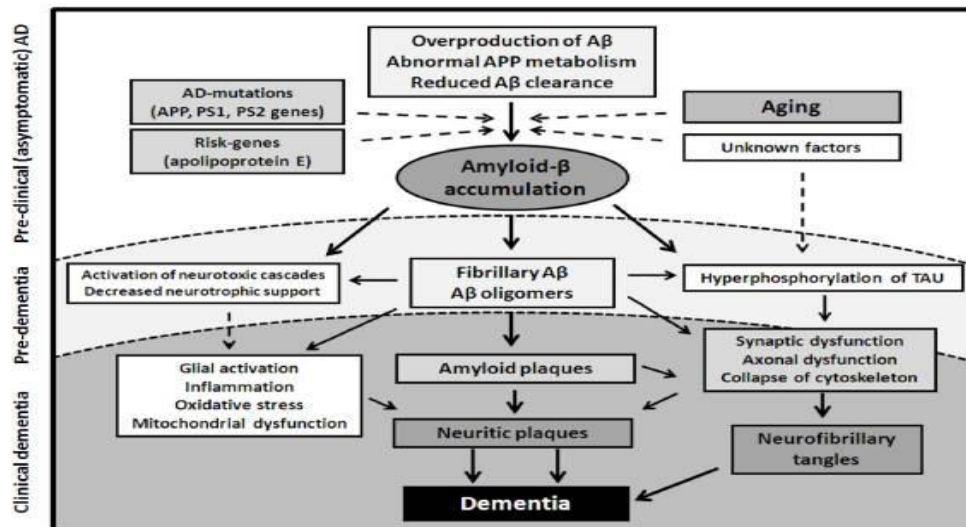


Figure 4. Illustration de la cascade amyloïde. Illustration issue de la revue (Forlenza *et al.*, 2010).

3. Etiologie de la maladie d'Alzheimer

Une multitude de facteurs ont été étudiés notamment dans les études épidémiologiques, pour tenter d'expliquer l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Elle demeure inconnue. De nombreuses théories ont été formulées, mais aucune d'entre elle n'est pleinement satisfaisante ou complètement vérifiée.

3.1. Age

C'est le plus grand facteur de risque pour l'apparition d'une MA. Une étude américaine portant chez les personnes très âgées a récemment montré que le taux d'incidence de la démence augmente de 12,7% par an chez les personnes âgées entre 90 et 94 ans, de 21,2% par an chez les personnes âgées entre 95 et 99 ans, pour atteindre 40,7% par an chez les âgés de plus de 100 ans (James & Schneider., 2010).

L'âge accroît la proportion de mutations somatiques qui s'accumulent dans le génome nucléaire des cellules cérébrales, surtout dans celles en phase post-mitotique (neurones) ou l'absence de réplication du ADN limite les capacités cellulaires dans la correction de mutations ponctuelles (Maitre *et al.*, 2017).

3.2. Les antécédents familiaux

Les études épidémiologiques révélant l'existence d'antécédents familiaux de la maladie chez 15 % des sujets atteints (Wainsten *et al.*, 2017).

L'étude des familles aussi a permis d'orienter les recherches sur des gènes considérés comme les principaux facteurs de risque de la MA. Parmi ceux-ci, trois gènes sont essentiels :

- le gène codant pour la protéine *amyloid precursor protein* (APP) qui est clivé par les sécrétases (α , β , γ). La plupart des mutations d'APP se situent près des sites de clivage des α - et β -sécrétases. Environ 49 différentes mutations sont connues, concernant 119 familles. Ces mutations sont dominantes pour leur quasi-totalité (Maitre *et al.*, 2017) ;
- le gène codant pour la préséniline de type 1, faisant partie du complexe γ -sécrétase. Les mutations dans ce gène représentent environ 50 % des MA précoces (Maitre *et al.*, 2017);
- le gène codant pour la préséniline de type 2. La fréquence des mutations dans ce gène est beaucoup plus rare. La protéine correspondant est également un composant important du complexe γ -sécrétase (Maitre *et al.*, 2017).

3.3. Les facteurs génétiques

De nombreuses régions du génome ont été identifiées comme facteur de risque d'une MA tardive, la plupart codant pour des protéines impliquées dans trois domaines biologiques distincts (Tableau 1) :

- a. les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol ;
- b. les gènes impliqués dans la réponse immunitaire ;
- c. les gènes impliqués dans le transport et l'endocytose vésiculaire.

Tableau 1. Facteurs génétiques et maladies d'Alzheimer (Maitre *et al.*, 2017).

Fonctions	Gènes	Caractérisation
Gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol	- APOE - ABCA7 - Clusterin (CLU) - SORL1	Facteur de risque le plus important, principal transporteur du cholestérol dans le cerveau. ATP binding cassette : transport HDL, rôle dans le transport du cholestérol. Apo-lipoprotéine J ; Rôle dans le transport des lipides, l'apoptose et la protection membranaire ; Rôle dans le transport cellulaire et la maturation de l'APP.
Gènes impliqués dans la réponse immunitaire	- MS4A - CR1 - TREM2 - CD33	Interagit avec les cellules B activés par les antigènes. Récepteur pour l'activation du complément, impliqué dans la formation des dépôts de protéine tau. Exprimé dans la microglie, rôle dans la phagocytose et l'inflammation. Inhibe les réponses immunitaires, Régule les phénomènes apoptotiques.
Gènes impliqués dans le transport vésiculaire et l'endocytose	- CD2AP - PICALM - EPHA1 - BIN1	Rôle dans le trafic intracellulaire et la régulation des fonctions cytosquelettiques. Fonctions dans la transmission synaptique, dans la clearance de l'APP. Participe à la formation des synapses et au développement du système nerveux. Intervient dans le trafic intracellulaire de l'APP, dans les phénomènes d'endocytose et d'apoptose.

3.4. Facteurs toxiques et environnementaux

La pollution de l'air semble jouer un rôle mineur sur le risque de démence à long terme, en particulier ce qui concerne les particules, les oxydes d'azotes ou l'ozone (Maitre *et al.*, 2017). L'augmentation de taux d'aluminium dans le cerveau a été mise en cause dans certaines études (Wainsten *et al.*, 2017).

une déficience en vitamine D pourrait favoriser une neurodégénérescence et une supplémentation a été proposée (Maitre *et al.*, 2017).

3.5. Sexe

L'affection touche plus de femmes que d'hommes puisqu'au-delà de 75 ans, les proportions sont de 13,2 % pour les hommes et de 20,5 % pour les femmes (Doudrich *et al.*, 2006). Néanmoins la question de savoir si les femmes sont plus susceptibles de développer la maladie d'Alzheimer que les hommes restent ouverts, (Notamment après la ménopause) soit plus grande que celui des hommes, ce facteur de risque est contesté du fait de la

différence de l'espérance de vie entre les hommes et les femmes notamment après la ménopause (Laëtitia, 2012).

4. Symptômes de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer commence toujours par une phase asymptomatique qui peut durer plus de 20 ans, au fur et à mesure qu'elle affecte les régions du cerveau, elle va entraîner la perte de certaines fonctions ou habiletés.

4.1. Symptômes cognitives

4.1.1. Trouble de la mémoire

Les défaillances de la mémoire comptent parmi les premiers signes de la maladie d'Alzheimer. Ces défaillances se manifestent d'abord par des petites perturbations de la vie quotidienne. Ces troubles peuvent être isolés et durer plusieurs années, les malades n'arrivent plus à retrouver le nom d'une personne ou d'un lieu pourtant bien connus. Enfin, peu à peu, la mémoire du passé plus lointain est atteinte (Wainsten *et al.*, 2017).

4.1.2. Trouble du langage (Aphasie)

Il passe parfois inaperçus au début : le malade cherche ses mots, utilisant fréquemment périphrases et mots passe-partout. Plus tardivement, l'aphasie ne fait plus de doute : discours peu informatif ou incohérent, inversion ou substitution de syllabes ou de mots. Des troubles sévères de la compréhension du langage s'installent (Wainsten *et al.*, 2017).

4.1.3. Difficulté à effectuer les tâches familières, troubles du geste (Apraxie)

Une personne atteinte de cette maladie n'est plus capable d'effectuer les gestes même parfois les plus simples tels que mettre une cuillère à la bouche, l'utilisation d'un peigne, ou de gestes plus complexes tels que monter des escaliers, s'habiller ou conduire une voiture, elle oublie même quels sont les objets et à quoi ils servent. La succion, la mastication et la déglutition, premiers réflexes acquis, sont le plus longtemps préservés (Doudrich *et al.*, 2006).

4.1.4. Troubles de reconnaissance (agnosie)

Les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer deviennent incapables de reconnaître des visages et des objets. Le problème ne se situe pas au niveau de la vision ou de la mémoire, mais d'une incapacité du cerveau à traiter l'information visuelle, auditive,

olfactive, etc. Autrement dit, le malade perçoit les contours d'un objet/ visage, mais ne peut lui donner une signification (Doudrich *et al.*, 2006).

4.2. Troubles psycho-comportementaux

4.2.1. Hallucination et délires

A cause du mauvais fonctionnement de leur cerveau, les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ont parfois des hallucinations visuelles ou auditives qui sont généralement désagréables, et elles sont convaincues de la réalité de cette fausse sensation (Talbert *et al.*, 2011).

Comme les personnes malades égarent leurs affaires, elles pensent qu'on les vole, ou que le facteur ne leur distribue pas du courrier important. Il arrive qu'elle traite leur conjoint ou enfants comme des inconnus et des imposteurs, elles peuvent être convaincues qu'un visiteur imaginaire vit à leur domicile, parfois elles se prennent pour un autre en se voyant dans le miroir (Talbert *et al.*, 2011).

4.2.2. L'errance et des objets égarés

Chez les personnes atteintes d'une démence, le phénomène d'errance n'est pas inhabituel et ils croient souvent avoir perdu leurs affaires et sont inquiètes tant qu'on ne les a pas retrouvées ; elles ont oublié où elles ont mis l'objet ou qu'elles l'ont donné à quelqu'un (Wainsten *et al.*, 2017).

4.2.3. Anxiété et les troubles d'humeur

La fréquence de l'anxiété se situe autour de 48%, tous stades de la maladie confondus, Elle peut apparaître bien avant la découverte des signes cognitifs (Mega *et al.*, 1996).

Devant un patient présentant des troubles cognitifs débutants, un diagnostic de dépression est très souvent posé avant le diagnostic de maladie d'Alzheimer. Il peut s'agir d'une confusion sémiologique entre apathie et dépression (Mega *et al.*, 1996).

5. Traitement de la maladie d'Alzheimer

Les pistes de traitement de la MA découlent pour l'essentiel de la mécanistique moléculaire de la maladie, telle qu'elle est majoritairement envisagée aujourd'hui. Pour

l'instant, il n'existe pas de substances médicamenteuses ou de stratégies pour prévenir ou guérir une MA (Maitre *et al.*, 2017).

5.1. Les médicaments utilisés actuellement

5.1.1. Les anticholinestirasiques

Les Anticholinestérasiques sont les premiers médicaments ayant une action démontrée dans la maladie d'Alzheimer. Ils augmentent la quantité d'acétylCholine dans la synapse, en bloquant l'AChE, qui dégrade l'ACh dans la fente synaptique.

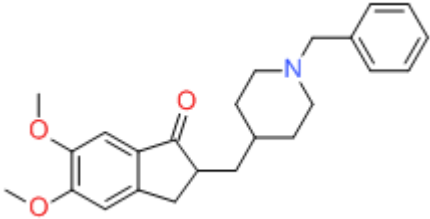
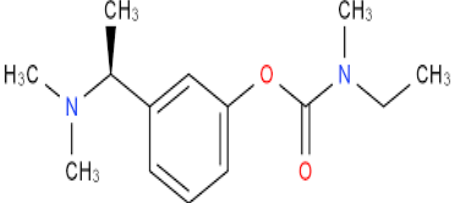
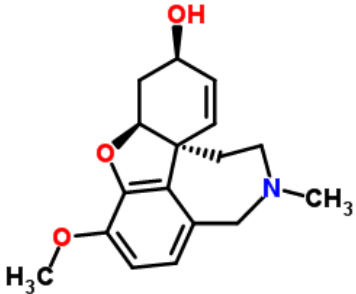
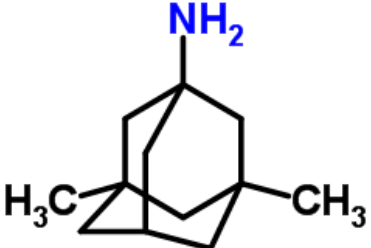
La tacrine (COGNEX), c'est le premier anti-cholinestérasique commercialisé, a été retirée du marché en raison de son hépatotoxicité en mai 2004 (Talbert *et al.*, 2011).

5.1.2. Les anti-glutamates (antagoniste des récepteurs NMDA)

Les anti-glutamates visent à bloquer les récepteurs du glutamate, molécule responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ils ont pour effet de retarder la perte des fonctions cognitives allant parfois jusqu'à les améliorer chez certains patients (Talbert *et al.*, 2011).

Cette classe thérapeutique, apparue en 2002, ne contient qu'un seul médicament : la mémantine (Ebixa®) qui possède des actions protectrices sur les vaisseaux et les cellules cérébrales en réduisant la neurotoxicité du glutamate et protégeant le récepteur NMDA. (Talbert *et al.*, 2011). Les médicaments utilisés sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Les médicaments de la MA mise en marché (Roguet *et al.*, 2016).

Médicaments, structure chimique du principe actif	Utilisation	Effets secondaires
<p>Donépézil chlorohydrate: ARICEPT® (comprimés de 5 mg) : C₂₄H₂₉NO₃</p> 	<p>C'est un anti-cholinestérasique utilisé dans le Traitement symptomatique de la MA dans ses formes légères à modérément sévère. Il agit dans le cerveau pour améliorer la réflexion, la mémoire, l'attention et la capacité d'accomplir des tâches toutes simples.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Diarrhées - Crampes musculaires - Fatigue - Nausées - Vomissements - Insomnie
<p>Rivastigimine : EXELON® (gélules de 4.5 mg) : C₁₄H₂₂N₂O₂</p> 	<p>C'est un anti-cholinestérasique utilisé dans le Traitement symptomatique de la MA dans ses formes légères à modérément sévère. Il peut améliorer la fonction cognitive (mémoire, orientation et langage).</p>	<p>Les réactions cutanées au le site d'application sont les effets indésirables les plus fréquentes, les autres sont de types gastro-intestinaux :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nausées - Vomissements
<p>Galantamine : REMINYL® (comprimés pelliculés à 4 mg) :C₁₇H₂₁NO₃</p> 	<p>C'est un anti-cholinestérasique utilisé dans le Traitement symptomatique de la MA dans ses formes légères à modérément sévère. Il peut améliorer la fonction cognitive (mémoire, orientation et langage) et l'aptitude générale requise pour l'accomplissement des activités de la vie quotidienne.</p>	<p>Les plus fréquentes sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nausées - Vomissements
<p>Mémantine : EBIXA® (comprimés pelliculés à 10 mg) : C₁₂H₂₁N</p> 	<p>C'est un anti-glutamate utilisé dans le Traitement des patients adultes atteints d'une forme modérée à sévère de la MA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - assoupissement; - constipation; - étourdissements; - fatigue; - maux de tête; - perte d'appétit; - des troubles du sommeil; - vomissements.

5.2. Les recherches en cours

5.2.1. Les thérapeutiques à l'essai ciblant les peptides β -amyloïdes

Grâce à l'injection d'anticorps capables de les supprimer, Dans le premier cas, ils vaccinent le patient contre l'APP, les monomères ou les oligomères d'A β ou contre les transporteurs ou les canaux affectés à la distribution et à l'élimination des peptides amyloïdes. Cette approche est nommée « vaccin thérapeutique » (Maitre *et al.*, 2017).

Les anticorps administrés aux malades sont le plus souvent des anticorps monoclonaux humanisés de souris ou des anticorps d'un donneur humain. Un tel anticorps a été développé, (le nom de la molécule est (bapineuzumab) et il est en cours d'évaluation clinique auprès de personnes atteintes de la maladie (Maitre *et al.*, 2017).

À côté de l'immunothérapie, les essais conduits pour réduire la formation de peptides amyloïdes ont ciblé les sécrétases α et β . Sur le plan conceptuel, il est apparu difficile de synthétiser des inhibiteurs de ces enzymes passant facilement la barrière hémocéphalique et ayant suffisamment de spécificité pour ne pas toucher d'autres cibles stratégiques, comme la voie Notch ou les canaux sodium-voltage-dépendant (Maitre *et al.*, 2017).

5.2.2. Les thérapeutiques à l'essai ciblant la protéine tau

Selon les hypothèses mécanistiques de la MA, la formation des enchevêtrements neurofibrillaires formés par des brins de protéine tau hyperphosphorylées serait la conséquence de l'accumulation et de l'agrégation des peptides β -amyloïdes. L'élimination de ces protéines tau anormales ou leur stabilisation en forme non phosphorylée empêchant leur oligomérisation est donc un objectif thérapeutique, mais qui est toujours en devenir à l'heure actuelle. Peu d'essais cliniques ont été entrepris et ce domaine est l'objet d'importantes recherches (Schroeder *et al.*, 2015 ; Maitre *et al.*, 2017).

5.2.3. Le ciblage de l'apolipoprotéine E4

Des approches pour prévenir ou ralentir l'expression clinique de la MA ont été tentées par la modification des taux d'apolipoprotéine E4 ou pour modifier son interaction avec les peptides A β , ce qui favorise le dépôt de plaques insolubles et réduit la clearance de ces peptides (Maitre *et al.*, 2017).

5.2.4. Autres cibles possibles appartenant à des mécanismes réputés accessoires

D'autres essais en prévision ou en réalisation imaginent de cibler des facteurs responsables de la neuro-inflammation impliqués dans la neurodégénérescence (AINS, certaines substances anti-cytokines). Des maladies métaboliques comme le diabète ayant un rôle dans l'altération du système nerveux, des agonistes des récepteurs au glucagon ou l'insuline par voie nasale ont été proposés ou essayés dans des études cliniques préliminaires. Dans le domaine de l'hypertension, détectée comme facteur important de comorbidité, certains antihypertenseurs (inhibiteurs des canaux calciques de type L) ont donné des résultats encourageants (Maitre *et al.*, 2017).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Graines de Cresson alénois : (*Lepidium sativum*, حب الرشاد)

Description de la plante et le Système botanique

Le Cresson alénois (*Lepidium sativum*), c'est une plante herbacée, appartient à la famille des Brassicacées (tableau 3), Elle est très répandu dans le monde entier et très célèbre en médecine traditionnelle. C'est une plante annuelle, à saveur âcre, dont la tige haute de 20 à 50 cm est dressée et rameuse (figure5). Les Feuilles et les graines ayant des alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides, vitamines, minéraux, protéines et lipides (Nakhleh *et al.*, 2014). Ces molécules donnent à la plante un effet hépato-protecteur, antihypertenseur, diurétique, de guérison des fractures, guérison des troubles respiratoires, antimicrobiens, production de lait, anti-inflammatoire, antioxydant, laxatif, chimio-protecteur et de nombreuses autres applications thérapeutiques (Nakhleh *et al.*, 2014).

Tableau 3 Classification botanique de la plante du cresson alénois (*Lepidium sativum*)

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dilleniidae</i>
Ordre	<i>Capparales</i>
Famille	<i>Brassicaceae</i>
Genre	<i>Lepidium</i>



Figure 5. Graines et plante de Cresson alénois (*Lepidium sativum*)

2. Préparation des extraits

2.1. Prétraitement de l'échantillon

Les graines de cresson (*Lepidium sativum* : حب الرشاد) a été achetée d'un herboriste au centre-ville de Laghouat, au mois de mars 2018. Elle a été identifiée au Laboratoire de botanique, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Laghouat.

Les graines sont réduites en poudre manuellement à l'aide d'un mortier puis avec un broyeur électrique ; Après broyage la poudre est tamisée à la même granulométrie et utilisée pour l'extraction.

2.2. Extraction

Les extraits des graines de *Lepidium sativum* ont été obtenus selon les protocoles d'extraction montrés dans les deux figures 6 et 7.

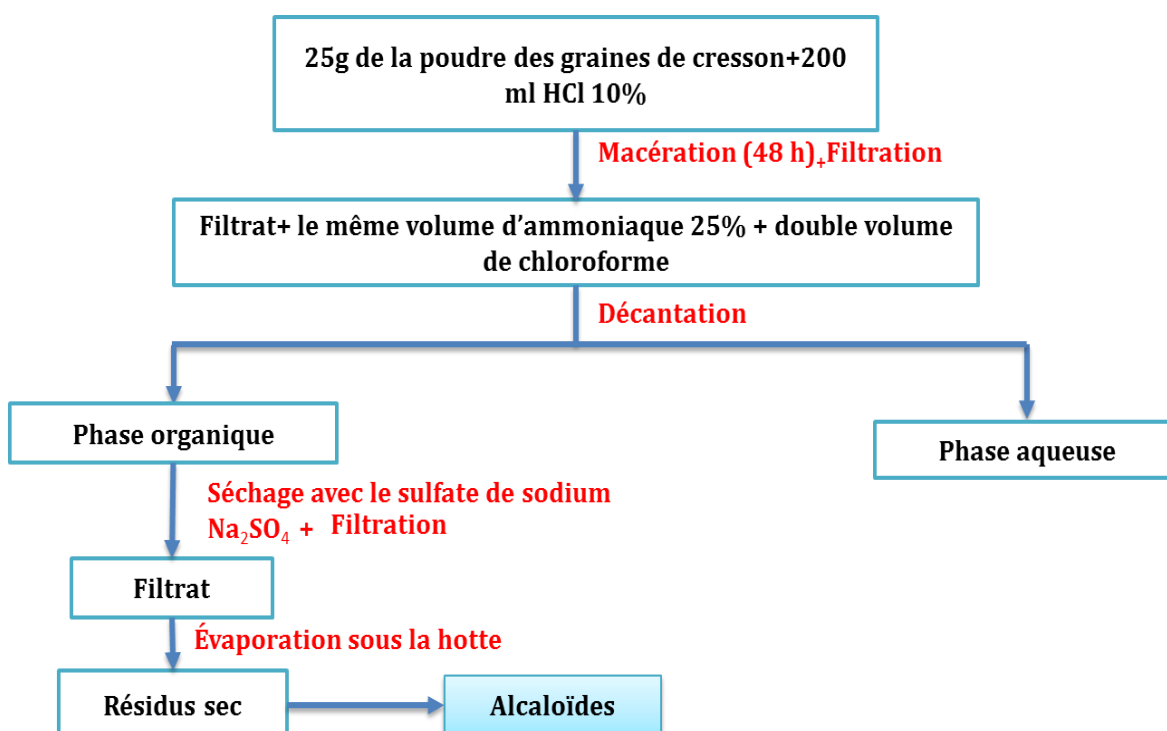


Figure 6. Organigramme résumant les différentes étapes de l'extraction des alcaloïdes à partir des graines de cresson (*Lepidium sativum*).

regroupées dans le schéma représenté dans la figure 9. Le protocole est adopté de (Santos *et al.*, 2016).

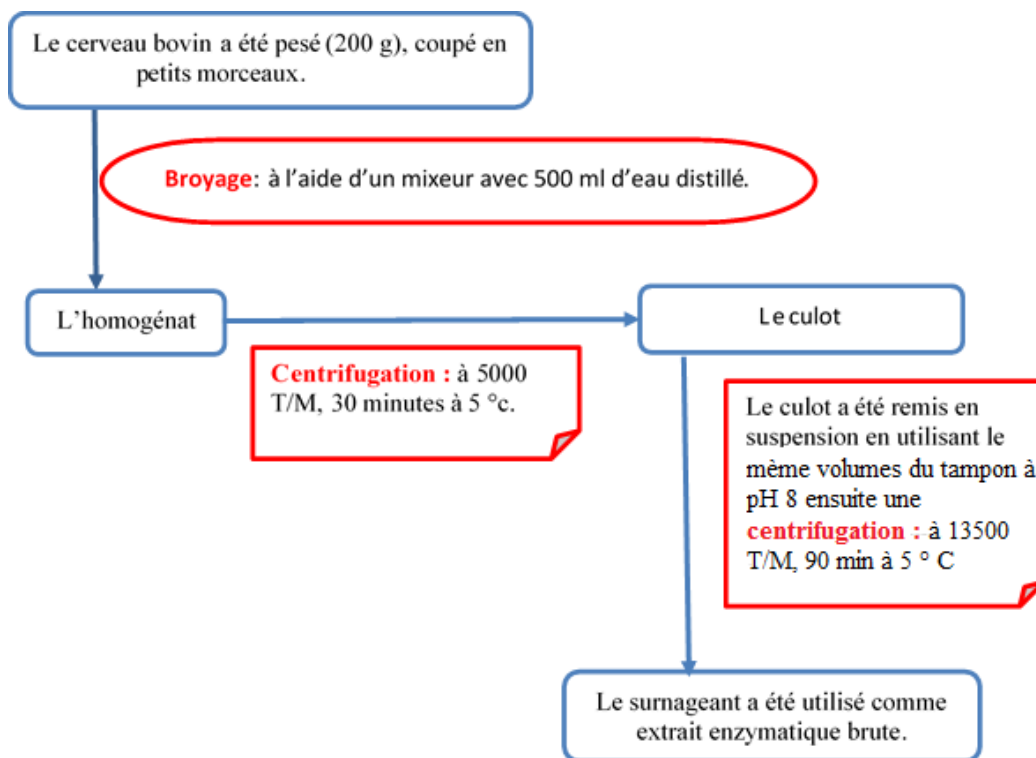


Figure 9. Organigramme résumant le protocole d'extraction de l'acétylcholinestérase du cerveau bovin (*Bos taurus*) (Santos *et al.*, 2016).

4. Activité enzymatique de l'acétylcholinestérase :

4.1. Principe de l'activité enzymatique de l'AChE:

L'activité d'acétylcholinestérase était dosée selon les méthodes spectrophotométriques développées par Ellman et al, avec le réactif d'Ellman : DTNB : acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque). Ce réactif réagit avec des thiols alors le clivage de la liaison disulfure pour donner le 2-nitro-5-thiobenzoate TNB^- , qui ionise le TNB^{2-} dianion dans l'eau à pH neutre et alcalin.

Alors dans cette étude, nous nous intéressons à l'apparition du produit d'une coloration jaune (5 thio-nitrobenzoate) (TNB^{2-}) qui absorbe à 412 nm en suivant l'évolution de sa densité optique. Le 5 thio-nitrobenzoate se produit du clivage du DTNB en présence de l'AChE selon l'équation de la réaction suivante (figure 10):

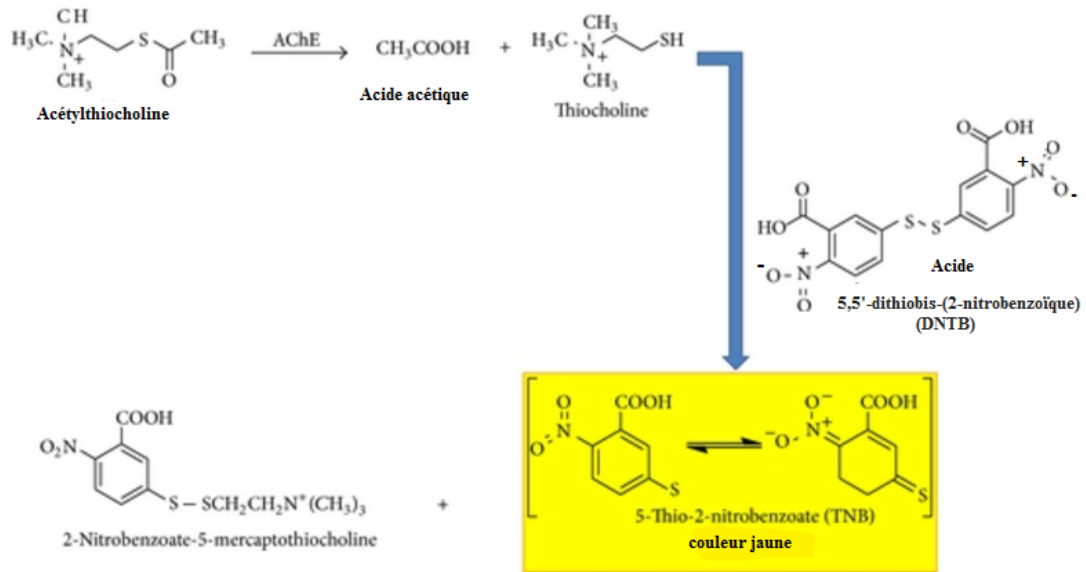


Figure 10. Schéma réactionnel de la réaction catalysée par l'AChE en présence du réactif d'Ellman (Badawy et El-Aswad, 2014).

4.2. Tests d'inhibition de l'activité d'AChE :

Dans le but d'étudier l'effet de nos extraits et molécules pures sur l'AChE et de déterminer le paramètre d'inhibition IC₅₀; la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'enzyme ou diminuer 50 % de l'activité enzymatique (IC₅₀) ; nous avons procédé à la méthode décrite par (Çayan *et al.*, 2012).

Le mélange réactionnel contenait 130 µl de tampon (pH 8,0), la solution d'enzyme 20 µl avec les composés d'essai 10 µl avec huit concentrations croissantes (de 0.25mg/ml à 2mg/ml) et ils ont été dissous soit dans l'éthanol soit dans le tampon (pH 8,0). Après incubation pendant 15 min à 25 ° C, la réaction était initiée avec l'addition de 20 µl de DTNB puis 20 µl de substrat ATCI (Acétylthiocholine iodide) (2mg/ml). L'hydrolyse de l'ATCI a été surveillée à 405 nm après incubation de la réaction solution à 37 ° C pendant 10 min contre un contrôle négatif et un blanc. Tous les tests ont été effectués en trois répétitions.

Les valeurs des IC₅₀ ont été déterminées à l'aide d'une représentation graphique $I\% = f(C)$ tel que I % a été calculé comme suit :

$$I\% = \frac{(E - S)}{E} * 100$$

Avec :

- $I\%$: le pourcentage d'inhibition.
- E : l'activité enzymatique en absence de l'inhibiteur à tester.
- S : l'activité enzymatique en présence de l'inhibiteur à tester.

5. Docking moléculaire

Les fichiers des structures tridimensionnelles de Donépezil, quercétine et lepidine B ont été obtenues à partir de la banque de données PubChem, ils ont été assemblés avec le logiciel Discovery Studio visualize v4.0. La structure 3D de l'acétylcholinestérase humaine avec ce code PDB ID: 1b41 a été obtenu à partir de la banque de données de protéine (PDB). Pour initialiser les études de docking, la protéine a été préparée en enlevant toutes les molécules d'eau, n'importe quels solvants Co-cristallisé et ses ligands. En citant que les hydrogènes sont absents dans les fichiers de PDB, par conséquent, les hydrogènes polaires ont été ajoutés à la structure en utilisant le logiciel PyMol. Des calculs de docking ont été exécutés avec le programme GOLD 4.1.2 (Genetic optimisation of ligand docking). Le fichier de configuration utilisé dans le logiciel GOLD est préparé en fixant les acides aminés du site actif, afin de spécifier le docking. Le nombre de solutions est fixé à 10, chaque inhibiteur donne ses propres solutions en se basant sur l'énergie d'association entre l'enzyme et l'inhibiteur.

Toutes les solutions ont été bien traitées et les conformations préférées étaient celles de la plus basse énergie de liaison avec le site actif. Les résultats de docking produits ont été directement étudiés dans le PyMol. Les interactions hydrogènes avec leurs distances interatomiques exactes a été déterminés avec le logiciel PyMol.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Rendement d'extraction en métabolites secondaires

Les extraits obtenus, présentent des aspects visqueux différents avec des couleurs différentes. Les teneurs de ces différentes fractions, leurs couleurs ainsi que leurs aspects sont consignés dans le tableau 04.

Tableau 4. Teneur, aspect et couleur des différents extraits.

Extrait	Aspect	Couleur	Teneur (%)
Hexanique	Huileux	Jaune claire	13,17
Acétate d'éthyle	Pâte huileuse	Jaune foncé	7,12
Extrait alcaloïdique brut	Poudre cristalline	Blanc à jaune très claire	0,25

Au regard du tableau précédent, nous remarquons que tous les extraits ont montré différents aspects avec la couleur jaune d'intensité différente variant du jaune très claire à jaune foncé.

D'après les résultats obtenus (Tableau 04), nous remarquons que la teneur d'extrait hexanique est la plus grande avec 13,17 % suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle avec 7,12% et l'extrait alcaloïdique brut a la plus faible teneur avec 0,25 %.

En comparant ces résultats avec d'autres travaux, nous pouvons dire que l'extrait hexanique présente une teneur plus élevée que les mêmes extraits pour les plantes suivantes : *Globularia alypum* (1,78%), *Teucrium polium* (2,01 %), *Juniperus oxycedrus* (1,244%), *Ajuga iva* (2,38%) et *Juniperus phoenicea* (2,90%), (Serseg, 2017). Ces résultats peuvent être interprétés par la partie de la plante utilisée (graines) qui sont connues de leurs réserves en lipides, alors, que les autres parties des plantes, c'étaient des parties aériennes. La même observation est enregistrée pour les extraits d'acétate d'éthyle par rapport aux mêmes plantes.

Pour l'extrait des alcaloïdes, nous avons enregistré une faible teneur par rapport à celle enregistrée pour la plante de *Peganum harmala* (5.6%), (Benarous et al, 2013 et 2015). Ceci est expliqué par la différence de la méthode d'extraction ainsi la richesse des graines de chaque plante.

Ces différences de rentabilité des métabolites secondaires s'expliquent par la méthode d'extraction et le type de solution utilisée, ainsi que la date et la région de récolte des plantes. Dont les facteurs externes affectent le type, la qualité et la quantité des métabolites de la plante.

2. Inhibition de la réaction catalysée par l'ACHé :

Afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur de nos molécules pures et extraits sur l'activité de l'acétylcholinestérase dans le but de trouver un traitement de la maladie d'Alzheimer, l'activité de l'ACHé de *Bos taurus* a été inhibée par les différents inhibiteurs.

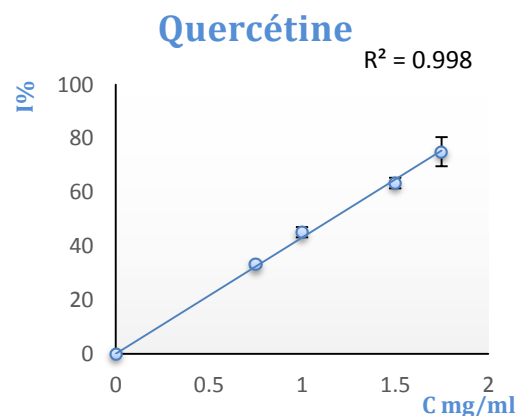
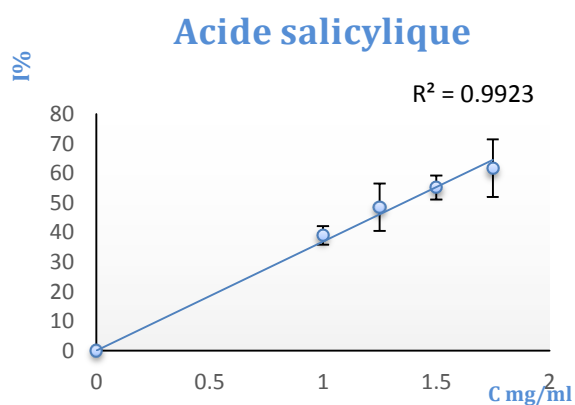
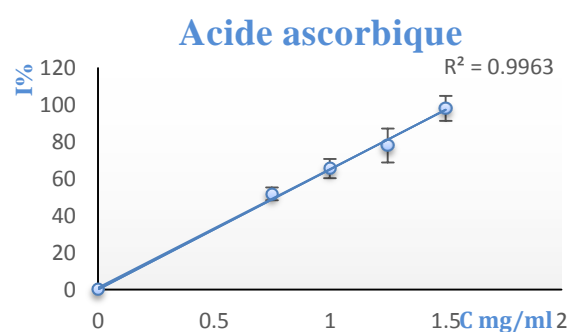
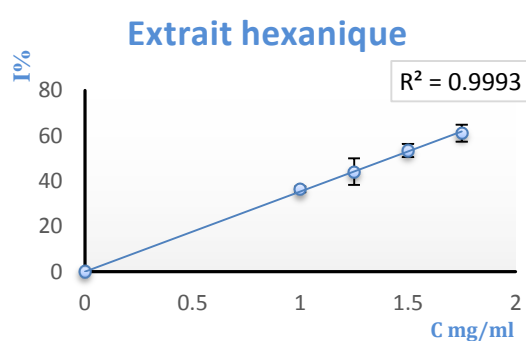
Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations des inhibiteurs exprimées en mg/ml, nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀) de chaque échantillon (les courbes sont présentés dans la figure 11). Ces représentations graphiques nous a permis de déterminer les valeurs des IC₅₀ où les valeurs sont enregistrés dans le tableau 5.

Tableau 5. Les valeurs d'IC₅₀ pour les divers extraits et molécules étudiées sur l'ACHé.

	Inhibiteur	IC₅₀ (mg/ml)	IC₅₀ (mM)
Extraits	Extrait hexanique	1,41±0,12	/
	l'extrait alcaloïdique brut	0,59±0,04	/
	Extrait d'acétate d'éthyle	1,73±0,07	/
Acides organiques	Acide salicylique	1,35±0,19	9,77±1,34
	Acide ascorbique	0,76±0,07	4,31±0,38
	Acide benzoïque	1,53±0,08	12,52±0,63
Composés phénoliques	Quercétine	1,15±0,04	3,80±0,14
	Catéchine	0,97±0,05	3,34±0,17
	Hispidine	0,93±0,14	3,77±0,58
Médicament	Donépézil	<0,25	<0,65

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits et molécules pures ont un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'ACHé avec des pourcentages d'inhibitions supérieures à 50% (présentées dans la figure 11). Les valeurs des IC₅₀ varient selon la nature et la structure chimique de chaque inhibiteur et les groupements fonctionnels que les constituent. Ces présents résultats démontrent que les dix solutions inhibitrices ont montrées une dégradation de la couleur proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'inhibiteur par rapport au contrôle.

Les résultats indiqués dans le tableau 5 ; concernant les extraits de *Lepidium sativum* ; ont montré que l'extrait alcaloïdique brut a donné le meilleur effet inhibiteur avec un IC50 de $0,59 \pm 0,04$ mg/ml, suivi par les extraits hexanique et d'acétate d'éthyle avec des valeurs de IC50 de $1,41 \pm 0,12$ et $1,73 \pm 0,07$ mg/ml, respectivement. D'après ces résultats, nous pouvons dire que les alcaloïdes des graines de cresson ont un pouvoir inhibiteur important contre l'AChE par rapport aux composés phénoliques et les terpènes et aussi par rapport aux acides organiques et les flavonoïdes utilisées comme des molécules pures. Si nous comparons ces valeurs avec celle du médicament Donépézil ($IC_{50} < 0,25$ mg/ml), nous pouvons dire que nos inhibiteurs sont de deux à six fois moins efficaces que le Donépézil.



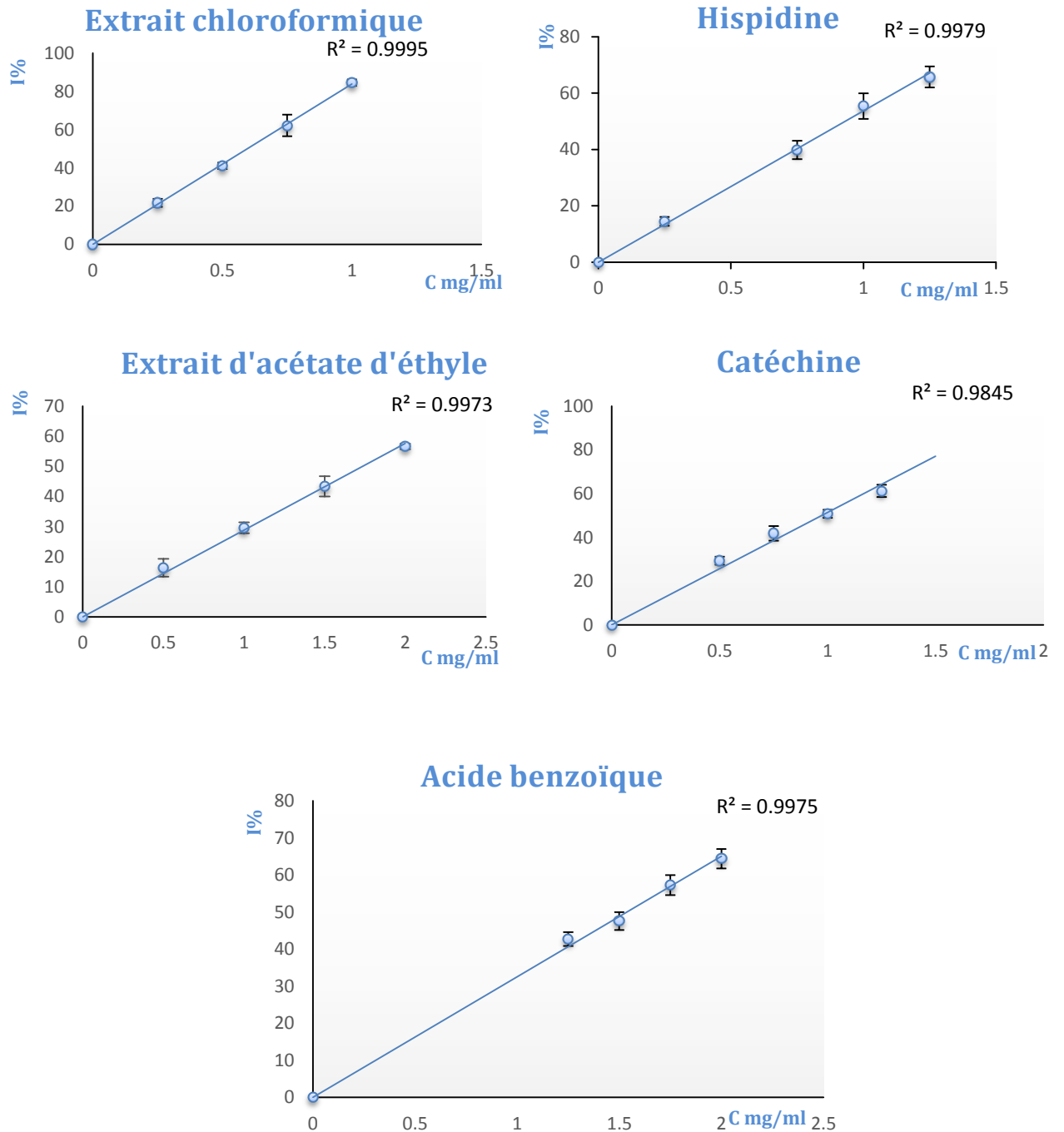


Figure 11 : Représentations graphiques de l'inhibition de la réaction catalysée par l'AChE.

Beaucoup de recherches scientifiques ont été réalisées pour évaluer les effets anticholinergiques, des extraits et des molécules isolées des plantes ou d'autre source sur l'activité de l'AChE, dans le but de trouver un nouveau médicament naturel traitant cette maladie sans effets secondaires. Dans cette étude, nous avons fait la même chose et nous voulons comparer nos extraits et molécules pures avec des molécules isolées des extraits

naturels et d'autres molécules pures par des travaux antérieurs qui sont regroupés dans le tableau 6.

Les molécules pures comme boldine qui est le principal alcaloïde que contient la famille de l'arbuste boldo avec une valeur d'IC₅₀= 8,5 µM (Kostelnik et Pohanka, 2018), ainsi le dérivé de la thio-urée (composés b3) (IC₅₀ de 8,92 µM), selon les études de (Larik *et al.*, 2018), sont plus efficaces que les acides organiques utilisées : l'acide salicylique (9,77±1,34 mM) et l'acide benzoïque (12,52±0,63 mM) et l'acide ascorbique (4,31±0,38 mM) et les composés phénoliques utilisées : quercétine (3,80±0,14 mM), catéchine (3,34±0,17mM) et hispidine (3,77±0,58mM).

Ainsi, nous citons le 1-Benzylpiperidine, un alcaloïde dérivés de pyridazine-3-carboxamide avec une valeur d'IC₅₀ de 0,11 µM (Burcu *et al.*, 2018) présente une efficacité plus élevée que tous les molécules pures et les extrait utilisés dans notre travail .

Plusieurs extraits isolés des plantes ont présenté leur pouvoir inhibiteur contre l'AChE à savoir :

L'extrait méthanolique de *Fritillaria walujewii* (de la famille des liliacées) avec IC₅₀= 7,6 mg/ml (Y-M. Liu *et al.*, 2017) est beaucoup moins efficace que nos trois extraits : l'extrait alcaloïdique brut, hexanique et d'acétate d'éthyle. La disponibilité des graines de cresson par rapport aux bulbes de *Fritillaria walujewii* qui n'existe que dans certaines régions et avec ces résultats mentionnés, nous amène à s'intéresser à l'utilisation de ces graines et à compléter les études sur elles.

L'extrait méthanolique de *Phyllanthus emblica* (de la famille Euphorbiacées) avec IC₅₀ de 53,88µg/ml (Kushal *et al.*, 2015) et l'extrait dichlorométhanique de *Hieronymiella aurea* (de la famille des Amaryllidacées) avec IC₅₀ d'intervalle de 1,84 - 15,40 µg/ml (Chen *et al.*, 2018), sont beaucoup plus efficaces que nos trois extraits et même les acides organiques et les composés phénoliques étudiées.

Les molécules pures isolées de *Corni fructus* (de la famille des cornacées) présentent de pouvoir inhibiteur différent : Loganin , Morronisid et 7-O-galloyl-D- sedohep tulose avec des valeurs d'IC₅₀ = 0,33 µg/ml, IC₅₀= 3,95 µg/ml et IC₅₀= 10,50 µg/ml, respectivement (Himanshu et al.,2016). Elles présentent une efficacité plus élevée que tous les molécules pures et les extraits utilisés dans notre travail.

Tableau 6. Les valeurs d'IC₅₀ de quelques extraits et molécules pures selon la littérature.

Extrait/ molécule pure	Famille	Plante	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)*, (µM)**	Référence
MeOH	Liliaceae	<i>Fritillaria walujewii</i>	7,60	/	Y-M. Liu <i>et al.</i> , 2017
MeOH	Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus emblica</i>	0,053	53,88 *	Kushal <i>et al.</i> , 2015
Dichlorométhane	Amaryllidaceae	<i>Hieronymiella aurea</i>	/	1,84 - 15,40 *	Chen <i>et al.</i> , 2018
- Loganin, - Morronisid - 7-O-galloyl-D-sedohep tulose	cornaceae	<i>Corni fructus</i>	0,128 1,6 /	0.33** 3.95** 10.50**	Himanshu <i>et al.</i> , 2016
Boldine	/	/	2,78	8,5 **	Kostelnik et Pohanka 2018
1-Benzylpiperidine	/	/	0,019	0,11**	Burcu <i>et al.</i> , 2018
Dérivé de la thio-urée (composés b3)	/	/	/	8.92 **	Larik <i>et al.</i> , 2018

3. Docking moléculaire

Les résultats expérimentaux obtenus ne sont pas assez suffisants pour confirmer la potentialité de ces inhibiteurs. Donc, il est nécessaire de faire des études bio-informatiques plus approfondies (docking moléculaire) dans le but d'avoir une idée sur le type et la nature d'interaction de l'AChE et ces molécules. Alors, dans ce travail, nous intéressons à étudier les interactions des acides aminés de site actif (Ser203, Glu334 et His447) d'AChE représenté dans la figure 12 avec quelques molécules : lepidine B, quercétine et le donépézil (médicament de référence), en utilisant le programme Gold 4.1.2 (Genetic optimisation of ligand docking).

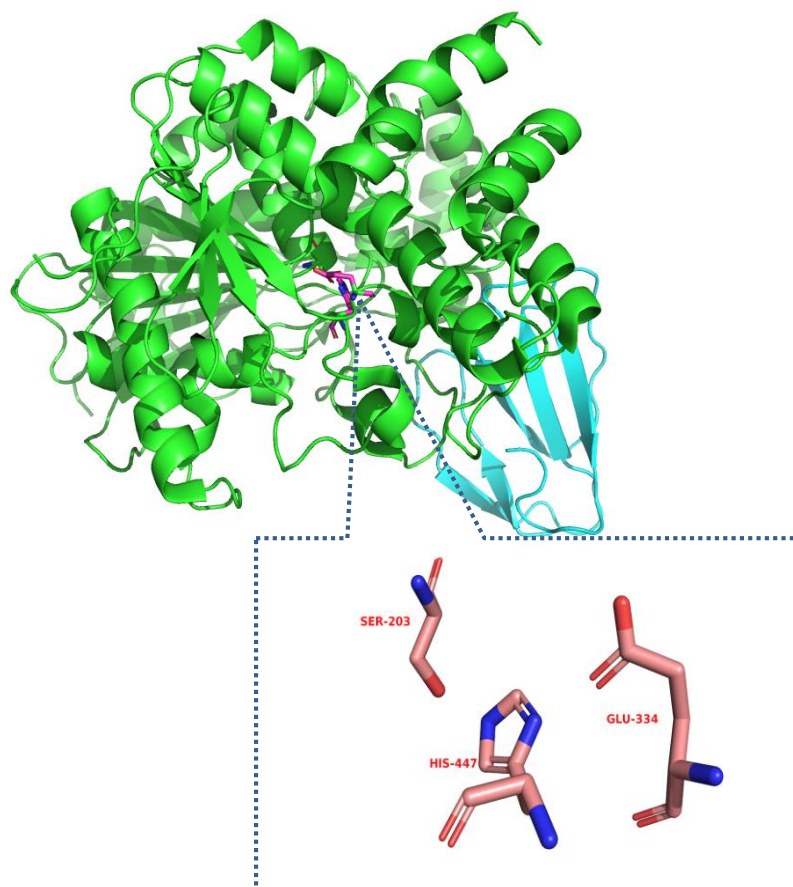


Figure 12. les acides aminés du site actif de l'acétylcholinestérase humain (PDB ID : 1b41).

Les résultats de docking produits ont été directement étudiés dans le PyMol. Les interactions avec leurs distances interatomiques exactes sont indiquées dans le tableau 7 et représentés dans les figures 13,14 et 15.

Tableau 7. Les résultats de docking.

inhibiteur	Acide aminé	Distance (Å)	Type d'interaction
Médicament donépézil	Ser203	O-H : 1	Liaisons hydrogènes
	His447	O-H : 1,8 N-H : 2	
Lepidine B	Ser203	O-H : 0,7	
	His447	N-H : 1,6 O-H : 2,1	
Quercétine	Ser203	O-H : 2,9	
	Glu334	O-H : 1,8	

Donépézil (RS-2-[(1-benzyl-4-pipéridyl) méthyl]-5,6-diméthoxy-2,3-dihydro indén-1-one) est un médicament de référence. Cet alcaloïde prend une position bien observée au sein du site actif. Il est bien entouré par les acides aminés du site actif formants une cavité, ce qui lui permet de faire des multiples liaisons hydrogènes avec ces acides aminés (Ser203 et His447) avec des distances de 1 Å entre l'oxygène de Ser₂₀₃ et l'hydrogène de donépézil ; de 1,8 Å entre l'oxygène de Ser₂₀₃ et l'hydrogène de donépézil et de 2 Å entre l'azote de His₄₄₇ et l'hydrogène de donépézil (figure 13).

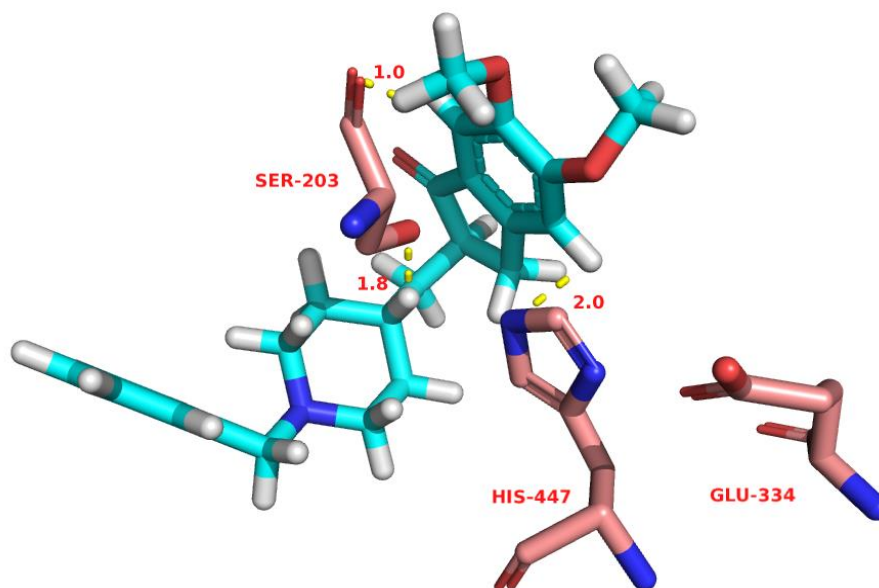


Figure13. Docking moléculaire du médicament donépézil (couleur bleu cyan) avec 1b41 : distance entre O-Ser₂₀₃.....H-Donépézil = 1 Å° ; O-Ser₂₀₃.....H-Doné = 1,8 Å° ; N-His₄₄₇.....H-Donépézil = 2 Å°.

Lepidine B : 3-(1H-imidazol-2-ylmethyl)-2-[3-(1H-imidazol-2-ylmethyl)phenoxy] phénol) est un alcaloïde dont sa structure lui donne l'occasion d'être piégé entre les acides aminés du site actif, donc capable de faire de multiples liaisons hydrogènes avec les acides aminés du site actif : Ser203 et His447. Ces liaisons hydrogènes se forment entre l'Oxygène de Ser203 et l'atome H de lepidine B avec une distance de 0,7 Å° ; entre l'azote de His447 et l'atome H de lepidine B avec une distance de 1,6 Å° et entre l'oxygène de His447 et l'atome H de lepidine B avec une distance de 2,1 Å° (figure 14). Ce qui confirme l'efficacité de cet inhibiteur.

Quercétine, appelé aussi (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3, 5,7-trihydroxychromen-4-one), est un flavonoïde de type flavonol, sa structure dans l'espace lui mène d'être piégé dans une poche entouré par des acides aminés du site actif. Cette structure lui permet de faire de multiples liaisons hydrogènes avec ces acides aminés. Ces liaisons se forment entre

l'Oxygène de Ser203 et l'oxygène du carbone 7 de quercétine avec une distance de 2,9 Å et entre l'oxygène de Glu334 et l'atome O du carbone 3' de quercétine avec une distance de 1,8 Å (figure 14), ce qui confirme l'efficacité de cet inhibiteur (figure 15).

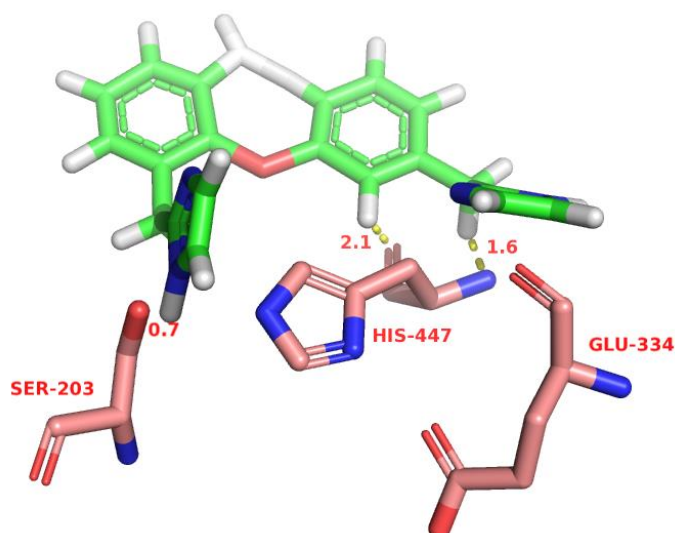


Figure14. Docking moléculaire de l'inhibiteur lepidine B (couleur vert) avec 1b41 ; distance entre O-Ser₂₀₃.....H-Lepi = 0,7 ; N-His₄₄₇.....H-Lepidine B = 2,1 ; N-His₄₄₇.....H-Lepidine B= 1,6.

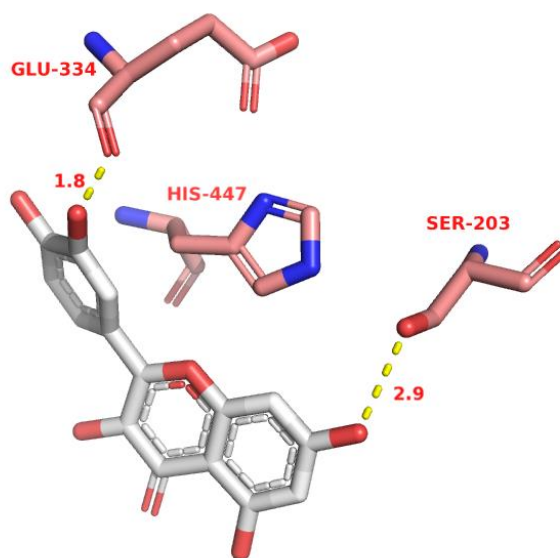


Figure15. Docking moléculaire de l'inhibiteur quercétine (couleur gris) avec 1b41 : distance entre O-Ser₂₀₃.....O-C7-Quercétine = 2,9 ; O-Glu₃₃₄.....O-C3'-Quercétine = 1,8.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Depuis quelques années, de nombreuses substances ont fait l'objet d'études dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Parmi celles-ci, les substances modifiant le fonctionnement cholinergique méritent une place particulière. L'inhibition de l'AChE est considérée comme l'une des plus stratégies importantes pour traiter les patients atteints la maladie d'Alzheimer (Kushal *et al.*, 2015).

Par l'étendue de ces recherches impliqués actuellement, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'effet inhibiteur de quelques molécules pures : (tels que l'acide ascorbique, l'acide salicylique, l'acide benzoïque, la quercétine, la catéchine, l'hispidine et le donépézil : médicament de référence) et nos extraits (hexanique, chloroformique et d'acétate d'éthyle des graines de cresson) contre l'AChE afin de les sélectionner pour un traitement de la MA.

Les résultats obtenus à travers ce modeste travail montrent que tous les molécules pures et les extraits présentent des effets inhibiteurs très importants, qui sont confirmés par les valeurs des IC₅₀. Nous avons enregistré que l'extrait chloroformique riche en alcaloïdes de la plante cresson est le meilleur inhibiteur avec une valeur d'IC₅₀ de 0,59±0,04 mg/ml suivi par l'acide ascorbique IC₅₀=0,76±0,067mg/ml puis l'hispidine, molécule pure isolée de *Inonotus hispidus*, avec IC₅₀=0,93±0,14 mg/ml.

Ces résultats sont accompagnés avec une étude bioinformatique en déterminant le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif de l'AChE. Tous les résultats du docking moléculaire ont confirmé l'inhibition des molécules étudiées.

L'ensemble de ce travail a permis donc de mieux connaître l'intérêt de l'étude des nouvelles substances biologiques. De même, la modélisation par amarrage moléculaire présente une actualité importante vis-à-vis sa rapidité en la comparant avec les tests *in vitro* ou *in vivo*.

Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Il faut isoler les molécules inhibitrices des extraits des graines de cresson, les identifier et caractériser leurs structures. Ainsi, elles nécessitent leurs tests *in vivo* afin d'étudier leurs potentialités comme des futures médicaments contre la MA. Il reste encore beaucoup de substances biologiques utiles (graines, feuilles, racines de cette plante et d'autres plantes) qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de l'être afin de déterminer leurs potentialités contre la MA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

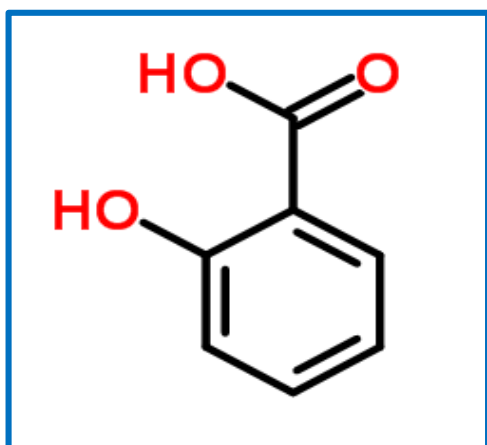
1. Arrault A. (2007). Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat d'université : Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. Orléans : Université d'Orléans. France. 176.
2. Badawy, M. E. I., El-Aswad, A.F. (2014). Bioactive Paper Sensor Based on the Acetylcholinesterase for the Rapid Detection of Organophosphate and Carbamate Pesticides. *International Journal of Analytical Chemistry*. (10):536823.
3. Burcu, K., Hayrettin, O., Tugba, E. , Nihan, O., , Deniz S. D. (2018). Design and synthesis of some new carboxamide and propanamide derivatives bearing phenylpyridazine as a core ring and the investigation of their inhibitory potential on in-vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Bioorganic Chemistry*. (79) :235-249.
4. Chen, S., Xiao-Jie, Z., Liang, L., Wei-Dong, L. (2007). Current experimental therapy for Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology*, 5: 127–134.
5. Chen, S., Guo-Liang, Q., Bo, L., Jing-Bo Shi, Xin-Hua, L., Wen-Jian, T. (2018). Tricyclic pyrazolo[1,5-d][1,4]benzoxazepin-5(6H)-one scaffold derivatives: Synthesis and biological evaluation as selective BuChE inhibitors. *Medecinal chemistry*. (18) : 30124-7.
6. Doudrich, J., Dubois, B., Petitpré, J. (2006). Le livre vert de la maladie d'Alzheimer. Paris. PP : 9-20.
7. Falana, H., Nofall, W., Nakhleh, H. (2014). *Lepidium Sativum* (Garden cress). *Journal of Ethnopharmacology*.
8. Forlenza, O.V., Diniz, B.S., Gattaz, W.F. (2010). Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Medecine*, 8: 89.
9. Freitas, A.P., Santos, C.R., Sarcinelli, P.N., Silva Filho, M.V., Hauser-Davis, R.A., Lopes, R.M. (2016). Evaluation of a Brain Acetylcholinesterase Extraction

- Method and Kinetic Constants after Methyl-Paraoxon Inhibition in Three Brazilian Fish Species. *Journal pone*. **10**: 1371.
10. Hardy, J.A., Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, **256**: 184-5.
 11. Himanshu, K.B., Chan, H.P., Takako, Y., Byung-Sun, M., Hyun, A. J., Jae, S. C., (2016). Kinetics and molecular docking studies of loganin, morroniside and 7-O-galloyl-D-sedoheptulose derived from Corni fructus as cholinesterase and b-secretase 1 inhibitors. *Archives of pharmacal research*.**39(6)**:794-805
 12. Isabelle Roguet et al., (2016). Dictionnaire vidal. 92^{ème} édition. Paris. PP : 191-193/ 819-921/1669-1671/2284-2286
 13. James, B. D., Schneider, J. A. (2010). Increasing incidence of dementia in the oldest old: evidence and implication. *Alzheimer's Research & Therapy*, **2** : 9.
 14. Benarous, K., Bombarda, I., Iriepa, I., Moraleda, I., Gaetan, H., Linani, A., Tahri, T., Sebaa, M., Yousfi, M. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies, *Bioorganic Chemistry*, Volume 62, October 2015, Pages 1–7, [doi:10.1016/j.bioorg.2015.06.005](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.06.005).
 15. Benarous, k., Djeridane, A., KAMELI, A., YOUSFI, M. Inhibition of *Candida rugosa* lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxidant activities, *Current enzyme inhibition*, 2013, 9 (1): 75-82.
 16. Khan, M.T.H. (2009). Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using in silico methods: current status and future prospects. *New Biotechnology*. **25**:331-346.
 17. Kostelnik, A., Pohanka, M. (2018). Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by a Plant Secondary Metabolite Boldine. *BioMed Research International*. **10** : 1155.
 18. Kushal, B., Ariful, I., Tahmida, S., Pulak, K. B.(2015). In-vitro cholinesterase inhibitory activity of dry fruit extract of *Phyllanthus emblica* relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *The Journal of Phytopharmacology*. **4(1)**: 5-8.
 19. Larik, F., Shah, M.S., Aamer, S., Shah, H.S., Channar, P.A., Bolte, M., Iqbal, M. (2018). New cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: structure activity relationship, kinetics and molecular docking studies of 1-Butanoyl-3-Arylthiourea derivatives. *Biological macromolecules*. (**17**) :32892-1
 20. Maitre, M., Klein, C., Mensah-Nyagan A.G. (2017). Mécanismes, facteurs de risques et stratégies thérapeutiques dans la maladie d'Alzheimer. *NPG Neurologie-Psychiatrie-Gériatrie*, **17** : 352-364.

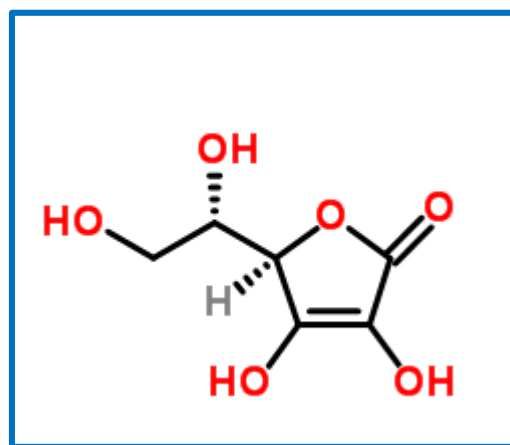
21. Mega, M.S., Cummings, J.L., Fiorello, T., Gombein J. (1996). The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology*, **46**: 130-135.
22. Mukherjee, P.K., Venkatesan, K., Mainak, M. (2007). In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity of the essential oil from *Acorus calamus* and its main constituents. *Planta Medica*, **73**: 283–285.
23. Ngatcha-Ribert Laëtitia. (2012). Alzheimer: la construction sociale d'une maladie. Dunod; paris. PP: 185-200.
24. Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia, Food Analytical Methods - FOOD ANAL METH. 5.
25. Pulok, K., Mukherjee, B., Venkatesan, K., Mainak, M., Peter, J., Houghton Mukherjee, P.K. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, **14**: 289–300
26. Schroeder, S.K., Joly-Amado, A., Gordon, M.N., Dave, M. (2015). Tau-directed immunotherapy: a promising strategy for treating Alzheimer's disease and other tauopathies. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **11**: 9-25.
27. Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. **1(1)**:a006189.
28. Serseg Talia, Etude in silico et in vitro de l'effet inhibiteur de quelques molécules pures sur l'activité de la lipase de *Candida rugosa*: Traitement de l'obésité, Novembre 2017, mémoire de magister en biologie, ENS-Laghouat.
29. Singh, M. Kaur, M. Kukreja, H. Chugh, R. Silakari, O. Singh, D. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **70**: 165-188.
30. Sisodia, S.S., St George-Hyslop, P.H. (2002). Gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in?. *Nature Reviews Neuroscience*. **3(4)**:281-90.
31. Talbert, M., Willoquet, G., Gervais, R. (2011). GPC Guide Pharmaco Clinique. 7^{ème} édition, Paris. PP: 1227-1240.
32. Tel Çayan, G, Apaydın, M, Duru, M, and Öztürk, M. (2012). Antioxidant and Cholinesterase Inhibition Activities of Three *Tricholoma* Species with Total phenolic and flavonoid contents: the edible mushrooms from Anatolia, Food Analytical Methods 5 (3), 495-504.
33. Wainsten, J. P., et al. (2017). Le Larousse Médical. 6^{ème} édition, Paris. PP: 36-37.

34. Xu-Chang, H., Song, F., Zhi-Fei, W., Yufang, S., Suxin, Z., Yu Xia, Hualiang, J., Xi-can, T., Donglu, B. (2007). Study on dual-site inhibitors of acetylcholinesterase: Highly potent derivatives of bis- and bifunctional huperzine B. *Bioorganic and Medinal Chemistry*, **15**:1394–1408.
35. Y. Li, X., Zhang, L., Jiang, L., Yuan, T., Cao, X., Li, L., Dong, Y., Li, S.F., Yin. (2015). Inhibition of acetylcholinesterase (AChE): a potential therapeutic target to treat Alzheimer's disease. *Chemical Biology & Drug Design*, **86** :776-782.
36. Yu-Ming, L., Ya-Dong, F., Xi, L., Jian-Bing, N., Wei, L., Li-Ning, W., Li-Jun, T., Qing-Hua, L. (2017). Isosteroidal alkaloids as potent dual-binding site inhibitors of both acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from the bulbs of *Fritillaria walujewii*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **137**: 280-291.

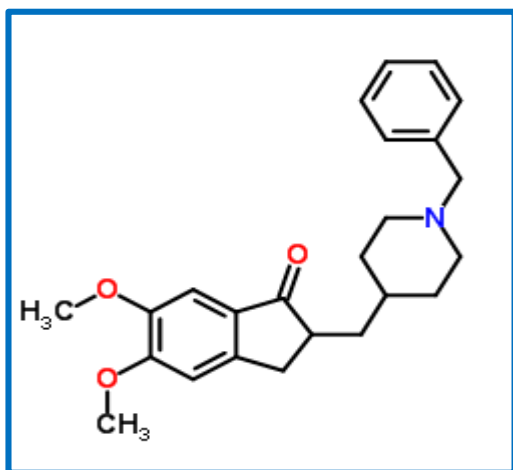
Annexes:



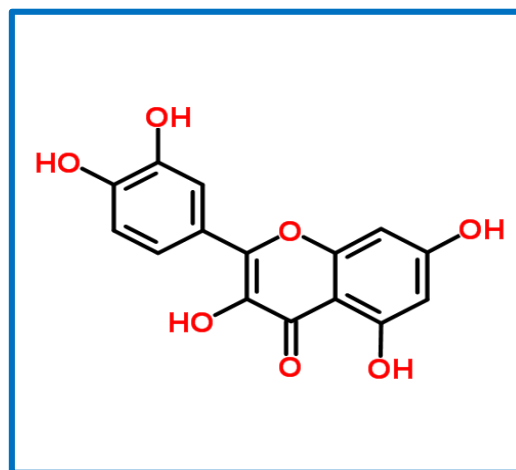
Acide salicylique



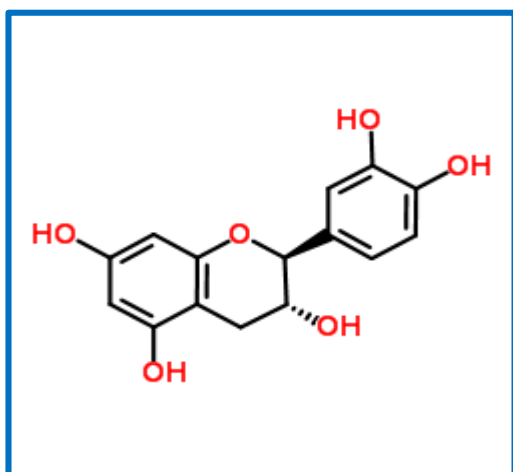
Vitamine C : acide ascorbique



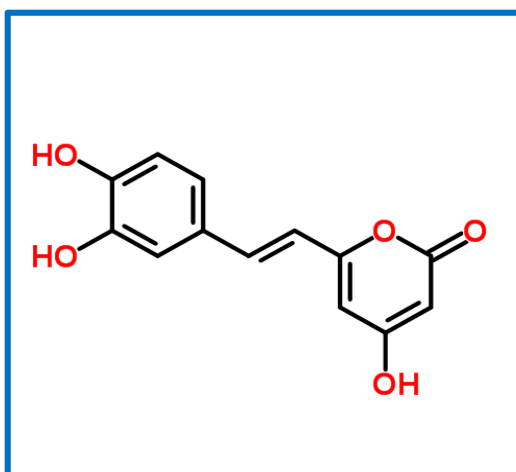
Donépézil



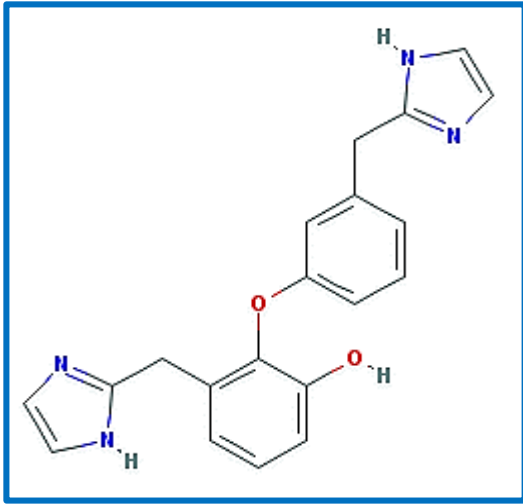
Quercétine



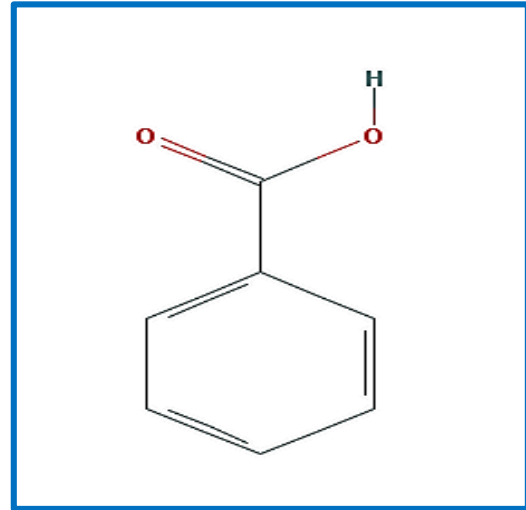
Catéchine



Hispidine



Lepidine B



Acide benzoïque

RÉSUMÉ

Notre travail s'inscrit dans le courant de la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase ; cible thérapeutique validée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. À partir de ces approches, nous avons testé l'inhibition de l'AChE par plusieurs extraits naturels et des molécules pures. Dans la première partie, nous avons estimé la quantité des composés phénoliques, des terpènes et des alcaloïdes à partir des extraits des graines de Cresson. Les résultats ont montré qu'ils contiennent des quantités considérables de ces composés. Dans la deuxième partie, nous avons étudié leurs effets inhibiteurs sur l'activité de l'AChE, les résultats ont confirmé la capacité d'inhiber l'enzyme avec des valeurs variant d'IC₅₀ de 0,59±0,043mg/ml à 1,73±0,074mg/ml. Ces résultats sont accompagnés par l'étude bio-informatique en déterminant le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif de l'AChE, Le docking moléculaire a donné les mêmes résultats que les études in vitro avec des distances de 0,7Å à 2,1 Å pour les molécules étudiées (lepidine B, quercétine et donépézil).

Les mots clés : acétylcholinestérase; inhibition ; IC₅₀ ; composés phénoliques ; alcaloïdes ; terpènes ; docking moléculaire ; maladie d'Alzheimer.

ABSTRACT

Our work is part of the search for new acetyl cholinesterase inhibitors, a validated therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease. From these approaches, we tested the inhibition of the AChE by several natural extracts and pure molecules. In the first part, we have extracted phenolic compounds, terpenes and alkaloids from the cress seeds. The results showed that they contain considered quantities of these compounds. In the second part, we studied their inhibitory effects on the activity of the AChE; the results confirmed the ability to inhibit the enzyme with IC₅₀ values ranging from 0.59±0.04mg/ml to 1.73 ±0.07 mg/ml. These results are followed by the in silico study by determining the mechanism of inhibition and the interactions carried out with the amino acids of the active site of the AChE, molecular docking gave the same results as the in vitro studies with distances of 0,7Å to 2,1 Å for the studied molecules (lepidin B, quercetin and donepezil).

Keywords: acetyl cholinesterase; inhibition; IC₅₀; phenolic compounds; alkaloids; terpenes; molecular docking; Alzheimer's disease.

ملخص

يدخل عملنا في سياق البحث عن مثبطات جديدة لأنزيم الأستيل كولين استراز الذي يعتبر هدف علاجي مثبت في معالجة مرض الزهايمر. من هذا المنطلق، إختبرنا عملية تثبيط الأستيل كولين استراز من قبل العديد من المستخلصات الطبيعية والجزئيات النقية. في المرحلة الأولى، استخلصنا المركبات الفينولية، التيربينات والقلويدات من بذور حب الرشاد. أظهرت النتائج أنها تحتوي على كميات معتبرة من هذه المركبات. في المرحلة الثانية، قمنا بدراسة تأثيراتهم المثبطة لعمل الأستيل كولين استراز، وأكدت النتائج قدرتهم على تثبيط الانزيم مع قيم IC₅₀ تتراوح بين 0.04 ± 0.59 مغ/مل إلى 1.73 ± 0.07 مغ/مل. ويرافق هذه النتائج دراسة بيومعلوماتية من خلال تحديد آلية التثبيط والتفاعلات التي أجريت مع الأحماض الأمينية الموجودة في الموقع الفعال للأستيل كولين استراز، وقدم الإرساء الجزيئي نفس النتائج كما هو الحال في الدراسات المخبرية بمسافات تتراوح ما بين 0.7 إلى 2.1 أنغستروم للجزئيات المدروسة (ليبيدين ب، الكيرسيتين و الدونيببازيل).

الكلمات المفتاحية : أستيل كولين استراز؛ تثبيط؛ IC₅₀؛ مركبات فينولية؛ قلويدات؛ تربينات؛ إرساء جزيئي؛ مرض الزهايمر.