



HAL
open science

Conception de ligands inhibiteurs de MT5-MMP (MMP-24) : implication dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

Johanna Giovannini

► **To cite this version:**

Johanna Giovannini. Conception de ligands inhibiteurs de MT5-MMP (MMP-24) : implication dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02452841

HAL Id: dumas-02452841

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02452841>

Submitted on 23 Jan 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

Pour obtenir le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Conception de Ligands Inhibiteurs de MT5-MMP (MMP-24).
Implication dans le Traitement de la Maladie d'Alzheimer.**

Présentée par
Johanna GIOVANNINI

**Soutenue publiquement le 16 octobre 2019
devant le jury composé de**

M. Ronan BUREAU	Professeur à l'Université de Caen Normandie	Président du jury
Mme. Anne Sophie VOISIN-CHIRET	Professeur à l'Université de Caen Normandie, Docteur en Pharmacie	Examineur
M. Antoine MORICE	Docteur en Pharmacie à Bayeux	Examineur

Thèse dirigée par le Pr. Ronan BUREAU



LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GAUDUCHON Pascal Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Biologie cellulaire
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
RAULT Sylvain Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Chimie thérapeutique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale



MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique - HDR

Biochimie, Toxicologie

BOUET Valentine - HDR

Physiologie, Pharmacologie

CAILLY Thomas - HDR

Chimie bio-inorganique, Chimie organique

DENOYELLE Christophe - HDR

Biologie cellulaire et moléculaire,

Biochimie, Cancérologie

DHALLUIN Anne

Bactériologie, Virologie, Immunologie

ELDIN de PECOULAS Philippe - HDR

Parasitologie, Mycologie médicale

GROO Anne-Claire

Pharmacie galénique

KIEFFER Charline

Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) - HDR

Biologie clinique

LAPORTE-WOJCIK Catherine

Chimie bio-inorganique

LEBAILLY Pierre - HDR

Santé publique

LECHEVREL Mathilde - HDR

Toxicologie

LEGER Marianne

Physiologie, Pharmacologie

LEPAILLEUR Alban - HDR

Modélisation moléculaire

N'DIAYE Monique

Parasitologie, Mycologie médicale,

Biochimie clinique

PAIZANIS Eleni

Physiologie, Pharmacologie

PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima

Chimie organique et thérapeutique

POTTIER Ivannah

Chimie et toxicologie analytiques

PREVOST Virginie - HDR

Chimie analytique, Nutrition, Education

thérapeutique du patient

QUINTIN Jérôme

Pharmacognosie

RIOULT Jean-Philippe

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

SINCE Marc

Chimie analytique

VILLEDIEU Marie - HDR

Biologie et thérapies innovantes des

cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie

Anglais



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé
Faculté des Sciences Pharmaceutiques

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume

Pharmacie clinique

SEDILLO Patrick

Pharmacie officinale

RICHARD Estelle

Pharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Avant-Propos

Le manuscrit proposé ici a été réalisé à la suite de mon stage de Master 2 Recherche « Conception du Médicament », intégré au parcours Recherche de mes études de Pharmacie à l'Université de Caen. Ainsi ce manuscrit s'inscrit dans la continuité de ce stage et se veut être une version approfondie de mon mémoire de stage, avec notamment une mise en contexte de mes travaux de stage au regard du monde de la Recherche dans le domaine Pharmaceutique et une mise en lumière de mon approche adoptée au sein de la démarche précoce de conception de nouveaux principes actifs.

Ce stage a été réalisé au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie sous la supervision du Pr. Ronan Bureau. C'est donc naturellement que j'ai demandé au Pr. Ronan Bureau d'être mon directeur de thèse d'Exercice pour cette dernière étape de mes études de Pharmacie.

Ce manuscrit, au-delà de ma thèse d'Exercice de Pharmacie, se veut être utilisable également par des lecteurs qui souhaiteraient s'initier au développement précoce de principes actifs en Chémoinformatique. Ainsi, de nombreux termes techniques et scientifiques sont définis et réunis dans les deux glossaires proposés au début des Parties I et II. Enfin la Partie III, partie expérimentale réalisée au CERMN, se veut également être un exemple d'application des principes explicités au cours du Manuscrit.

Remerciements

Je profite de ce manuscrit de thèse d'exercice pour remercier tous les personnes et organisations qui m'ont permis de réaliser mes études de pharmacie dans les meilleures conditions.

Tout d'abord je remercie le Pr. Ronan Bureau d'avoir été mon directeur de thèse pour cette étape finale de mes études de Pharmacie. Je remercie également les membres du jury, le Pr. Anne Sophie Voisin-Chiret et le Dr. Antoine Morice de me faire l'honneur de juger mon travail.

Je remercie également tout le corps enseignant de la faculté des Sciences Pharmaceutiques de Caen pour les enseignements dont j'ai pu bénéficier au cours de mes 6 années d'étude.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements aux deux pharmacies qui m'ont initiée et formée au métier de Pharmacien : la Pharmacie du Pont Saint-Jean à Bayeux et la Pharmacie Couetoux du Tertre à Lessay. Merci à Pierre Villedieu, Antoine Morice, Christine Morice, Mathilde Riembault, Laurent Couetoux du Tertre et Sophie Couetoux du Tertre.

Je n'oublie pas non plus toutes les structures qui m'ont accueillie en stage et ont contribué à ma formation et à mon orientation vers le parcours Recherche : le CERMN, l'équipe COMETE et l'équipe ANTICIPE. Merci au Dr. Alban Lepailleur, au Dr. Rachel Asselot, au Pr. François Dauphin, au Pr. Thomas Fréret, au Dr. Clémentine Lemarchand et au Pr. Pierre Lebailly.

Enfin qu'auraient été mes années d'études sans les personnes qui ont été à mes côtés jour après jour ? Ainsi, même si une ligne de remerciement n'est rien comparée à ce que vous m'apportez :

Je remercie mes parents, mes alliés de toujours, merci d'être là ! J'espère que vous continuerez à être avec moi dans toutes mes aventures.

Je remercie Isidore, qui a rejoint mon chemin pendant la dernière année : puisse notre parcours durer encore !

Je remercie mes compagnons de la faculté : Anaïs, Chloé et Matthieu. Merci Anaïs d'avoir été mon binôme en cours, en TP mais également pour tout le reste ! Merci Matthieu pour toute ta sincérité ! Merci Chloé, ma partenaire pour tout ! Merci pour ces moments ! A nos grands moments tous les quatre au RU, à la BU, à la cafet' Pharma et ailleurs !

Je remercie Valentin, mon compagnon de la grande filière Recherche ! Puissent nos difficultés en début de parcours nous avoir rendus meilleurs pour la suite de nos carrières !

Je remercie Dounia, mon amie de longue date, plus de la moitié de notre vie côte à côte ! De l'Institution Saint Joseph au PFRS, et aujourd'hui encore toutes les deux dans les études, mais bientôt la France comptera dans ses rangs un excellent chirurgien ORL et je serai là pour t'admirer ! Merci de ton soutien sans faille, et vivement la suite de nos aventures !

Laura et Pauline, vous aussi vous êtes là depuis l'Institution Saint Joseph : merci d'être encore là !

J'adresse également mes remerciements aux inoubliables membres de la Familia : Ségolène, Raphaël, Cédric. De l'Institution Sainte Marie à aujourd'hui... Puisse notre Familia durer encore !

Enfin je porte une pensée toute particulière à Romain Rizzo. Romain tu n'es plus là pour lire ces mots mais je sais que tu entends mes remerciements. Merci d'avoir été toi et regarde, j'ai écouté tes conseils : je suis restée à Caen ! On se retrouvera.

Sommaire

Liste des abréviations utilisées	1
Index des Figures	3
Index des tableaux	4
Introduction	5
Partie I Métalloprotéases Matricielles et Maladie d'Alzheimer	9
Glossaire des termes techniques employés dans la Partie I.....	13
Les Métalloprotéases Matricielles	17
<i>Nomenclature et classification des MMP</i>	17
<i>Structure des MMP</i>	18
<i>Mécanisme catalytique des MMP</i>	20
<i>Inhibition de l'activité des Métalloprotéases matricielles</i>	21
<i>Implication des MMP dans les maladies neurodégénératives</i>	24
Vieillesse et mémoire	27
<i>La mémoire, anatomie et classification</i>	28
<i>La Maladie d'Alzheimer</i>	29
Conclusion et Perspectives de la Partie I.....	37
Partie II Place de la Modélisation Moléculaire dans la Conception de Nouveaux Principes Actifs	39
Glossaire des termes techniques employés dans la Partie II	43
Généralités sur la Conception de Nouveaux Médicaments.....	49
<i>Démarche générale de Drug Design</i>	49
Implication de la Chémoinformatique dans la Conception de Nouveaux Médicaments.....	51
<i>La Chémoinformatique, une discipline récente en évolution</i>	51
<i>Principes appliqués en Modélisation Moléculaire</i>	52
<i>Méthodologie en Modélisation Moléculaire</i>	52
Contexte de la Conception de Ligands Inhibiteurs de MMP-24 au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie	65
Conclusion et Perspectives de la Partie II	67
Partie III Démarche de Conception de Ligands Inhibiteurs de MMP-24 .69	
Glossaire des termes techniques employés dans la Partie III.....	73
Projet "Inhibition de MMP-24" entrepris au CERMN.....	75

Etude structurale du site catalytique de MMP-24	76
Etude des hypothèses de liaison au site catalytique.....	77
<i>Méthodologie</i>	77
<i>Résultats</i>	78
Limites des expérimentations menées	81
<i>Hypothèses de liaison Ligand-Cible</i>	81
<i>Sélectivités des ligands pour MT5-MMP en regard de MT1-MMP</i>	81
<i>Etudes de Relations Structure-Activité</i>	82
Conclusion et Perspectives de la Partie III	83
Conclusion	85
Annexes	87
Annexe n° 1 : Nomenclature des Enzymes	90
Annexe n° 2 : Liste des MMP identifiées à ce jour	93
Annexe n° 3 : Rôles des MMP dans les maladies neurodégénératives	96
Annexe n° 4 : Mini Mental State Examination	97
Annexe n° 5 : Voies de signalisation liées à la Maladie d'Alzheimer	98
Annexe n° 6 : Recommandations Vidal® pour la prise en charge de la Maladie d'Alzheimer	99
Annexe n° 7 : Test de l'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité inhibitrice de MT5-MMP et MT1-MMP des composés synthétisés au CERMN	100
Annexe n° 8 : Les <i>Zinc Binding Groups</i> (ZBG) les plus fréquemment retrouvés ...	101
Annexe n° 9 : Choix d'une conformation de MT5-MMP et MT1-MMP.....	103
Annexe n° 10 : Poster.....	104
Bibliographie	105

Liste des abréviations utilisées

A β	β -amyloïde
AA	Acide Aminé
ACh	AcétylCholine
AChE	AcétylCholinEstérase
AChEI	<i>AcetylCholinEsterase Inhibitor</i> / Inhibiteur de l'AcétylCholinEstérase
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APP	Protéine Précurseur de l'Amyloïde
BACE	<i>β-site APP Cleaving Enzyme</i> / Enzyme Clivant l'APP au site β
BuChEI	<i>ButyrylCholinEsterase Inhibitor</i> / Inhibiteur de la ButyrylCholinEstérase
CTF	<i>Carboxy-Terminal Fragment</i> / Fragment Carboxy-Terminal
Da	Dalton
FAD	<i>Familial Alzheimer's Disease</i> / Maladie d'Alzheimer d'origine Familiale
FEP	<i>Free Energy Perturbation</i> / Perturbation de l'Energie Libre
HAS	Haute Autorité de Santé
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice 50
K _D	Constante de Dissociation
K _I	Constante d'Inhibition
MA	Maladie d'Alzheimer
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	MétalloProtéase Matricielle
MMPi	Inhibiteur de MétalloProtéase Matricielle
MMSE	Mini Mental State Examination / Mini Examen de l'Etat Mental
MT-MMP	MétalloProtéase Matricielle TransMembranaire
PDB ID	<i>Protein Data Bank Identifier</i>

PRCG	<i>Polak-Ribiere Conjugate Gradient</i> / Gradient Conjugué de Polak-Ribière
RSA	Relation Structure Activité
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SPMC	<i>Systematic Pseudo-Monte Carlo</i>
sAPP α	APP α soluble
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases</i> / Inhibiteurs Tissulaires des MétalloProtéases
ZBG	<i>Zinc Binding Group</i> / Groupement se liant au Zinc
3D	Trois Dimensions
α 2M	α ₂ -Macroglobuline

Index des Figures

Figure 1. Représentation schématique de l'organisation structurale des MMP (D'après Brkic et Al., 2015) ¹⁰	19
Figure 2. Mécanisme catalytique des MMP (D'après Sagi, Gaffney, 2015) ¹²	21
Figure 3. Exemple de structure des MMPi les plus célèbres.	23
Figure 4. Représentation schématique des clivages subis par l'APP d'intérêt dans la MA, adaptée de la publication de Willem et Al. Nature, 2015.	26
Figure 5. Changements cérébraux et neuronaux classiquement associés à la Maladie d'Alzheimer (Représentation adaptée de Jin, JAMA, 2015, 313) ⁴⁴	30
Figure 6. Représentation schématique des causes moléculaires associées à la MA (D'après Cavalli et Al., 2008).....	32
Figure 7. Frise chronologique proposée par Golde et Al., Neurodegeneration, 2018, exposant un calendrier d'intervention idéal pour remédier aux causes multiples de la MA.....	35
Figure 8. Représentation schématique d'un profil d'énergie potentielle associé aux conformations d'une molécule.....	54
Figure 9. Exemple d'un pharmacophore à 3 motifs avec les données de distances et d'angles entre les motifs.....	60
Figure 10. Représentation tridimensionnelle du complexe Batimastat_MT3-MMP (données de coordonnées provenant du complexe PDB ID 1RM8). En vert : le Batimastat. La zone orangée correspond à la surface moléculaire du site actif de MT3-MMP.....	62
Figure 11. A gauche : Modélisation 3D du site catalytique de MT3-MMP co-cristallisé avec le Batimastat (PDB ID 1RM8). A droite : Modélisation par homologie de séquence de MT5-MMP à partir de MT3-MMP et docking du site actif avec le Batimastat	65
Figure 12. Démarche générale effectuée au CERMN pour la conception de ligands inhibiteurs de MMP-24.....	75
Figure 13. Représentation schématique des résidus constituant les zones clés du site catalytique de MMP-24.....	76
Figure 14. Schéma d'interaction protéase-substrat illustrant la nomenclature des zones d'interaction clés	76
Figure 15. Représentations 3D et 2D - Hypothèse de liaison n°1 (Orange -> Hit ; Bleu ciel -> Résidus du site catalytique ; Bleu -> Surface de liaison)	78

Figure 16. Modifications structurales suggérées après établissement de la première hypothèse de liaison	78
Figure 17. Représentations 3D et 2D - Hypothèse de liaison n°2 (Rose -> Hit ; Bleu ciel -> Résidus du site catalytique ; Bleu -> Surface de liaison)	79
Figure 18. Modifications structurales suggérées après établissement de la deuxième hypothèse de liaison	79
Figure 19. Représentations 3D et 2D - Hypothèse de liaison n°3 (Orange -> Hit ; Bleu ciel -> Résidus du site catalytique ; Bleu -> Surface de liaison)	80
Figure 20. Modifications structurales suggérées après établissement de la 3ème hypothèse de liaison	81

Index des tableaux

Tableau 1. Résumé des médicaments actuellement proposés sur le marché dans la Maladie d'Alzheimer.	33
Tableau 2. Liste référençant quelques bases de données de cibles biologiques et de maladies communément utilisées en Modélisation Moléculaire.	57
Tableau 3. Liste référençant quelques bases de données de composés chimiques communément utilisées en Modélisation Moléculaire.	58
Tableau 4. Exemples de groupements fonctionnels associés à des motifs pharmacophoriques, indiqué par la coloration orange.	59

Introduction

La Maladie d'Alzheimer (MA), ou démence sénile la plus répandue dans le Monde et décrite pour la première fois depuis plus d'un siècle, ne dispose aujourd'hui d'aucun traitement curatif sur le marché. Les caractéristiques de cette pathologie montrent, au niveau cérébral, des désordres protéiques parmi lesquels l'agrégation de peptides β -amyloïdes au niveau extracellulaire et l'agrégation de la protéine Tau au niveau intracellulaire figurent comme étant les éléments-clés du diagnostic post-mortem. En ce qui concerne l'agrégation des peptides β -amyloïdes, le mécanisme classiquement décrit fait intervenir la β -sécrétase et la γ -sécrétase. De nombreux projets de recherche de nouveaux principes actifs anti-Alzheimer ayant pour cible ces protéines se sont révélés infructueux tant l'implication de ces sécrétases semble s'étendre au-delà de la métabolisation de la Protéine Précurseur de l'Amyloïde (APP). Cependant, récemment, en 2015, une nouvelle voie de métabolisation de l'APP a été démontrée, et son implication semble cette fois ne se limiter qu'à la dégradation de l'APP au niveau cérébral, amenant à la communauté des chercheurs un regain d'intérêt pour la conception de nouveaux principes actifs intervenant dans la métabolisation de l'APP. Cette nouveauté tient de la découverte d'une autre sécrétase, nommée « η -sécrétase », pour laquelle il a été démontré son rôle dans la dégradation de l'APP avec, *in fine*, la sécrétion de peptides neurotoxiques altérant la cognition de modèles *in vivo* de la MA. De plus, son inhibition par *knock-out* de gène a démontré sur ces modèles des effets pro-cognitifs, confirmant ainsi l'intérêt majeur de la η -sécrétase pour de potentiels nouveaux principes actifs d'intérêt dans le traitement de la MA. Enfin, il a été montré que la η -sécrétase est une protéine appartenant à la famille des Métalloprotéases Matricielles Transmembranaires (MT-MMP), et ses nomenclatures officielles dans le cadre de cette famille de protéines sont : MMP-24 et MT5-MMP.

C'est dans ce contexte que depuis 2016, le Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) œuvre à concevoir, synthétiser et tester des ligands inhibiteurs de MM5-MMP. En effet, le Pr. Dallemagne et le Pr. Rochais ont, en collaboration avec l'équipe du Pr. Khrestchatisky et du Pr. Rivera, initié un projet intitulé « *Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs de MT5-MMP d'intérêt potentiel dans la Maladie d'Alzheimer* ». C'est un projet multidisciplinaire qui a permis d'unir plusieurs plateformes et plusieurs chercheurs à savoir :

- La plateforme Chémoinformatique du CERMN, dirigée par le Pr. Bureau et avec la participation au projet du Dr. Lepailleur, du Dr. Métivier, du Dr. Denis et de Mme Saidoun ;
- La plateforme Chimie Organique et Médicinale du CERMN, dont les travaux concernant ce projet ont été dirigés par les Pr. Dallemagne et Rochais et ont fait l'objet d'un stage postdoctoral du Dr. Lalut et font actuellement l'objet de la thèse d'université de Mme Zipfel ;
- La plateforme Screening et Drugabilité du CERMN, dirigée par le Pr. Malzert-Fréon et avec la participation au projet de Mme Davis ;
- La plateforme Chimiothèque du CERMN, avec la participation au projet de Mme Suzanne ;
- L'Institut de Neurophysiologie et de Psychophysiologie de Marseille, dirigé par le Pr. Khrestchatsky et avec la participation au projet du Pr. Rivera et du Dr. Baranger.

J'ai ainsi pu participer à ce projet multidisciplinaire lors de mon stage de Master 2 Recherche au sein de la plateforme Chémoinformatique sous la direction du Pr. Ronan Bureau.

Le manuscrit présenté ici se propose de faire un exposé sur les différents aspects de cette découverte, et montre aussi une démarche rationnelle de développement précoce *in silico* de nouveaux ligands d'intérêt contre la MA. Ce manuscrit est divisé en trois parties dans lesquelles sont relatées respectivement :

- Les connaissances acquises sur la famille des Métalloprotéases Matricielles et sur la MA,
- L'utilité de la Chémoinformatique dans les démarches de conception de nouveaux médicaments,
- Une démarche de conception de nouveaux ligands assistée par Modélisation Moléculaire.

Voici le plan proposé dans ce manuscrit :

Partie I	Métalloprotéases Matricielles et Maladie d'Alzheimer
Partie II	Place de la Modélisation Moléculaire dans la Conception de Nouveaux Principes Actifs
Partie III	Démarche de Conception de Ligands Inhibiteurs de MMP-24

Partie I
Métalloprotéases Matricielles et Maladie
d'Alzheimer

Partie I

Métalloprotéases Matricielles et Maladie d'Alzheimer

Ce premier chapitre a pour vocation de faire un point sur les connaissances acquises sur les Métalloprotéases Matricielles (MMP) et de mettre en lumière leur implication dans les phénomènes neurodégénératifs et notamment dans la maladie d'Alzheimer (MA). Ensuite, pour comprendre au mieux l'implication et l'importance de ce type de protéines dans la MA, un point sur le vieillissement, la mémoire et un court exposé sur la MA est proposé. Voici le plan que suivra cette première Partie :

Partie I – Métalloprotéases Matricielles et Maladie d'Alzheimer

Glossaire des termes techniques

Les Métalloprotéases Matricielles

Nomenclature et classification des MMP

Structure des MMP

Mécanisme catalytique des MMP

Inhibition de l'activité des MMP

Inhibition endogène des MMP

Inhibiteurs synthétiques des MMP

Implication des MMP dans les maladies neurodégénératives

Vieillessement et Mémoire

La mémoire, anatomie et classification

La Maladie d'Alzheimer

Physiopathologie

Causes de la MA

Traitements disponibles actuellement dans la MA

Vers des traitements curatifs de la MA ?

Importance du diagnostic précoce de la MA

Conclusion de la Partie I

Partie I

Métalloprotéases Matricielles et Maladie d'Alzheimer

Glossaire des termes techniques employés dans la Partie I

A

Affinité : Désigne la force de l'interaction entre une molécule et une cible, et est exprimée à travers l'expression de concentrations (IC_{50} , K_I ; $K_D...$). Elle reflète la somme des énergies nécessaires au maintien de l'interaction dans le temps.

Agnosie : Troubles de la reconnaissance visuelle et/ou auditive.

Amnésie : Troubles de la mémoire.

Aphasie : Troubles du langage. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'individu éprouve des difficultés à trouver le mot approprié et se voit dans l'obligation d'utiliser des périphrases.

Apraxie : Troubles gestuels associés aux mouvements volontaires.

C

ChEMBL; www.ebi.ac.uk/chembl/ : Il s'agit d'une base de données chimique de molécules bioactives, contenant notamment leurs propriétés pharmacologiques. Cette base de données est gérée par l'*European Bioinformatics Institute* (EBI).

Cognition : Processus mental par lequel un organisme devient conscient ou acquiert des connaissances. Ce processus se rapporte à la mémoire, le langage, le raisonnement, l'apprentissage, la perception ou l'attention.

D

Démence : « La démence est un syndrome dans lequel on observe une dégradation de la mémoire, du raisonnement, du comportement et de l'aptitude à réaliser les activités quotidiennes. »^a

E

Espèces réactives de l'oxygène : Molécules ou ions formés par la réduction mono-électronique incomplète de l'oxygène. Les espèces réactives de l'oxygène incluent les

^a Définition d'après l'OMS <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/fr/> (consulté le 15 mai 2017)

dérivés superoxydes, les peroxydes, des radicaux hydroxyles et les acides hypochloriques. Ils contribuent à l'activité antimicrobienne des phagocytes, à la régulation des signaux de transduction et d'expression de gène et aux dommages oxydatifs des acides nucléiques, des protéines et des lipides.

ExPASy : Acronyme de *Expert Protein Analysis System* ; Il s'agit d'une ressource fournie par le *Swiss Institute of Bioinformatics* permettant d'accéder à des données de protéomique, génomique, phylogénétique et transcriptomique. L'outil ENZYME fournit notamment la nomenclature détaillée des enzymes et leur numérotation selon l'*Enzyme Commission*.

H

Hydrolase : Enzyme catalysant une réaction d'hydrolyse d'un substrat (soit son clivage en présence d'une molécule d'eau).

I

Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases : Il s'agit d'une famille de protéases régulant l'activité des métalloprotéases matricielles. Ils sont particulièrement impliqués dans la modulation de la protéolyse des composés de la matrice extracellulaire, notamment pendant les remodelages tissulaires et les processus inflammatoires.^b

M

Matrice extracellulaire : Substance organisée en réseau située dans l'espace extracellulaire et fonctionnant en association avec la membrane basale de la surface cellulaire. Elle favorise la prolifération cellulaire et fournit une structure de support à laquelle adhèrent les cellules ou les lysats cellulaires. De plus, elle est responsable de la réorganisation des tissus lors des phénomènes de morphogénèse ou différenciation cellulaire. La matrice extracellulaire est une association composée de 3 types de molécules : fibres (collagène et élastine), glycoprotéines (responsables de l'adhérence cellulaire) et polysaccharides (formant un gel de remplissage de la matrice extracellulaire).

Mémoire : "Capacité de se rappeler des expériences passées"^c

^b Définitions d'après l'outil HeTOP (*Health Terminology Ontology Portal*) du CISMEF (*Catalogue et Index des Sites Médicaux de langue Française*) disponible sur hetop.eu (consulté le 12 décembre 2017)

^c D'après http://lecerveau.mcgill.ca/flash/d/d_07/d_07_p/d_07_p_tra/d_07_p_tra.html (consulté le 16 mai 2018)

Métalloprotéases matricielles : Famille de métallo-endopeptidases impliquée dans la dégradation des composés de la matrice extracellulaire.

Modèle 5xFAD : Modèle Murin de la Maladie d'Alzheimer disponible auprès du laboratoire Jackson Laboratory. Ces souris expriment 5 mutations liées à la forme Familiale de la Maladie d'Alzheimer (FAD) et développent très précocement (2 mois) des plaques amyloïdes puis des déficits cognitifs (4-6 mois).

P

Peptidase : Hydrolase catalysant le clivage de liaisons peptidiques. Les « endo »-peptidases se limitent au clivage de liaisons peptidiques présentes à l'intérieur d'une chaîne peptidique. Les « exo »-peptidases elles se limitent au clivage de liaisons peptidiques présentes entre le 1^{er} et le 2nd acide aminé ou présentes entre l'avant-dernier et le dernier acide aminé et libèrent l'acide aminé soit N-terminal soit C-terminal. Les « métallo »-peptidases possèdent un (ou plusieurs) cations métalliques au sein de la structure protéique.

Personne-temps : Terme utilisé en épidémiologie. Il s'agit d'une mesure qui « permet de connaître à la fois le nombre de personnes exposées et pour chacune d'elle la période de temps pendant laquelle elles sont exposées au risque au cours de la période d'observation. La personne-temps (PT) [...] est une évaluation du risque d'exposition des sujets dans une population donnée. »^d

Protein Data Bank ; www.rcsb.org/pdb/ : il s'agit d'un site public où sont déposées les coordonnées 3D de macromolécules (enzymes, récepteurs), libres ou complexées à un ligand.

Protéine tau : Protéine associée aux microtubules du cytosquelette particulièrement présente au niveau neuronal.

S

Sélectivité : Ratio entre deux affinités Ligand-Cible et permettant d'exprimer une préférentialité (d'une molécule ou d'un site d'interaction).

Structure-based drug design : Approche de conception de ligands basée sur l'analyse des interactions ligand-cible et la connaissance structurale de la cible.

^d Définition d'après le glossaire multilingue de la Banque de Données en Santé Publique asp.bdsp.ehesp.fr/Glossaire/ (consulté le 14 décembre 2017).

Substrate-based drug design : Approche de conception de ligands basée sur la connaissance structurale du substrat endogène de la molécule visée.

T

Test in silico : Désigne un essai effectué à l'aide d'un modèle informatique. Cela apporte alors une représentation informatique ponctuelle ou continue d'un système et/ou d'un processus physico-chimique.

Test in vitro : Désigne un essai effectué dans un environnement artificiel, en dehors de tout être vivant et visant à recréer tout ou une partie d'un organisme vivant.

Test in vivo : Désigne un essai effectué sur un organisme vivant.

U

Uniprot ; www.uniprot.org : Il s'agit d'une base de données publique visant à répertorier de manière systématique les séquences des protéines. Elle est gérée par la collaboration de l'European Bioinformatics Institute et du Swiss Institute of Bioinformatics.

Z

Zymogène : Précurseur d'une enzyme, dépourvu d'activité enzymatique.

Les Métalloprotéases Matricielles

Les Métalloprotéases Matricielles (MMP) sont des enzymes présentes au niveau de la matrice extracellulaire (MEC), et sont capables d'hydrolyser ou de réguler la totalité de ses composants protéiques.¹

Les rôles de la MEC sont multiples (maintien tissulaire, adhérence, migration et transport cellulaire, prolifération...), et par conséquent les implications physiologiques des MMP le sont tout autant. En effet, les MMP ont des rôles variés dans la modification de la MEC, et ce aussi bien au niveau physiologique (développement, morphogénèse, remodulation...) qu'au niveau pathologique (cancérogénèse, processus métastatiques, neurodégénération...). Elles sont également impliquées dans la maturation des facteurs solubles de la MEC tels que les cytokines, facteurs de croissance et chimiokines.²

La preuve de l'existence d'une activité protéolytique de la MEC fut apportée par Gross et Lapiere en 1962 lors de la découverte du processus de régression de la queue des têtards, étape de leur métamorphose.³ Il faut attendre 1977 pour que la première MMP humaine ne soit isolée à partir de cellules issues d'une tumeur de la peau par Bauer et. Al.⁴

Nomenclature et classification des MMP

Selon la nomenclature de l'*Enzyme Commission* (EC) classiquement adoptée pour les enzymes^e, les MMP sont numérotées **3.4.24**, ceci classant les MMP dans la famille des **hydrolases** (**3.**), puis dans la sous-famille des **peptidases** (**3.4**), et enfin dans le sous-type des **métallo-endopeptidases** (**3.4.24**).⁵

Il existe plus de 25 MMP différentes décrites chez l'homme, codées par des gènes différents et produites par de nombreux types cellulaires différents.⁶ Elles se différencient alors, outre leur séquence peptidique, par le type cellulaire responsable de leur synthèse, leur spécificité d'action sur des substrats moléculaires matriciels différents et les modalités de leur régulation.

^e Un classement détaillé est disponible sur l'outil ExPASy - *Expert Protein Analysis System* (Artimo et al., 2012), site tenu par le Swiss Institute of Bioinformatics <http://enzyme.expasy.org/enzyme-byclass.html> (consulté le 18/01/2018). Voir en Annexe n°1 : Nomenclature des Enzymes).

Structure des MMP

Les différentes MMP possèdent de nombreuses caractéristiques communes :

- Une structure homologue allant de 40 à 80% d'homologie en acides aminés ;
- Un atome de zinc dans le domaine catalytique de l'enzyme ;
- Une activité dépendante de la disponibilité du milieu en ions calcium Ca^{2+} ;
- Une synthèse et une sécrétion sous forme de zymogènes (nommés « proMMP ») ;
- Une capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire. Les différentes enzymes peuvent cliver chacune au moins un composant de la MEC.⁷

D'un point de vue structural strict, toutes les MMP possèdent au moins trois domaines : le prédomaine ou « peptide signal », le prodomaine et le domaine catalytique.

Le prédomaine est constitué d'une vingtaine de résidus hydrophobes. Il est nécessaire au transport intracellulaire des MMP jusqu'à la membrane cellulaire. Le prédomaine est rapidement éliminé après la sécrétion et est absent de la forme enzymatique active.

Le prodomaine est une séquence peptidique d'environ 80 acides aminés et comprenant notamment un résidu cystéine. Le groupement thiol de la cystéine, par son atome de soufre S, interagit avec le zinc Zn^{2+} du site catalytique, maintenant ainsi l'activité enzymatique sous forme zymogène (ou latente).⁸ Le clivage protéolytique du prodomaine, libérant ainsi l'atome de zinc du résidu cystéine, entraîne l'activation du site catalytique qui peut alors se lier à son substrat. On parle de « *cystein switch* ». ⁹

Le domaine catalytique, d'environ 170 acides aminés, est caractérisé par la présence d'un atome de zinc et celui-ci est maintenu par 3 résidus histidine. Cette liaison entre ces quatre partenaires est à la base d'une structure tridimensionnelle en forme de poche. Le site catalytique, commun à toutes les MMP, se présente alors comme une fissure peu profonde, séparant la MMP entre un sous-domaine « inférieur » et un sous-domaine « supérieur ».

La plupart des MMP ont un quatrième domaine en position carboxyterminale, liée au site catalytique par une charnière, chaîne polypeptidique hydrophobe dont la taille et la présence sont variables selon les MMP considérées. Le domaine C-terminal est homologue de la fibronectine et de l'hémopexine (on parle de l'« *Hemopexine like domain* »). C'est une chaîne polypeptidique de 210 résidus, stabilisé par un ion

Calcium Ca^{2+} . Il est impliqué dans la fonction de reconnaissance des substrats. Dans le cas des métalloprotéases matricielles transmembranaires (MT-MMP, *membrane-type matrix metalloproteinase*), le domaine hémopexine est suivi soit d'un domaine transmembranaire hydrophobe (MT-1, 2, 3 et 5), soit d'un pont inositol phosphate (MT4 et 6), permettant l'ancrage de l'enzyme à la surface de la cellule (voir Figure 1).

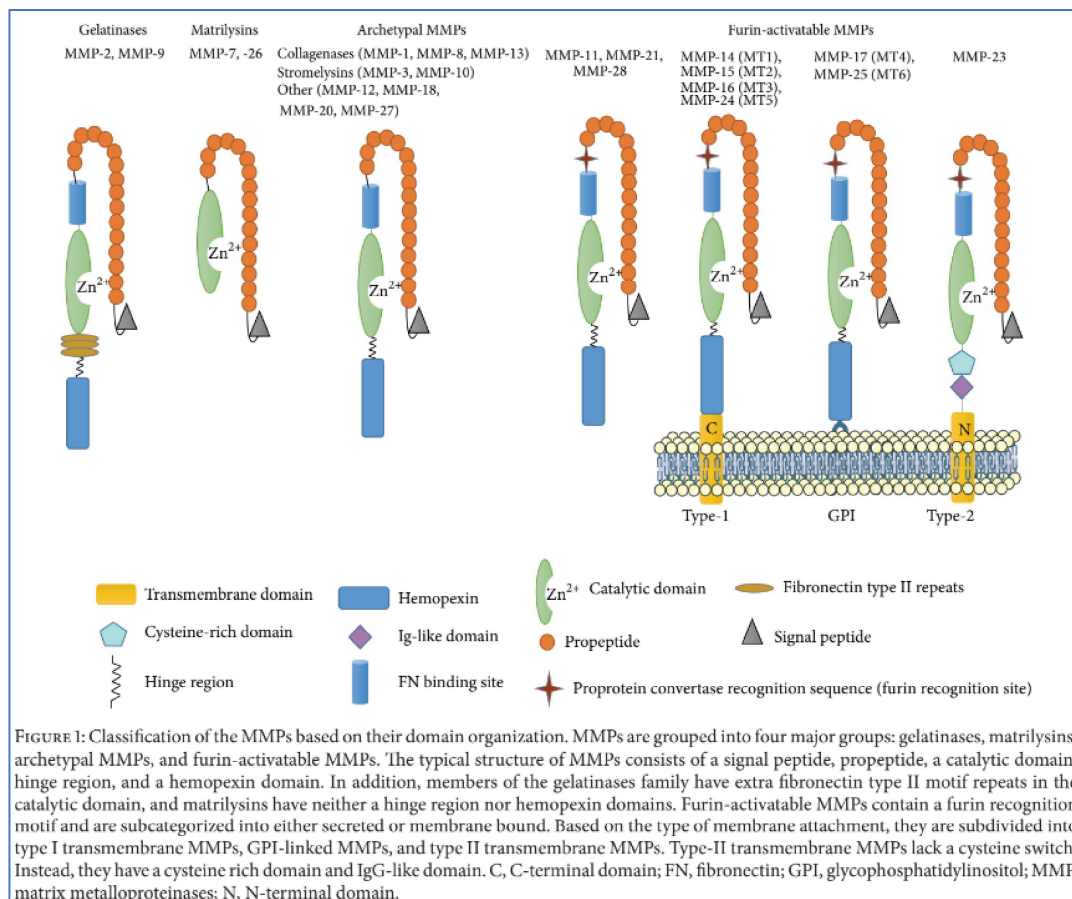


Figure 1. Représentation schématique de l'organisation structurale des MMP (D'après Brkic et Al., 2015)¹⁰

Parmi les classifications des MMP, on retrouve un classement en six groupes selon leurs affinités pour les substrats, leurs analogies de séquence et l'organisation de leurs domaines : matrilysines, collagénases, stromélysines, gélatinases, métalloprotéases matricielle transmembranaires (aussi dites « Membrane Type » ou MT-MMP) et autres (voir Annexe n°2 : Liste des MMP identifiées à ce jour).

- Les matrilysines sont les plus simples d'un point de vue structural car sont uniquement pourvues du peptide signal, du prodomaine et du domaine catalytique.
- Les collagénases, interviennent dans la dégradation du collagène, ceci entraînant la formation de gélatine pouvant être dégradée par les gélatinases.
- Les stromélysines hydrolysent des glycoprotéines et des protéoglycanes.

- Les gélatinases ont une activité protéolytique dont l'objet est le collagène dégradé, la gélatine.
- Les MT-MMP sont capables de dégrader de nombreux composants de la MEC. De plus, parmi les substrats des MT-MMP, on compte également des facteurs de croissance. Enfin, certaines MMP (notamment la MMP-2) sont activées par des MT-MMP.
- Les autres MMP forment un groupe de MMP hétérogène.

Mécanisme catalytique des MMP

Les implications variées des MMP dans différents processus physiopathologiques ont conduit à envisager ces protéines comme cibles de médicaments et, par conséquent, à concevoir des inhibiteurs de celles-ci. Ceci a donc impliqué de s'intéresser au mécanisme catalytique des MMP.

Ainsi, il est couramment admis qu'un résidu Glu (Acide Glutamique) coordonne par l'intermédiaire d'une molécule d'eau l'ion zinc catalytique avec 3 résidus Histidine (His). Lors de l'approche d'un substrat du site catalytique¹¹ (voir Figure 2) :

- La liaison peptidique du substrat, par l'intermédiaire de son carbonyle, s'approche de l'ion zinc catalytique ;
- La molécule d'eau coordonnant l'ion zinc catalytique donne un proton au résidu Acide Glutamique ;
- L'ion HO⁻ ainsi libéré attaque le carbone du carbonyle de la liaison peptidique du substrat ;
- Cette attaque génère un intermédiaire tétraédrique stabilisé par l'ion zinc catalytique ;
- Le résidu Acide Glutamique transfère alors son proton excédentaire vers l'azote de la liaison amide, provoquant un réarrangement de l'intermédiaire tétraédrique et une hydrolyse de la liaison peptidique.

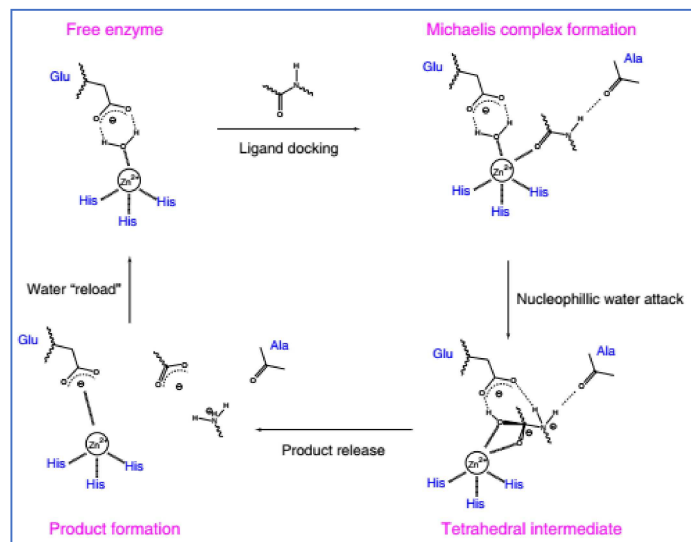


Figure 2. Mécanisme catalytique des MMP (D'après Sagi, Gaffney, 2015)¹²

Inhibition de l'activité des Métalloprotéases matricielles

L'inhibition de l'activité des MMP peut se réaliser à différents niveaux :¹³

- Régulation de l'expression génique: *via* des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. La régulation de l'expression génique, difficilement réalisable en thérapie, est cependant un moyen fiable et efficace de prouver l'implication d'une protéine d'intérêt dans un système donné par l'utilisation de modèles biologiques tels que des souches bactériennes ou des animaux génétiquement modifiés.
- Inhibition de l'activation pro-enzymatique: cela revient à inhiber la cascade d'activation des MMP avant libération de leur forme active.
- Activation de l'endocytose et de l'élimination: ici cela consiste à favoriser la métabolisation et l'élimination des MMP.
- Inhibition directe: pouvant se faire par protéolyse ou par inhibition structurale. Ce dernier niveau d'inhibition est celui visé lors de la recherche d'une inhibition de MMP dans un but thérapeutique.

Inhibition endogène des Métalloprotéases Matricielles

L'activité protéolytique des MMP est contrôlée précisément par leurs précurseurs et leurs inhibiteurs endogènes (α_2 -macroglobulines [au niveau sanguin] et inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP)).¹⁴

L' α_2 -macroglobuline (α_2M) est une glycoprotéine plasmatique capable d'inhiber la plupart des métalloprotéases en les emprisonnant par complexation. Le complexe formé est ensuite éliminé par endocytose.¹⁵

Les TIMP sont des protéines d'environ 190 AA. Les TIMP actuellement connus sont au nombre de 4 et ont une homologie de séquence de 40 à 50%.¹⁶ Chacun des quatre TIMP est capable d'inhiber la totalité des MMP, et ce plus ou moins efficacement.^{17,8} Leur inhibition des MMP procède de la formation de liaisons covalentes avec les résidus du site catalytique, bloquant ainsi l'accès des substrats à la poche contenant le zinc catalytique.⁸ Le système MMP/TIMP est régulé finement afin d'avoir un contrôle performant de la synthèse/dégradation de la MEC. Lors d'états pathologiques, l'équilibre est rompu, aboutissant à un désordre potentiel de la MEC au niveau du tissu concerné. En effet, différents membres du système MMP/TIMP sont exprimés dans les cellules du système immunitaire et du cerveau, et leur dérégulation provoque ainsi de sévères désordres, notamment d'ordre neuro-inflammatoire.¹⁸

Inhibiteurs synthétiques des Métalloprotéases Matricielles

Les MMP étant présentes à différents niveaux et associées à des états pathologiques tels que les arthrites rhumatismales et ostéoarthrites, les ulcérations chroniques, les phénomènes d'invasion tumorale, les lésions athéromateuses et les mécanismes neurodégénératifs, il a déjà été développé des inhibiteurs pharmacologiques des MMP.¹⁹

Les inhibiteurs synthétiques qui ont été développés ont vu leur approche de conception évoluer. En effet, les premiers inhibiteurs de MMP (MMPi) ont été conçus selon une approche de *substrate-based drug design*, alors que les derniers développés ont profité de l'amélioration des connaissances structurales sur les MMP pour être conçus selon une approche de *structure-based drug design*.^{*20}

Les premiers MMPi développés, de structure pseudo-peptidique, ont permis l'avènement de l'acide hydroxamique comme groupement chélateur du zinc (ou *Zinc-Binding Group, ZBG*) : Batimastat, Ilomastat, Marimastat (voir Figure 3). Ils se sont avérés fortement inhibiteurs de MMP mais dépourvus de sélectivité et souffrant d'une fragilité métabolique *in vivo*.²¹

Pour pallier à cette fragilité *in vivo*, des programmes de recherche ont été lancés pour développer des MMPi non peptidiques conservant l'acide hydroxamique comme ZBG. Cette démarche a notamment mis en lumière des composés porteurs d'un groupement sulfamide servant à orienter le ZBG d'une part, et des substituants interagissant avec d'autres résidus du site catalytique d'autre part, tel que l'exemple phare du composé CGS-27023A (voir Figure 3). Ce dernier s'est avéré être un MMPi à large spectre développé contre les pathologies cancéreuses mais qui s'est également

avéré avoir des effets secondaires marqués de troubles musculo-squelettiques.²² Ainsi, de nombreux dérivés remplaçant l'acide hydroxamique par d'autres ZBG ont été conçus et développés, mais faisant toujours preuve de manque de sélectivité.²³ C'est pourquoi des programmes de développement de MMPi se sont intéressés à des molécules ne chélatant pas le zinc catalytique. Ceci a mené au succès du développement d'inhibiteurs de MMP-13, une MMP non transmembranaire impliquée dans des désordres articulaires type arthrite.^{24,25,26} Cependant, il n'a, à ce jour, pas été mis en lumière des composés synthétiques capables d'inhiber sélectivement d'autres MMP que la MMP-13.

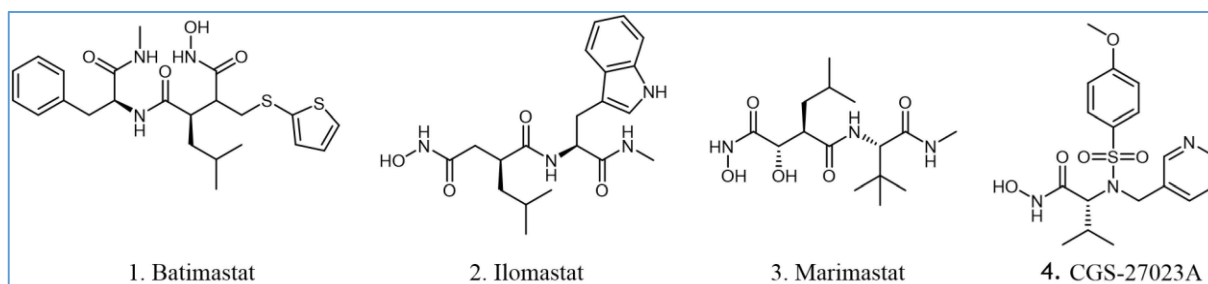


Figure 3. Exemple de structure des MMPi les plus célèbres.

Ainsi, le développement d'inhibiteurs sélectifs des MMP reste complexe. En effet, du fait de la similarité de structure entre les MMP et de leur multiple localisation, leur ciblage sélectif est pointu et représente toujours un défi.

En bref,

Les Métalloprotéases Matricielles (MMP)

- 19 MMP différentes répertoriées.
- *Numérotation de l'Enzyme Commission :*
 - 3. 4. 24
 - Hydrolases Peptidases Métallo-endopeptidases
- *Localisation :* Matrice extracellulaire (MEC)
- *Rôles :* Régulation de la totalité des composants de la MEC
 - *Implication physiologique :* développement
 - *Implication pathologique :* cancérogénèse, phénomènes inflammatoires, neurodégénération
- *6 groupes :* Collagénases, Matrilysines, Stromélysines, Gélatinases, Transmembranaires, Autres.
- *Structure :* Peptide signal + Prodomaine + Domaine catalytique
- *Inhibition synthétique :* généralement inhibition large spectre

Implication des MMP dans les maladies neurodégénératives

Avec le vieillissement vient la dégénérescence du système immunitaire, favorisant peu à peu les phénomènes proinflammatoires. Des publications récentes font état d'une implication des MMP dans divers processus neurodégénératifs¹⁰ mais aussi explicitement dans la MA.^{27,f}

En effet, le vieillissement est caractérisé, entre autres, par des déséquilibres entre les différents facteurs protecteurs et facteurs de risque de l'intégrité d'un individu aussi bien au niveau cellulaire que tissulaire. La dégénérescence du système immunitaire et l'inflammation sont ainsi les deux caractéristiques les plus proéminentes du vieillissement du système nerveux central. Ces deux dommages, au niveau du système nerveux central, s'expriment par :

- Des dystrophies au niveau de la microglie, avec une augmentation des cellules gliales, support de l'immunité du système nerveux central ;
- Des sécrétions accrues de facteurs pro-inflammatoires de la famille des cytokines, dont principalement des interleukines ;

^f Pour un tableau récapitulatif de l'implication des MMP dans les maladies neurodégénératives, se référer à l'annexe n°3 : Rôles des MMP dans les maladies neurodégénératives.

- Une accumulation de radicaux libres, dont l'élimination n'est plus assurée par les mécanismes physiologiques.

Ainsi le vieillissement du système nerveux central est fortement associé à un remaniement de l'espace extracellulaire. Des données font désormais état d'un déséquilibre entre MMP/TIMP, notamment impliquant le TIMP-2,²⁸ la MMP-2,²⁹ la MMP-9³⁰ et la MMP-12,³¹ tous ces déséquilibres concourant à un état proinflammatoire et neurodégénératif du système nerveux central.

Concernant les désordres neurodégénératifs, la Maladie d'Alzheimer (MA) figure parmi les plus connus. Dans cette maladie faisant état d'atrophie cérébrale (*pour une description plus précise de la physiopathologie de cette maladie, voir le paragraphe « Vieillesse et Mémoire » de la Partie I*), la protéine β -amyloïde, une protéine extracellulaire, fait état d'une métabolisation et d'une agrégation toutes les deux anormales. En effet, la protéine β -amyloïde constitue, avec la protéine Tau, l'un des désordres protéiques majeurs de la maladie d'Alzheimer.

Dans la maladie d'Alzheimer, la Protéine Précurseur de l'Amyloïde (APP), une protéine transmembranaire présente au niveau neuronal, subit une métabolisation qui diffère de sa métabolisation physiologique. En effet, le clivage de l'APP mène, en condition pathologique, à l'agrégation de peptides β -amyloïdes ($A\beta$) issus du clivage de l'APP en plaques séniles, insolubles et neurotoxiques, et ce particulièrement au niveau des neurones cholinergiques du prosencéphale, expliquant ainsi les désordres cognitifs observés dans la MA (*pour une description plus précise des phénomènes cognitifs intervenant dans cette pathologie, se référer au paragraphe « Vieillesse et Mémoire » de la Partie I*).

Cette accumulation de peptides $A\beta$ agrégés en plaques insolubles fait suite à une cascade d'événements cellulaires et protéiques plus ou moins explicités.³² L'APP peut être clivée par différentes sécrétases, conduisant à différents peptides dont la nature sur la cognition* diffère. Ainsi, l'APP peut être clivée par (voir Figure 4) :

- Une α -sécrétase : le clivage conduit à la formation d'un peptide appelé sAPP α (APP α soluble), qui aurait *a priori* des propriétés neuroprotectrices ;
- Une β -sécrétase, nommée BACE (β -site APP cleaving enzyme) : le clivage conduit à la formation du précurseur du peptide $A\beta$.

Une autre voie de métabolisation de l'APP, relevant du clivage de l'APP par une autre sécrétase, la η -sécrétase, a été mise en lumière en 2015.³³

La η -sécrétase pourrait être une métalloprotéase matricielle (MMP) (voir paragraphe ci-après).³⁴ Le clivage de l'APP par la η -sécrétase libère un fragment nommé CTF- η (Carboxy terminal Fragment- η), ensuite clivé par les sécrétases β et α en peptides A η - β et A η - α (voir Figure 4). Par ailleurs, il a été noté dans des essais *in vivo* d'inhibition de la β -sécrétase une accumulation de fragments CTF- η et de peptides A η - α au niveau hippocampique. Ces deux espèces protéiques sont liés à une activité neuronale hippocampique réduite.³³ Or, l'hippocampe et les lobes temporaux sont essentiels à la consolidation de la mémoire à long terme.³⁵ Ainsi il apparaît que le ciblage de la η -sécrétase (notamment son inhibition) dans le cadre de la MA est une cible nouvellement exploitable pour son traitement.

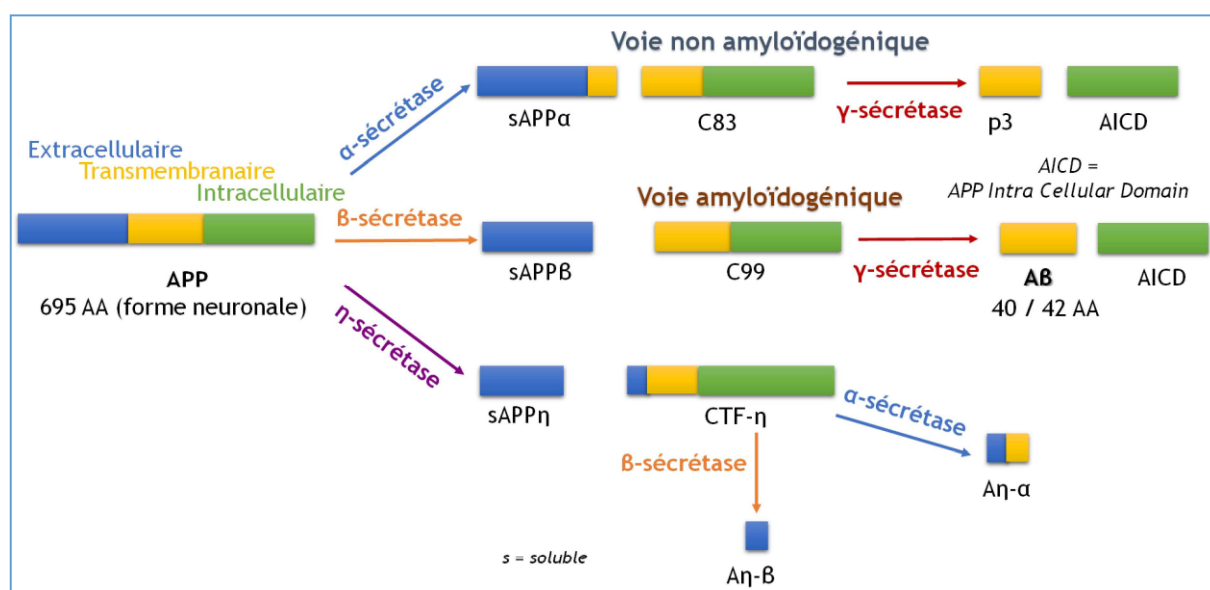


Figure 4. Représentation schématique des clivages subis par l'APP d'intérêt dans la MA, adaptée de la publication de Willem et Al. Nature, 2015.

Les η -sécrétases

Plusieurs MMP ont montré une « activité η -sécrétase » et peuvent être réunies sous le terme de « η -sécrétase », parmi lesquelles : MMP-14 (MT1-MMP), MMP-16 (MT3-MMP) et MMP-24 (MT5-MMP).³³ Ce sont toutes des MMP de type transmembranaire et leur activité de clivage de l'APP au « site η » a conduit à leur étude plus poussée.

MMP-24, MT5-MMP :

Parmi les protéines citées dans le paragraphe précédent, seule MMP-24/MT5-MMP a une localisation spécifiquement cérébrale.

De plus, des expériences chez la souris ont montré qu'une déficience en MMP-24 induite dans un modèle familial de MA (modèle 5xFAD) a réduit le volume des

plaques séniles, mais aussi le déclin cognitif, tout en améliorant l'activité synaptique, et ce sans influencer l'activité physiologique des β - et des γ -sécrétases.^{10,36}

Ces observations mènent à croire au potentiel de MMP-24 comme nouveau choix de cible pour la MA.^{37,38}

La MMP d'intérêt ici, MMP-24, n'a actuellement pas de structure cristallographique renseignée, ce qui freine sa modélisation *in silico* et donc les tests de *screening in silico* potentiels. En effet, MMP-24, identifiée depuis 1999,^{39,40} ne dispose pas encore de référencement dans la *Protein Data Bank*.

En bref,

La Métallo-Protéase Matricielle 24, MMP-24

Egalement Métallo-Protéase Matricielle TransMembranaire 5, MT5-MMP

- *Gene* : MMP-24
- *Taille* : 645 aa
- *Masse* : 73 231 Da
- *Identifiant UniProt* : Q9Y5R2
- *Identifiant ChEMBL (target)* : ChEMBL5050
- *Implication dans la Maladie d'Alzheimer* :
 - Protéine douée d'une activité « η -sécrétase »
 - Inhibition *in vivo* : amélioration de la cognition

Vieillesse et mémoire

Le vieillissement, d'un point de vue général, peut être défini comme des changements progressifs et irréversibles intervenant dans la structure et la fonction d'un organe ou d'un organisme entier et se produisant suite au passage du temps.

Face au vieillissement des populations et aux déficits, notamment cognitifs, que celui-ci entraîne, la recherche pour l'amélioration de la vie des personnes vieillissantes devient cruciale. Les démences séniles représentent une préoccupation majeure de santé publique. La prévalence actuelle des démences séniles en Europe et aux Etats-Unis est estimée à 6-8% après 65 ans et l'incidence augmente considérablement avec l'âge, allant de 2,4 pour 1000 personnes-années (PA) entre 65 et 69 ans à plus de 50 pour 1000 PA après 85 ans.⁴¹ Au niveau mondial, le nombre de personnes démentes est estimé à 46 millions et pourrait atteindre 131 millions en

2050.^g Le vieillissement, aussi bien normal que pathologique (démences séniles), est associé à une diminution des performances cognitives, avec notamment une réduction des capacités d'apprentissage et de mémoire. De nombreuses équipes de recherche tentent de trouver des solutions pharmacologiques pour diminuer les effets du vieillissement et notamment les effets des démences séniles sur la cognition. C'est un des objectifs du CERMN, Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, qui depuis plusieurs années conçoit, synthétise et évalue des ligands à visée thérapeutique et diagnostic dans la maladie d'Alzheimer.

La mémoire, anatomie et classification

La mémoire, outil de stockage d'informations apprises, est, selon les travaux de Tulving au début des années 80 catégorisée selon son aspect temporel :⁴²

- Mémoire sensorielle
 - Perceptive, immédiate (quelques secondes) ;
 - Concerne les informations liées aux 5 sens.
 - Anatomiquement, cette mémoire fonctionne de manière automatique : les événements d'intérêt sont encodés pour être traités par d'autres régions du cerveau alors que les informations non retenues disparaissent.
- Mémoire à court terme
 - Mémoire de travail (quelques minutes) ;
 - Des images et des sons reçoivent l'intention de l'individu et sont interprétés par celui-ci. Elle sert à la manipulation de l'information.
 - Anatomiquement, c'est le cortex préfrontal dorsolatéral qui permet de maintenir disponible les données nécessaires au raisonnement en cours, tout en coopérant avec d'autres aires corticales.
- Mémoire à long terme
 - Plusieurs minutes à quelques années ;
 - Elle nécessite un encodage de l'information, rendu possible par inférence.
 - Anatomiquement, l'hippocampe et les lobes temporaux sont essentiels à la consolidation de la mémoire à long terme. L'hippocampe permet l'association entre des informations de différents types provenant de différentes régions corticales (par exemple il permet d'associer une mélodie entendue à une image présentée à ce même moment). Le renforcement qui s'en suit dépend de la

^g Estimation d'après le rapport « The Global Impact of Dementia » sur le site Alzheimer's Disease International <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015> consulté le 17 Mai 2019.

charge émotive et de l'intérêt suscité par l'événement. Le renforcement consiste en des échanges successifs de l'information de l'hippocampe vers les structures corticales. Puis une fois que l'information a transité plusieurs fois entre les 2 circuits, alors les associations se stabilisent et deviennent indépendantes de l'hippocampe. On parle de "désengagement progressif du système limbique".

- La mémoire à long terme se subdivise en mémoire à long terme implicite (ou non déclarative) et mémoire à long terme explicite (ou déclarative).
 - La mémoire à long terme implicite n'est pas accessible à la conscience et concerne des connaissances procédurales et des habilités perceptivo-motrices (tel que l'habilité à faire du vélo, par exemple).
 - La mémoire à long terme explicite est accessible à la conscience et se subdivise à nouveau en :
 - Mémoire sémantique : où sont stockés des faits (idées, concepts) et les relations qui les unissent ;
 - Mémoire épisodique ou autobiographique : où sont stockées des informations relatives aux événements de la vie (souvenirs).

Toutes les informations mémorisées à long terme traversent successivement ces 3 catégories de mémoire. L'information entre dans la mémoire sensorielle, puis dans la mémoire à court terme. Si elle est répétée alors l'information demeure dans la mémoire à court terme, et accède à celle à long terme. Pour être utilisée l'information doit repasser dans la mémoire à court terme. A chaque pallier l'information peut être oubliée.

Deux types de mémoire sont altérées dans le cas de la MA : la mémoire de travail en premier lieu, puis la mémoire épisodique.

La Maladie d'Alzheimer

La Maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois en 1906 par Aloïs Alzheimer et constitue aujourd'hui la première cause des démences séniles au monde. Sa première description a été faite sur la base de critères histologiques post-mortems après observation d'un cerveau d'une défunte atteinte d'une démence jusqu'alors non décrite.⁴³ Sa description faisait état de deux types de lésions (voir Figure 5) :

- Des plaques séniles extracellulaires, insolubles et constituées de dépôts de protéines β -amyloïdes et entourées de débris neuronaux ;
- Des dégénérescences neuro-fibrillaires intracellulaires constituées de protéines Tau anormalement phosphorylées agrégées.

Ces deux lésions constituent toujours la description classique des lésions causées par la démence liée à la MA, et mènent toutes deux à des morts neuronales.

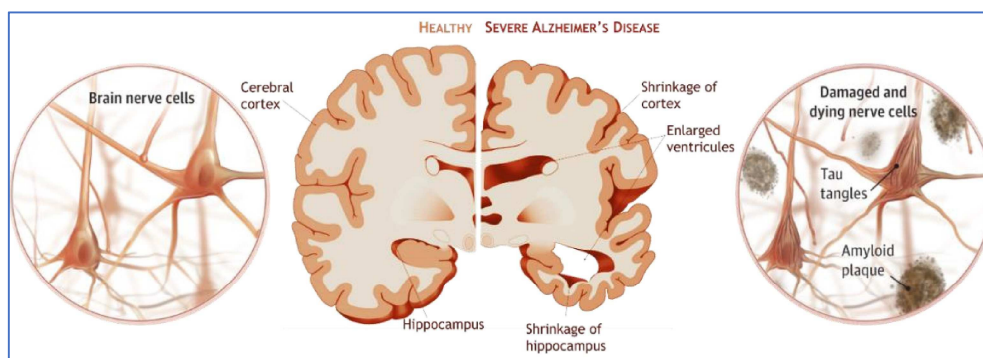


Figure 5. Changements cérébraux et neuronaux classiquement associés à la Maladie d'Alzheimer (Représentation adaptée de Jin, JAMA, 2015, 313)⁴⁴

Physiopathologie

La maladie d'Alzheimer, souvent résumée d'un point de vue symptomatique à des troubles de la mémoire (à court et à long terme, comme énoncé précédemment), concerne également le langage, l'orientation dans l'espace et les fonctions d'exécution. En effet la MA, ou "Maladie des 4A", peut se résumer brièvement à l'association d'une **a**phasie, d'une **a**praxie, d'une **a**gnosie et d'une **a**mnésie.

D'un point de vue sémiologique, on y retrouve :

- Une confusion, avec une désorientation dans le temps et l'espace malgré une vigilance normale. Cette confusion est généralement d'installation progressive mais peut parfois être brutale à l'occasion d'un changement de lieu de vie (hospitalisation), d'un choc émotionnel, d'une déshydratation ou d'une autre pathologie.
- Des troubles de la mémoire, avec un début insidieux et progressif, portant sur le passé récent et une altération de la capacité à acquérir de nouvelles informations ou à restituer une information précédemment acquise.
- Des troubles du comportement avec une apathie (le sujet ne s'intéresse plus à rien) entraînant un isolement social. De plus, le patient tend à devenir irritable voire agressif.

Lors d'une suspicion de MA, un médecin neurologue procédera à un MMSE (*Mini Mental State Examination* / Mini Examen de l'Etat Mental). Il s'agit d'un test à visée diagnostic comportant 30 items portant sur : l'orientation (quelle année, quelle

ville), l'apprentissage, l'attention, le langage et le calcul.^h Le MMSE existe depuis les années 70 et est devenu un test de l'état cognitif de référence.⁴⁵

Le score du MMSE, sur 30, est interprété de la façon suivante :

- Score \leq 24 points : probable trouble neurodégénératif
- Score $<$ 18 points : fort probable trouble neurodégénératif

Les principales limites du MMSE tiennent aux variations du score pouvant ne pas dépendre de la cognition*, notamment la fatigabilité et le niveau culturel du patient (biais sociologiques).⁴⁶

Causes moléculaires de la Maladie d'Alzheimer

La MA, pathologie neurodégénérative plurifactorielle à la fois génétique et environnementale, fait état de causes diverses parmi lesquelles on peut citer (voir Figure 6) :⁴⁷

- Une hyperphosphorylation de la protéine Tau ;
- Une agrégation des peptides amyloïdes A β en plaques séniles ;
- Une dérégulation de l'homéostasie des ions métalliques ;
- Des processus neuroinflammatoires ;
- Une hyperproduction d'Espèces Réactives de l'Oxygène* ;
- Une dérégulation du microbiote intestinal ;⁴⁸
- Des mutations du gène de l'APP (locus 21q21), comptant pour 14% des cas de MA précoce (30 à 50 ans).⁴⁹

^h Pour consulter un exemplaire d'un MMSE, se référer à l'annexe n°4 : Mini Mental State Examination.

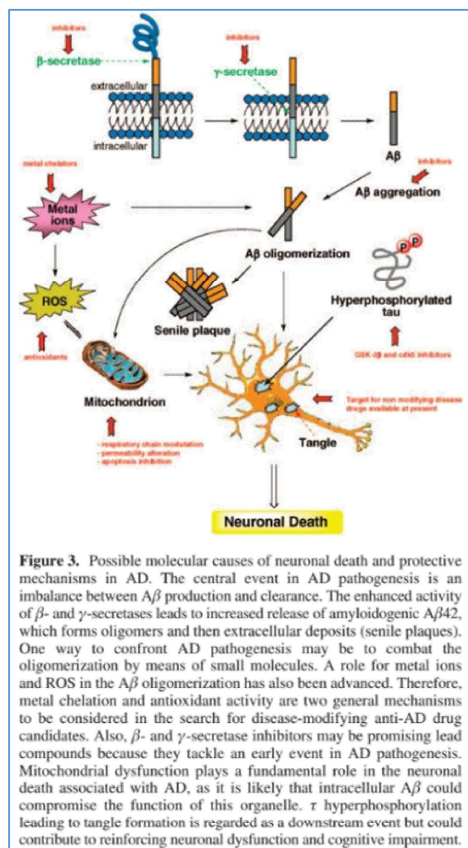


Figure 6. Représentation schématique des causes moléculaires associées à la MA (D'après Cavalli et Al., 2008)

Du fait de ses causes multiples, appréhender la MA revient à prendre en considération les différentes voies de signalisation connues et impliquées dans la pathogenèse. L'annexe n°5 : « Voies de signalisation liées à la Maladie d'Alzheimer » donne un aperçu de toutes les voies de signalisation liée à cette maladie et répertoriées en 2016. L'image dresse un schéma de ce qu'il convient d'envisager si l'on souhaite entreprendre un projet de conception de nouvelles thérapies de cette maladie.

Traitements disponibles actuellement dans la Maladie d'Alzheimer

Aujourd'hui, les thérapies proposées aux patients souffrant de la MA visent surtout à rétablir un taux basal d'acétylcholine (ACh) suite à la mort cellulaire des neurones cholinergiques, et ce en inhibant sa dégradation (inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) : Donépézil ARICEPT®, Galantamine REMINYL®, Rivastigmine EXELON®) ou en favorisant indirectement le relargage d'ACh (antagoniste des récepteurs NMDA : Mémantine EBIXA®) (voir Tableau 1).⁵⁰ Ce sont des thérapies symptomatiques dont le service médical rendu (SMR) a été jugé

insuffisant par la Commission de Transparence de la Haute Autorité de Santé (HAS)ⁱ et qui ne sont désormais plus prises en charge par la Solidarité Nationale en France.^j

Médicament Dénomination Commune Internationale (Nom de spécialité)	Laboratoire	Année AMM (ANSM)	Mécanisme d'action
Donépézil (ARICEPT)	Eisai	1997	AChEI
Rivastigmine (EXELON)	Novartis	1998	AChEI + BuChEI
Galantamine (REMINYL)	Jessen	2000	AChEI + Modulation nicotinique
Mémantine (EBIXA)	Lunbeck	2002	Antagoniste NMDAR

Tableau 1. Résumé des médicaments actuellement proposés sur le marché dans la Maladie d'Alzheimer.

Vers des traitements curatifs de la Maladie d'Alzheimer ?

De nombreuses formes de thérapies, à l'état de recherche, tentent actuellement de jouer sur les facteurs de causalité de la MA.

Des essais de développement d'inhibiteurs de β - et de γ -sécrétase sont lancés depuis plusieurs années. Ceux-ci se sont jusqu'alors révélés complexes à concevoir, tant l'implication des sécrétases β et γ semble aller au-delà de leur rôle dans la formation des peptides $A\beta$ neurotoxiques, et leur inhibition s'avère alors accompagnée d'effets délétères *in vivo*.^{32,51}

Il en va de même pour les composés à l'état de recherche intervenant dans l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau. Les composés synthétiques ayant atteint le stade d'études cliniques se sont vus responsables de lourds effets indésirables stoppant leur développement.⁵²

La recherche s'étant focalisée sur des voies de signalisation « alternatives », à savoir autre que la voie de la protéine β -amyloïde et de la protéine Tau, ont révélé l'importance des récepteurs sérotoninergiques,⁵³ histaminergiques,⁵⁴ des canaux

ⁱ D'après le communiqué de l'HAS du 21 octobre 2016 consultable sur https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2679466/fr/medicaments-de-la-maladie-d-alzheimer-un-interet-medical-insuffisant-pour-justifier-leur-prise-en-charge-par-la-solidarite-nationale

^j Pour consulter une description détaillée de la prise en charge de la Maladie d'Alzheimer en France, consulter l'annexe n°6 : Recommandations Vidal® pour la prise en charge de la Maladie d'Alzheimer.

calciques,⁵⁵ et de la neuroinflammation. Cependant, à l'image des deux démarches précédemment évoquées, le développement de médicaments intervenant dans ces voies alternatives a été arrêté à la suite de la mise en lumière soit d'effets *in vivo* insuffisants soit d'effets indésirables.

Ainsi, bien que le site américain tenu par le National Institute of Health (NIH) recensant les essais cliniques (<https://clinicaltrials.gov>) fasse état de 2110 essais cliniques ayant la mention « *Alzheimer Disease* », ^k il n'existe malheureusement pas encore de médicament phare sur le marché permettant de guérir de cette pathologie.

Importance du diagnostic précoce de la Maladie d'Alzheimer

Le rapport de 2018 de la fondation *World Alzheimer* contient un chapitre entier sur l'importance du diagnostic de la MA.¹ Il souligne en effet que, contrairement à d'autres pathologies chroniques, les facteurs de risque de la MA n'étant pas clairement identifiés, il n'est pas possible d'instaurer une surveillance précoce afin de démarrer un traitement en amont de l'apparition des symptômes.

Dans la même optique, l'article de Golde et Al. paru en décembre 2018 dans la revue *Neurodegeneration*⁵⁶ émet l'hypothèse que si tant d'essais cliniques se sont révélés infructueux dans la MA, cela ne relève peut être pas à chaque fois des médicaments testés ou des essais cliniques eux-mêmes, mais plutôt du moment des essais. La Figure 7, extraite de cet article, propose de nouveaux calendriers de tests des candidats-médicaments contre la MA. Cependant, comme on peut le constater, cela suppose de connaître très précocement l'état cérébral des sujets (présence de peptides amyloïdes agrégés, de dégénérescences neurofibrillaires, d'autres dommages cellulaires...). Ainsi que le suggère l'article, les outils de diagnostic précoce de cette maladie offriraient alors de précieux indices quant à la mise en place d'essais cliniques précoces.

^k Site consulté le 27/05/2019.

¹ Consultable sur <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf> (consulté le 27/05/2019)

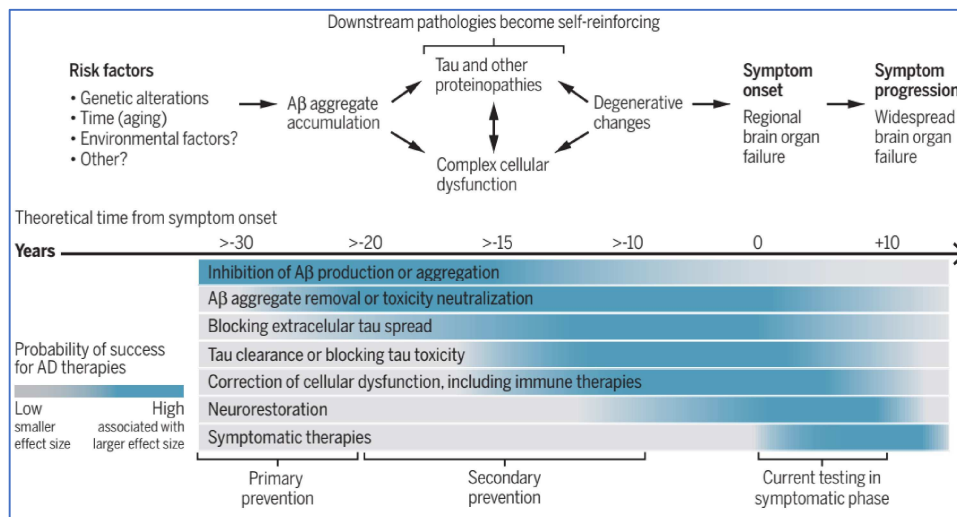


Figure 7. Frise chronologique proposée par Golde et Al., *Neurodegeneration*, 2018, exposant un calendrier d'intervention idéal pour remédier aux causes multiples de la MA.

Tel qu'indiqué dans la Figure 7, les symptômes de la MA n'apparaissent que des années après les premiers dommages cérébraux. Une récente publication de la revue *Nature Medicine* a mis en lumière la possibilité de révéler ces dommages cérébraux bien avant les premiers symptômes. Il s'agit de la publication de Preische et Al., dans laquelle les chercheurs ont révélé parmi des échantillons sanguins de patients porteurs des variants génétiques responsables de la forme précoce de la MA la présence de neurofilaments, preuves de protéinopathie cérébrale.⁵⁷ Bien que la forme précoce, génétique, de la MA ne représente pas la majorité des cas de MA, ce test sanguin de diagnostic précoce constitue une piste et ouvre la voie de nouvelles stratégies de diagnostic de cette pathologie.

Conclusion et Perspectives de la Partie I

Les Métalloprotéases Matricielles, protéines identifiées depuis plusieurs dizaines d'années maintenant, voient leurs implications dans les phénomènes multifactoriels (cancer, inflammation, neurodégénération notamment) de plus en plus étudiées tant leurs rôles sont multiples et divers.

Ici il a été exposé l'impact des MMP dans les phénomènes neurodégénératifs et surtout, il a été mis en lumière une nouvelle piste d'approche de la Maladie d'Alzheimer, à savoir l'implication de la MMP-24 dans la métabolisation du Précurseur de la Protéine Amyloïde (APP).

La MMP-24 souffre cependant, comme énoncé précédemment, d'un défaut de connaissance structurale. C'est pourquoi la suite de ce manuscrit propose de montrer comment employer des techniques de Modélisation Moléculaire permet :

- De proposer des hypothèses structurales tridimensionnelles de la MMP-24,
- De proposer des hypothèses de conception de ligands pouvant hypothétiquement être affins de cette protéine et avoir potentiellement un nouveau rôle dans la lutte contre la Maladie d'Alzheimer.

Partie II

Place de la Modélisation Moléculaire dans la Conception de Nouveaux Principes Actifs

Partie II

Place de la Modélisation Moléculaire dans la Conception de Nouveaux Principes Actifs

Ce second chapitre a pour but de faire un point sur les techniques employées en Modélisation Moléculaire dans la conception de nouveaux principes actifs. En effet, dans le manuscrit présenté ici, l'enjeu est de concevoir le ligand idéal d'une protéine pour laquelle aucune donnée structurale n'est disponible. Pour ce faire, des outils de Modélisation Moléculaire ont été utilisés. Ainsi, après un court exposé sur la démarche générale de *Drug Design*, la seconde partie de ce manuscrit se veut être un exposé des différents outils et principes du champ de la Chémoinformatique et de la Modélisation Moléculaire. Voici le plan que suivra cette seconde Partie :

Partie II – Place de la Modélisation Moléculaire dans la Conception de Nouveaux Principes Actifs

Glossaire des termes techniques

Généralités sur la Conception de Nouveaux Médicaments

Démarche générale de Drug Design

Implication de la Chémoinformatique dans la Conception de Nouveaux Médicaments

La Chémoinformatique, une discipline récente en évolution

Principes appliqués en Modélisation Moléculaire

Méthodologie en Modélisation Moléculaire

Analyse conformationnelle des molécules

Modélisation des Cibles d'intérêt

Conception de nouveaux ligands assistée par Modélisation Moléculaire

Contexte de la Conception de Ligands Inhibiteurs de MMP-24 au CERMN

Conclusion de la Partie II

Glossaire des termes techniques employés dans la Partie II

A

Affinité : Désigne la force de l'interaction entre une molécule et une cible, et est exprimée à travers l'expression de concentrations (IC_{50} , K_I ; $K_D...$). Elle reflète la somme des énergies nécessaires au maintien de l'interaction dans le temps.

Agoniste : Ligand se liant à une cible en provoquant une réponse.

Analyse conformationnelle d'une molécule : Recherche des différentes conformations possibles d'une molécule.

Angle de valence : Désigne l'angle bidimensionnel formé par la liaison entre 3 atomes disposés de façon linéaire.

Angle dièdre ou *Angle de torsion* : Désigne l'angle tridimensionnel formé par l'intersection de 2 plans sur un 3^{ème} plan perpendiculaire à l'intersection des 2 plans. Il est généralement représenté par une projection de Newman.

Antagoniste : Ligand synthétique se liant à une cible en ne produisant pas de réponse en absence d'un agoniste.

C

Champ de force : Un champ de force est un ensemble de modélisations mathématiques et de paramètres appliqués par type d'atomes, permettant notamment de calculer l'énergie potentielle d'une molécule.

Chémoinformatique : Discipline utilisant des méthodes informatiques pour résoudre des problèmes en chimie. Les méthodes s'étendent du développement de base de données au calcul prédictif des propriétés physico-chimiques et biologiques des composés d'intérêt.

Chimie médicinale (Chimie thérapeutique) : Discipline de la chimie qui s'intéresse à la synthèse et à l'étude des molécules possédant une propriété thérapeutique, et plus particulièrement à la relation entre la structure d'un composé et son activité biologique (qualifiée de « relation structure-activité »). L'objectif de cette discipline est la mise au point et le développement de nouveaux médicaments.

Chimiothèque : Toute collection de molécules dont la structure, et éventuellement les propriétés, sont archivées sous un format électronique et dont un échantillon est disponible. La collection est couplée à un système de gestion informatique et constitue une banque de données.

Cible biologique : protéine ou tout autre entité humaine ou appartenant à des microorganismes dont l'interaction avec un composé chimique entraîne un bénéfice thérapeutique.

Clustering : (de l'anglais "regroupement") En chimie le *clustering* moléculaire vise à rassembler des molécules en une famille de molécules semblables de par leur structure. Elles forment alors un "cluster", et posséderont *a priori* la même activité biologique.

Complexe Ligand-Macromolécule : Edifice chimique où un ligand établit des liaisons (ionique, hydrogène, covalente...) avec une macromolécule.

Conformation d'une molécule : Arrangement spatial des atomes de la molécule. On passe d'une conformation d'une molécule à une autre conformation (d'un conformère à un autre) par des rotations autour des liaisons simples.

Criblage virtuel : « Approche informatique visant à prédire des propriétés essentielles (biologiques, physicochimiques) de librairies de molécules (ou chimiothèques). »⁵⁸

D

Descripteurs moléculaires : représentations mathématiques d'une molécule résultant d'une transformation d'une caractéristique structurale en une représentation symbolique.

Docking : Simulation de l'amarrage du ligand dans le site actif d'une cible (généralement une macromolécule) pour identifier la conformation bioactive du ligand, prédire son orientation par rapport à sa cible, et prédire l'énergie libre de liaison des 2 partenaires. Généralement la cible est considérée rigide, pour simplifier les calculs.

Docking score : Désigne la qualité de l'amarrage d'une molécule sur le site actif d'une cible d'intérêt. Ce score est lié à la variation d'énergie libre du complexe ligand-cible. Ainsi plus le score sera faible, meilleur sera l'amarrage.

Drugabilité d'une cible : capacité d'une cible à pouvoir *a priori* se lier sélectivement à un ligand.

Drugabilité d'une molécule : capacité d'une molécule à pouvoir *a priori* se lier sélectivement à une cible et à présenter les caractéristiques physico-chimiques et pharmacodynamiques adéquates pour devenir à terme un candidat-médicament.

Dynamique moléculaire : consiste à étudier la trajectoire d'une molécule en y appliquant les lois de la mécanique classique newtonienne (simuler les mouvements atomiques au cours du temps).

E

Ensemble docking : Type de *docking* permettant d'amarrer le ligand considéré dans plusieurs conformations d'une même cible ou dans plusieurs cibles différentes.

Essai clinique : Essai méthodique d'un médicament mené chez des volontaires sains et/ou malades, visant à montrer les effets thérapeutiques et/ou à rechercher les effets indésirables. Ils permettent entre autre d'étudier la pharmacocinétique du médicament sous la forme galénique choisie.^m

Essai préclinique : Essai consistant au test d'un médicament *in vivo*, chez l'animal, ayant pour but d'évaluer l'effet biologique, toxique et l'application clinique potentielle d'un candidat médicament.

G

Groupement fonctionnel : Il s'agit d'un groupe d'atomes qui a des propriétés physico-chimiques similaires à chaque fois qu'il est présent dans des molécules différentes. L'étude des groupements fonctionnels et de leur réactivité permet de prévoir la réactivité d'une molécule organique.

H

Hit moléculaire : Molécule possédant hypothétiquement l'activité recherchée.

I

Interaction électrostatique : interaction attractive ou répulsive liée à l'existence d'un moment dipolaire dans une molécule polaire, et ce à courte distance.

^m D'après le dictionnaire médical de l'Académie de Médecine, consultable sur www.dictionnaire.academie-medecine.fr, consulté le 3/06/2019.

Interaction stérique : interaction liée à l'espace occupé par les atomes, provoquant un encombrement ou une gêne stérique.

L

Lead moléculaire : Candidat-médicament.

Liaison hydrogène : liaison faible entre un atome électronégatif et un atome d'hydrogène attaché par liaison covalente à un autre atome électronégatif. Il s'agit d'une liaison polarisée pouvant être intra- ou inter-moléculaire.⁵⁹

Ligand : Molécule présentant une affinité vis-à-vis d'une cible biologique (un récepteur ou plus largement une protéine).

M

Modèle : Représentation schématique d'un processus pour en faciliter l'étude.

Modélisation : Elaboration d'un modèle dans le but de remplacer des expériences réelles par des simulations.

P

Paramètres pharmacodynamiques : Indicateurs qualitatifs et quantitatifs de la façon dont un principe actif agit sur un organisme (profil agoniste/antagoniste ; études d'affinité ; études de sélectivité ; études de compétition ; profil inducteur/inhibiteur enzymatique ; études dose-effet...).

Paramètres pharmacocinétiques : Indicateurs qualitatifs et quantitatifs de l'étude du devenir d'un médicament dans l'organisme (biodisponibilité ; concentration maximale ; volume de distribution ; clairance ; demi-vie d'élimination...).

Perturbation de l'Energie Libre (FEP, Free Energy Perturbation) : Démarche utilisée en dynamique moléculaire permettant d'estimer la variation de l'Energie Libre associée à un complexe Ligand-Macromolécule avant et après pharmacomodulation du ligand.

Pharmacomodulation : Procédure appartenant au domaine du *Drug Design* et consistant en une modification par chimie de synthèse de molécules ayant une activité pharmacologique par l'introduction de groupements à effet pharmacologique *a priori* favorable et/ou par le retrait de groupements à effet *a priori* défavorable, et par arrangement stérique ; tout ceci dans le but d'améliorer ou de s'affranchir d'une activité pharmacologique.

Pharmacophore : « Ensemble des caractéristiques stériques et électroniques nécessaire à l'établissement d'interactions supramoléculaires avec une cible biologique spécifique et dans le but de déclencher ou inhiber une réponse biologique». ⁶⁰

R

Relations Structure-Activité : « Approche de la chimie médicinale qui qualifie et quantifie les motifs d'une structure chimique responsable d'une activité biologique (ou d'une absence d'activité). » ⁶¹

T

Test in silico : Désigne un essai effectué à l'aide d'un modèle informatique. Cela apporte alors une représentation informatique ponctuelle ou continue d'un système et/ou d'un processus physico-chimique.

Test in vitro : Désigne un essai effectué dans un environnement artificiel, en dehors de tout être vivant et visant à recréer tout ou une partie d'un organisme vivant.

Test in vivo : Désigne un essai effectué sur un organisme vivant.

Toxicité : Capacité d'une substance à créer dans un organisme vivant des effets néfastes pour lui.

Généralités sur la Conception de Nouveaux Médicaments

La conception de médicaments, ou *drug design*, est la démarche permettant d'entamer le processus de recherche, développement et commercialisation d'un médicament. Le *drug design* revient donc à la recherche et à la mise au point d'un nouveau principe actif d'intérêt thérapeutique. La démarche de *drug design* permet de disposer d'un candidat médicament présentant une première formulation galénique pour conduire sur celui-ci des essais précliniques et cliniques, étapes cruciales pour pouvoir, en cas de succès, procéder à une demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) auprès des autorités compétentes concernées et donc, pouvoir commercialiser un médicament. Au total, le délai allant de la conception du médicament à sa commercialisation est en général d'une quinzaine d'années et le coût total de développement est de l'ordre du milliard de dollars.

Le *drug design*, conduit d'une façon propre à chaque laboratoire de recherche, passe par différentes étapes exposées ci-après.

Démarche générale de *Drug Design*

Le choix de la maladie à traiter, et *a fortiori* de la cible biologique à viser tient des capacités et des intérêts intellectuels et financiers du laboratoire entamant une démarche de *drug design*. La/les cible(s) retenue(s) doivent avoir fait preuve de leur drugabilité.

Une fois les limites du projet de *Drug Design* posées, les laboratoires de recherche procèdent alors à des tests des molécules en leur possession (pouvant être rassemblées en une chimiothèque), afin de disposer d'une première prédiction de l'activité et de pouvoir orienter leurs moyens de recherche sur des familles moléculaires particulières. Les tests à leur disposition sont de natures et de coûts variés. Ainsi les tests peuvent être menés dans un premier temps *in silico*, *in vitro* voire *in vivo*. Les tests *in silico*, tributaires de la chémoinformatique, passent par l'utilisation de modèles moléculaires pour une évaluation virtuelle d'une liaison d'un ligand à une cible biologique. Cette discipline relève de la modélisation moléculaire,

et dont un détail se trouve ci-après. Pour ce qui est des tests *in vitro*, leur utilisation passe par des tissus, cellules ou protéines isolées et ils permettent d'évaluer des paramètres d'inhibition, d'affinité, de cytotoxicité ou de toute autre activité modélisable *in vitro*. Les tests *in silico* et *in vitro* peuvent être utilisés conjointement. Ainsi des hypothèses émises sur des modèles informatiques pourront alors être confirmées ou infirmées par des résultats d'expérimentation *in vitro*. Si une hypothèse de liaison est confirmée par les tests *in vitro*, alors les tests *in silico* pourront être utilisés de façon isolée par la suite. L'avantage certain de cette utilisation conjointe *in silico/in vitro* est un gain de temps et d'argent considérable pour les laboratoires de recherche. En effet, les tests biologiques *in vitro*, bien que miniaturisables et automatisables, requièrent du personnel parfois en nombre avec des expertises propres à chaque test ainsi que du matériel dont le nombre et le coût dépendent des tests. Les tests *in silico* eux, permettent un grand nombre d'expérimentations sur un temps réduit, et dont les outils – ordinateurs, calculateurs et logiciels – sont réutilisables d'une expérimentation à une autre. Les tests préliminaires *in vivo* sont utilisés en derniers recours, tant les réglementations légales et éthiques et leur mise en œuvre est complexe et coûteuse. Ces tests préliminaires permettront de disposer d'un *hit* moléculaire, qui servira alors de point de départ pour une démarche d'optimisation.

Pour passer du *hit* moléculaire au *lead* moléculaire, il faut faire du *hit* une molécule capable de présenter une bonne activité *in vitro*, c'est-à-dire améliorer les paramètres pharmacodynamiques du *hit*. Pour cela, il faut disposer d'études de Relation Structure-Activité (RSA), qui permettent de justifier de la présence ou de l'absence d'éléments structuraux en regard d'une activité ou d'une toxicité. Les RSA permettent de guider les pharmacomodulations à mener sur le *hit* afin de conduire à un *lead* moléculaire.

Enfin, optimiser un *lead* moléculaire revient à améliorer ses paramètres pharmacocinétiques pour conserver son activité après passage de l'*in vitro* à l'*in vivo*. Cela consiste alors à moduler la molécule non plus en regard de son activité mais en regard du comportement que l'on souhaite lui attribuer en milieu biologique. Cela revient ainsi à moduler sa polarité, sa perméabilité, sa résistance métabolique...

Une fois le candidat-médicament obtenu, alors celui-ci devra succéder aux essais précliniques et aux essais cliniques afin de prétendre à une demande d'AMM.

En bref,

Etapas clés de la démarche de *Drug Design* :

- Identification & Validation de Cible
- Identification de *Hit*
- *Hit to Lead Chemistry*
- *Lead Optimization*
- Etudes précliniques & cliniques
- Demande d'AMM & Commercialisation

Implication de la Chémoinformatique dans la Conception de Nouveaux Médicaments

La Chémoinformatique, une discipline récente en évolution

La chémoinformatique a vu son essor à la fin des années 1990, années où les données de littérature de la chimie se font nombreuses mais complexes à rassembler et à interpréter. En 1998, Franck Brown propose comme première définition de la chémoinformatique « le mélange des sources d'informations de chimie dans le but de transformer les Données en Information et l'Information en Savoir, pour prendre de meilleures décisions plus rapidement dans le domaine de l'identification de *Leads* et de leur optimisation ».

Les outils informatiques ont permis depuis lors un accès universel à une quantité jusqu'alors inégalée d'informations, permettant ainsi, lors de l'exploration des bases de données de chimie, de trouver en quelques secondes un composé chimique parmi des millions de composés précédemment décrits.

Le terme « chémoinformatique », a vu son étendue évoluer en même temps que les méthodes et outils d'analyses de données. Ainsi le terme chémoinformatique ne se limite plus au champ des bases de données de chimie, mais inclut également les disciplines de création de modèles tridimensionnels prédictifs de systèmes complexes comme des protéines.

Bien que les avancées précoces en Chémoinformatique aient été appliquées premièrement au domaine du développement du Médicament grâce aux moyens employés par les industries pharmaceutiques, la Chémoinformatique concerne aujourd'hui également l'industrie agroalimentaire et cosmétique, permettant une reconnaissance grandissante de la Chémoinformatique en tant que discipline. Le prix

Nobel accordé à Martin Karplus, Michael Levitt et Arieh Warshel pour leurs travaux sur la modélisation des réactions chimiques a constitué le point culminant de la reconnaissance de la Chémoinformatique.⁶²

Principes appliqués en Modélisation Moléculaire

Une analyse des interactions entre des ligands (endogènes, de synthèse, voire même hypothétiques) et des macromolécules – ou potentielles cibles – permet de comprendre, d'anticiper et d'émettre des hypothèses quant à une réponse biologique d'une molécule vis-à-vis d'un récepteur. La Modélisation Moléculaire, discipline appartenant au champ de la Chémoinformatique, permet ce type d'analyse *via* des expérimentations *in silico* permises par des représentations tridimensionnelles des structures chimiques d'intérêt.

L'objectif global de la Modélisation Moléculaire relève de la compréhension des propriétés physico-chimiques et biologiques associées à une structure d'intérêt. Plus précisément, la Modélisation Moléculaire vise la compréhension des interactions ligands-récepteurs, et notamment l'explication des données d'affinité, de sélectivité ou de toxicité associées à un ligand. Ainsi la Modélisation Moléculaire a pour but la concrétisation de l'association d'une structure chimique à une activité potentielle. Les applications potentielles sont multiples, de l'aide à l'interprétation de données biologiques (activités et prédiction de comportements moléculaires) à l'aide à la conception de nouvelles molécules, la conception de nouveaux ligands étant l'application majeure recherchée par l'utilisation de la modélisation moléculaire.

Méthodologie en Modélisation Moléculaire

Analyse conformationnelle des molécules

Les techniques de modélisation moléculaire utilisées dans la conception de nouveaux ligands font suite à une considération généralement admise en chimie thérapeutique selon laquelle une interaction entre un ligand et une cible associée conduit à un phénomène observable (au niveau cellulaire, tissulaire voire au niveau de l'organisme entier). Ainsi la modélisation moléculaire se place au premier niveau de cette considération en permettant une analyse tridimensionnelle des interactions et des réponses potentielles entre un ligand et une cible.

Une expérimentation de modélisation moléculaire s'appuie sur la connaissance de la stéréochimie de la molécule d'intérêt (longueur des liaisons, angles de valence, angles dièdres). Ces informations permettent l'assignation de coordonnées tridimensionnelles aux atomes constituant une molécule étudiée. Ensuite, tout

comme les molécules réelles, les structures moléculaires modélisées sont gouvernées par leur énergie. Il en va de même pour les interactions moléculaires. Les énergies moléculaires peuvent alors être obtenues par 2 méthodes de calcul différentes :

- Méthode de mécanique quantique : l'énergie de la molécule est calculée à partir des interactions entre les électrons et les noyaux des atomes. C'est une méthode coûteuse en temps de calcul mais permettant d'avoir une certaine précision des résultats.
- Méthode de mécanique moléculaire : l'énergie de la molécule est calculée à partir de modèles mathématiques simples des interactions entre atomes. Les modèles utilisés sont paramétrés par type atomique. L'association du modèle mathématique à ses paramètres permet de définir un champ de force. C'est une méthode rapide permettant d'accéder à l'énergie potentielle de grands systèmes moléculaires.

Toute expérimentation de Modélisation Moléculaire commence par la construction en trois dimensions des molécules d'intérêt. Il convient ensuite de disposer des informations concernant les énergies potentielles associées à ces molécules. Une fois ces énergies potentielles associées aux molécules d'intérêt obtenues, il conviendra de les minimiser pour disposer de la conformation la plus probable de la molécule (à savoir celle associée à un minimum énergétique). Pour cela, les logiciels de modélisation moléculaire procèdent à un changement de conformation progressif des molécules jusqu'à obtention de la conformation de la molécule associée à l'énergie potentielle la plus basse (énergie potentielle minimale). En fonction des coordonnées tridimensionnelles des différents atomes (et donc en fonction des différentes conformations), on peut définir une surface d'énergie potentielle, qui graphiquement fera apparaître des zones de stabilité (associées à des minimums locaux d'énergie potentielle, à des conformations stables) et des zones d'instabilité (associées à des maximums locaux d'énergie potentielle, à des conformations instables), pouvant correspondre à des états de transition. Les critères pris en compte dans les calculs des énergies potentielles sont :

- Les énergies associées aux longueurs des liaisons ;
- Les énergies associées aux angles de valence et aux angles dièdres ;
- Les énergies associées aux interactions stériques et électrostatiques.

En effet, l'énergie potentielle E peut être décomposée en 5 termes :

$$E = E_{\text{élong}} + E_{\text{flex}} + E_{\text{rot}} + E_{\text{Cb}} + E_{\text{VDW}}$$

Avec :

- $E_{\text{élong}}$: énergie d'élongation de chaque liaison entre les atomes ;
- E_{flex} : énergie de flexion, correspondant à l'énergie d'angle de liaison (angles de covalence) ;
- E_{rot} : énergie de rotation, autour des angles dièdres ;
- E_{Cb} : énergie coulombienne, traduisant les interactions électrostatiques entre les atomes dans une conformation donnée ;
- E_{VDW} : énergie de Van der Waals, prenant en compte la répulsion stérique entre les atomes.

Lors d'une minimisation d'énergie, le logiciel de modélisation moléculaire procède à des changements de conformation jusqu'à ce que la dérivée d'énergie potentielle soit nulle, ceci correspondant à un gradient d'énergie. Une valeur nulle correspond à un minimum énergétique, sans préciser s'il s'agit d'un minimum local ou d'un minimum global. Pour être assuré de disposer du minimum énergétique global d'une molécule, il faut procéder à une analyse conformationnelle de celle-ci, afin d'établir son profil énergétique global et ne retenir que la conformation associée à l'énergie potentielle minimale de la molécule (voir schéma sur la Figure 8).

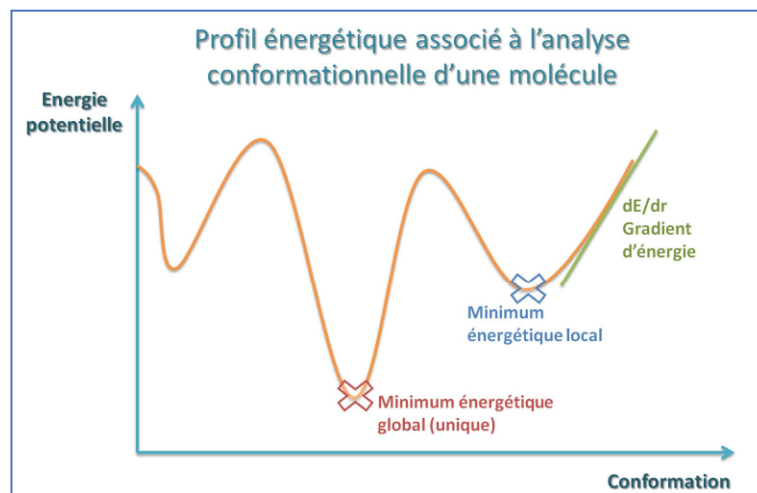


Figure 8. Représentation schématique d'un profil d'énergie potentielle associé aux conformations d'une molécule

Modélisation des Cibles d'intérêt

Dans une démarche de *Drug Design*, et donc dans un contexte de conception de nouvelles molécules actives sur une cible, la représentation tridimensionnelle d'une cible représente un enjeu. Ce dernier enjeu relève parfois même du défi lorsque les informations structurales obtenues classiquement par RMN et/ou par

cristallographie de la cible ne sont pas disponibles. En effet, si la structure de la protéine cible n'est pas connue, une technique de Modélisation Moléculaire consistant à une modélisation par homologie avec une protéine homologue dont la structure tridimensionnelle est connue peut être réalisée. La modélisation de la cible souhaitée se fera par alignement de séquence entre cible et protéine homologue pour en obtenir une hypothèse de structure. Ce procédé suit le principe suivant « *Les structures des protéines sont mieux conservées que leur séquence* »⁶³. S'il existe une homologie de séquence en acides aminés, il existera une homologie de structure entre les deux protéines considérées. Des banques de données alimentées mondialement concernant la séquence et la structure des protéines sont consultables sur Internet.

En effet, les banques de données publiques accessibles sur Internet sont des outils précieux de Modélisation Moléculaire. Le Tableau 2 suivant propose une liste non exhaustive des bases de données couramment consultées pour s'enquérir des informations sur les cibles et maladies souhaitées.

Nom de la base de données URL	Description
NCBI Gene ncbi.nlm.nih.gov/gene	<ul style="list-style-type: none"> - Gérée par le <i>National Center for Biotechnology Information</i> - Fournit les données sur les gènes identifiés : <ul style="list-style-type: none"> o Leur séquence nucléotidique, o Leur localisation, o Leur mode d'expression, o les liens qu'ils établissent avec les autres gènes et des données d'homologie.⁶⁴
Ensembl ensembl.org	<ul style="list-style-type: none"> - Conçue et gérée par l'<i>European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)</i> - Référence automatiquement le génome en y intégrant les données biologiques associées aux séquences⁶⁵
Protein Data Bank (PDB) rcsb.org	<ul style="list-style-type: none"> - Banque mondiale et publique de structures tridimensionnelles de macromolécules biologiques gérée et appartenant au <i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i> - Les structures 3D y sont déposées après détermination par cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMN, microscopie électronique - Les données récupérables contiennent : <ul style="list-style-type: none"> o Les coordonnées 3D des atomes constituant la structure élucidée (protéine seule ou complexe protéine-ligand), o La méthode de résolution de la structure et sa résolution, o Des représentations 2D des complexes et des séquences. - La PDB constitue aujourd'hui le site de référence des données tridimensionnelles des macromolécules⁶⁶

<p>UniProt uniprot.org</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Base de données publique visant à répertorier de manière systématique après séquençage les séquences des protéines. - Résulte d'une collaboration entre l'<i>European Bioinformatics Institute</i> et le <i>Swiss Institute of Bioinformatics</i> - Les données sur la séquence des protéines sont enrichies <ul style="list-style-type: none"> o De données bibliographiques de fonctions des protéines, o De taxonomie et d'identification, o De localisation o De liens vers d'autres bases de données avec notamment des aspects de génétique et de signalisations cellulaires⁶⁷
<p>Reactome reactome.org</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Fournit des outils bioinformatiques de visualisation, d'interprétation et d'analyse à propos des voies de signalisation connues afin de supporter la recherche et notamment :⁶⁸ <ul style="list-style-type: none"> o L'analyse du génome, o La biologie des systèmes o L'enseignement - Géré par le <i>National Institute of Health</i>
<p>WikiPathways wikipathways.org</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Rassemble les données connues de signalisation et en permet l'analyse⁶⁹ - Sa mise en œuvre tient de nombreux projets de financements
<p>Pathway Commons pathwaycommons.org</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Financée par le <i>National Institute of Health</i> - Rassemble et fournit les informations de signalisation et d'interaction⁷⁰
<p>KEGG genome.jp/kegg/</p>	<p>KEGG – ou <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Base de données de référence en matière d'interprétation biologique des séquences génomiques - Intègre : <ul style="list-style-type: none"> o Informations des systèmes o Informations génomiques o Informations chimiques o Information de santé - Utilisée aussi bien pour consulter des données que pour modéliser des voies métaboliques - Financée par le Ministère de l'Éducation, de la Culture, des Sports, des Sciences et de la Technologie au Japon puis désormais par le <i>National Bioscience Database Center of the Japan Science and Technology Agency</i>.⁷¹
<p>Opentargets opentargets.org</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Intègre les données génétiques (génomiques, transcriptomiques), les données de médicaments, de modèles animaux et de la littérature scientifique pour donner un score à une association cible-maladie donnée.⁷² - Financée par diverses sources d'origine publique et privée
<p>GWAS catalog ebi.ac.uk/gwas</p>	<p>GWAS – ou <i>Genome Wide Association Study</i> (Etude d'Association Pangénomique)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analyse des associations entre les polymorphismes nucléotidiques (SNP) des individus avec les maladies humaines. - Les données issues de cette étude sont disponibles depuis 2008 - Gérée par l'EMBL-EBI.⁷³
<p>CCLE portals.broadinstitute.org/ccle</p>	<p>CCLE – ou <i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i> (Encyclopédie des lignées cellulaires cancéreuses)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Existe depuis 2008 suite à une collaboration entre le <i>Broad Institute</i> et le <i>Novartis Institute for Biomedical Research</i> - Compile les données génétiques et pharmacologiques de cancers humains afin de permettre d'établir des liens entre cancers et réponses pharmacologiques et des liens entre cancers et patients⁷⁴

OMIM ncbi.nlm.nih.gov/omim	OMIM – ou <i>Online Medelian Inheritance in Man</i> - Répertorie toutes les maladies décrites relevant d'un composant génétique ⁷⁵ - Gérée par le <i>National Institute of Health</i>
ClinicalTrials clinicaltrials.gov	- Base de données fournissant aux professionnels de santé, aux chercheurs ou aux patients les descriptions des essais cliniques menés publiquement ou en privé. ⁷⁶ - Soutenue par la <i>National Library of Medicine</i> - Recense près de 310 000 études menées dans plus de 200 pays (<i>consulté le 5/6/2019</i>).
Achilles / Depmap portals.broadinstitute.org/achilles depmap.org/portal/	- Identifier et répertorie les gènes essentiels de centaines de lignées cellulaires cancéreuses. - Se base sur des expérimentations de <i>knockout</i> de gènes et sur des perturbations génétiques utilisant des ARNi ou la Cas-9 afin d'identifier les gènes responsables de la perturbation de cycle cellulaire. - Allie les informations de génétiques aux données biomoléculaires des tumeurs - Ce projet conduit à l'établissement d'une « carte de la dépendance au cancer ». ⁷⁷ - Projet financé par plusieurs partenaires parmi lesquels on retrouve le <i>Cancer Target Discovery and Development</i> , l' <i>Achilles Consortium</i> , IBM, Novartis...
CTD2 ctd2.nci.nih.gov	CTD2 – ou <i>Cancer Target Discovery and Development</i> - Vise à comprendre l'hétérogénéité tumorale et la résistance médicamenteuse pour à terme établir des combinaisons efficaces de traitements anticancéreux. - Le portail CTD2 met à disposition les données brutes et d'analyses répertoriées. ⁷⁸ - Géré par le <i>National Cancer Institute</i>

Tableau 2. Liste référençant quelques bases de données de cibles biologiques et de maladies communément utilisées en Modélisation Moléculaire.

Conception de nouveaux ligands assistée par Modélisation Moléculaire

Une fois la cible d'intérêt modélisée, les méthodes de base pour la conception de nouveaux ligands passent généralement par :

- Des étapes de criblage virtuel (ou « screening *in silico* ») avec une exploration et une fouille des bases de données ;
- Des études de similarité pharmacophorique entre des ligands,
- L'analyse des interactions supramoléculaires entre le ligand de synthèse et la cible – soit une méthode de *docking*

Tout ceci étant modélisé en trois dimensions.

Préparation des bases de données :

Les bases de données de molécules constituent de véritables chimiothèques virtuelles. Leur fouille nécessite plusieurs niveaux de tri, à commencer par ce qui est recherché : données d'affinité, données d'activité, propriétés physicochimiques... Une fois l'acquisition faite d'une collection de molécules présentant un caractère d'intérêt commun et la base de données prête à être exploitée (qualité des informations vérifiées, molécules prétraitées...) on peut, selon la taille de la collection, procéder à du *Clustering* des molécules avant de se plonger dans l'observation et l'analyse des molécules retenues. En effet, si les molécules retenues sont nombreuses, il

conviendra de les classer dans différents groupes selon par exemple leur similarité moléculaire afin de ne pas se perdre dans une analyse de longue durée. Ce principe suit une notion couramment admise en chimie médicinale selon laquelle les activités des molécules sont permises par certains de leurs motifs.⁶¹

Bases de données des ligands :

En plus des chimiothèques internes aux laboratoires de chimie, des bases de données publiques et privées de molécules sont accessibles sur Internet et permettent d'obtenir des fichiers de ligands avec des caractéristiques structurales et/ou d'activité choisies. Le Tableau 3 suivant propose de lister quelques bases de données communément utilisées en Modélisation Moléculaire.

Nom de la base de données URL	Description
ChEMBL ebi.ac.uk/chembl	<ul style="list-style-type: none"> - Gérée par l'<i>European Bioinformatics Institute</i> - Répertoire des molécules testées <i>in vitro</i> et fournit notamment :⁷⁹ <ul style="list-style-type: none"> o Leur structure o Leurs données physico-chimiques o Leurs données pharmacologiques o Les références bibliographiques liées aux molécules o Des liens vers d'autres bases de données de chimie
PubChem pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	<ul style="list-style-type: none"> - Base de données de molécules associées à leurs bioactivités - Gérée par le <i>National Institute of Health</i>.⁸⁰
ChemSpider chemspider.com	<ul style="list-style-type: none"> - Base de données publique de produits chimiques recensant plus de 73 millions de molécules avec notamment leurs propriétés physico-chimiques et des informations de fournisseurs⁸¹ - Les ressources d'information tiennent de plus de 260 autres bases de données chimiques - Site géré par la <i>Royal Society of Chemistry</i>
ZINC zinc15.docking.org	<ul style="list-style-type: none"> - Base de données des composés chimiques commerciaux (près de 230 millions) disponibles « prêts à l'emploi » pour des études de chémoinformatique type screening virtuel⁸² - Cette plateforme est financièrement gérée par le <i>National Institute of General Medical Sciences</i>
eMolecules emolecules.com	Base de données commerciale de données de chimie et de biologie de molécules au service de programme de <i>Drug Discovery</i>
DrugBank drugbank.ca	<ul style="list-style-type: none"> - Répertoire les médicaments (actuels, en développement et retirés du marché) avec : <ul style="list-style-type: none"> o Leur mécanisme d'action o Les interactions qu'ils peuvent avoir en association o Leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.⁸³ - Supportée entre autres par le <i>Canadian Institute of Health Research</i> et <i>The Metabolics Innovation Center</i>.

Tableau 3. Liste référençant quelques bases de données de composés chimiques communément utilisées en Modélisation Moléculaire.

Analyse pharmacophorique :

L'analyse pharmacophorique consiste à identifier les motifs moléculaires essentiels responsables de l'activité biologique d'un ligand afin d'établir ce que l'on appelle un « pharmacophore », c'est-à-dire un patron des propriétés moléculaires devant être portées par une molécule, avec des informations spatiales quant à la disposition de ces propriétés moléculaires.

Les motifs moléculaires essentiels, nommés « motifs pharmacophoriques », sont au nombre de six et représentent des propriétés pouvant être possédées par des atomes ou des groupements fonctionnels*. Les six motifs pharmacophoriques essentiels sont :

- Motif accepteur de liaison hydrogène ;
- Motif donneur de liaison hydrogène ;
- Motif aromatique ;
- Motif hydrophobe ;
- Motif ionisable positivement ;
- Motif ionisable négativement.

Le Tableau 4 suivant propose des exemples de motifs pharmacophoriques pouvant être portés par des groupements fonctionnels.


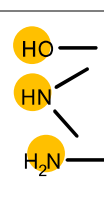

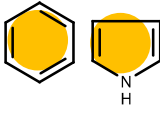
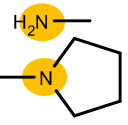
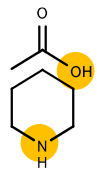
Accepteurs de liaison hydrogène	Donneurs de liaison hydrogène	Motifs hydrophobes	Motifs aromatiques	Motifs ionisables	
				Positivement	Négativement
					

Tableau 4. Exemples de groupements fonctionnels associés à des motifs pharmacophoriques, indiqué par la coloration orange.

L'analyse pharmacophorique vise donc à obtenir un patron moléculaire, définissant la position d'un motif pharmacophorique et son orientation par rapport à un second motif (données de distance et d'angles). Ainsi l'approche pharmacophorique vise à distinguer une partie « non essentielle » d'une molécule – à savoir son squelette – d'une partie « essentielle », comprenant les groupements porteurs d'un motif susceptible d'interagir avec le récepteur.

Concrètement, la mise au point d'un pharmacophore peut être entreprise de cette façon :

1. Acquisition des représentations tridimensionnelles des ligands référencés pour une activité souhaitée, avec pour chaque ligand une analyse conformationnelle.
2. Comparaison des similarités 3D entre les différentes conformations possibles des ligands choisis, et ceci par l'intermédiaire des logiciels de Modélisation Moléculaire.
3. Choix des hypothèses de pharmacophore selon des critères définis (nombre d'hypothèses, innovation structurale...).

Visuellement, le pharmacophore choisi prendra la forme de plusieurs sphères colorées. Ces sphères correspondront à l'ajustement spatial autorisé pour qu'un ligand ait *a priori* les propriétés biologiques souhaitées (voir Figure 9). Une fois le pharmacophore prêt, il suffira d'interroger la base de données précédemment créée pour identifier les molécules répondant aux exigences structurales définies par le pharmacophore.

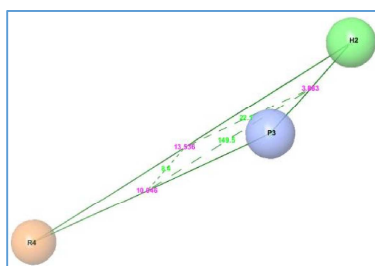


Figure 9. Exemple d'un pharmacophore à 3 motifs avec les données de distances et d'angles entre les motifs

L'ajustement au pharmacophore est quantifié au moyen d'une fonction nommée « *Fit* », permettant d'obtenir un « *Fitness score* ». Plus ce score pour une molécule est élevé, meilleur est l'ajustement de la molécule sur le pharmacophore.⁵⁸ Le pharmacophore utilisé sert ainsi de véritable « filtre moléculaire » pour une première sélection de *hits*.

D'un point de vue pratique, cette méthode est utilisée pour exploiter une base de données très volumineuse, dont l'examen manuel molécule par molécule s'avère peu envisageable.

Analyse par Docking :

L'analyse de base de données par *docking* est une simulation de l'amarrage des ligands dans le site actif de la potentielle cible. Ainsi, lors d'un *docking*, les logiciels

de modélisation moléculaire positionnent une molécule dans un site actif, et ce de façon à optimiser les interactions entre ces deux partenaires. Le positionnement du ligand dans le site actif se fait en regard des interactions stériques (forme et surface de contact) et des interactions régissant les contacts entre atomes (interaction de Van der Waals, interactions électrostatiques, contacts hydrophobes, interactions aromatiques, et chélation de métaux), de façon à toujours optimiser les structures des 2 partenaires en regard l'un de l'autre. Les logiciels de modélisation moléculaire calculent alors l'énergie libre associée au complexe Ligand-Macromolécule*, permettant d'attribuer un score à la simulation de *docking*.

Pour éviter une inspection trop longue de l'intégralité de sites de liaison de la protéine, on impose généralement au logiciel de Modélisation Moléculaire un site connu pour créer des liaisons avec des ligands (site catalytique, poche de liaison élucidée par analyse cristallographique ou RMN...), dans lequel il restera à positionner le(s) ligand(s).

Pour ce qui est du positionnement des ligands dans le site d'intérêt de la macromolécule, plusieurs approches sont possibles :

- Générer au préalable l'ensemble des conformères possibles pour chaque ligand et arrimer chacun des conformères de façon rigide dans le site ;
- Autoriser le logiciel à appréhender les ligands de façon flexible, afin de réaliser une sorte d'échantillonnage conformationnel au moment même du *docking*, pour ne mettre en évidence que les conformations les plus avantageuses énergiquement et stériquement en regard du complexe ligand-macromolécule.

Visuellement, le logiciel de modélisation moléculaire propose une représentation tridimensionnelle du complexe Ligand-Macromolécule et permet au manipulateur de juger *a priori* de la qualité de l'amarrage ou non (voir exemple Figure 10).

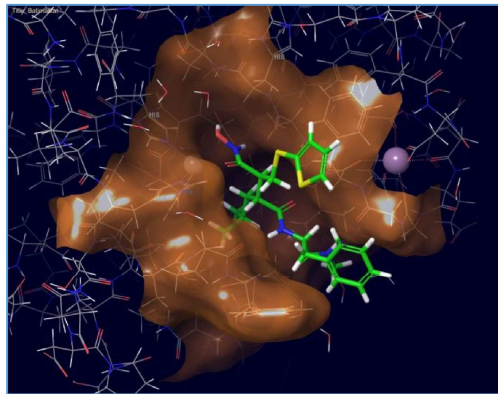


Figure 10. Représentation tridimensionnelle du complexe Batimastat_MT3-MMP (données de coordonnées provenant du complexe PDB ID 1RM8). En vert : le Batimastat. La zone orangée correspond à la surface moléculaire du site actif de MT3-MMP.

De la même façon que l'analyse pharmacophorique, le « *Docking score* » permet de classer les ligands entre eux selon la qualité de leur amarrage dans la macromolécule. Cette fois-ci le docking score correspond à l'énergie libre du complexe simulé, et plus celle-ci est faible, meilleur sera l'amarrage du ligand dans le site choisi de la macromolécule.

Cette approche permet, contrairement à l'approche pharmacophorique, de recueillir des données de compatibilité stérique sur les complexes ligand-protéine, et ainsi d'écartier les ligands qui *a priori* seront trop volumineux ou trop rigides pour prétendre à un développement comme candidat-médicament.

Analyse par Dynamique Moléculaire :

La Dynamique Moléculaire vise à simuler les mouvements des atomes au cours du temps. Les mouvements atomiques correspondent à des vibrations autour d'un minimum énergétique ou au passage d'un minimum à un autre minimum d'énergie. Globalement, les logiciels de Modélisation Moléculaire considèrent les atomes comme une masse dont le mouvement est déterminé par l'ensemble des forces qui s'exercent sur elle au cours du temps selon les lois de la mécanique classique Newtonienne.

La dynamique moléculaire permet de générer une « trajectoire », qui correspond à une succession de conformations moléculaires adoptées par le complexe ligand-protéine. De la même façon que les méthodes d'analyse précédentes, une fonction de *scoring* permet de classer les conformations moléculaires les unes par rapport aux autres en termes d'énergie libre.

La dynamique moléculaire est un apport supplémentaire (en plus du *docking*) pour la compréhension de résultats expérimentaux.

Pharmacomodulation assistée par Modélisation Moléculaire :

Les trois méthodes d'analyse en Modélisation Moléculaire (approche pharmacophorique, approche par *docking* et approche par dynamique moléculaire) donnent, avec des niveaux de précision croissant, des indications pour émettre des hypothèses de pharmacomodulation. En effet, si un échafaudage moléculaire est à première vue d'intérêt, alors une observation fine des représentations 3D proposées par le logiciel de modélisation moléculaire pourront permettre de proposer des pharmacomodulations afin d'habiller ou de modifier l'habillage de l'échafaudage en question.

La méthode de Perturbation de l'Énergie Libre (FEP, *Free Energy Perturbation*) permet une estimation de la variation d'énergie libre associée à un complexe Ligand-Macromolécule avant et après pharmacomodulation du ligand. Les calculs d'énergie libre sont faits par des outils de dynamique moléculaire, qui procèdent à une mutation progressive d'une molécule initiale vers une molécule modulée. D'un point de vue pratique, la valeur de la variation d'énergie libre est considérée selon sa position par rapport à la valeur au temps zéro. Une valeur positive de variation d'énergie libre indiquera que la pharmacomodulation n'apporte *a priori* pas de stabilité au complexe Ligand-Macromolécule. En revanche, une valeur négative elle permettra une première confirmation d'une hypothèse de pharmacomodulation *a priori* favorable à la stabilité du complexe étudié.

Etablissement des Relations Structure-Activité :

Les propriétés physico-chimiques et structurales d'une molécule étant déterminantes pour son comportement chimique, biologique et environnemental, leur compréhension et leur modélisation sont donc d'un intérêt majeur. Grâce au criblage de chimiothèques virtuelles, des millions de composés potentiels pour lesquels il n'y a pas de données expérimentales peuvent être conçus *in silico*. Bien que ces composés soient encore hypothétiques, leurs propriétés ou leurs activités biologiques peuvent être modélisées sur la base de modèles fiables. Souvent, des méthodes permettant d'estimer directement les propriétés d'un composé à partir de sa structure n'existent pas. Cependant, des méthodes indirectes, passant par la génération de modèles mathématiques reliant descripteurs moléculaires et propriétés sont couramment employées. Les modèles mathématiques se basent sur les descripteurs moléculaires de molécules connues associées à une propriété d'intérêt,

puis, par des procédés de régression linéaire, permettent d'extrapoler sur les propriétés de molécules pour lesquelles les données expérimentales ne sont pas disponibles. Ils permettent ainsi de procéder à une approche « Relation Structure-Activité » (RSA), qui vise à établir une relation quantitative entre la structure moléculaire d'un composé et son activité biologique selon l'équation suivante :

$$\text{Activité} = f(\text{structure})$$

Équation 1. Principe appliqué dans l'approche "Relation Structure-Activité"

Cette approche repose sur le principe énoncé précédemment selon lequel des structures chimiques similaires porteront des activités similaires.

Un logiciel utilisable gratuitement sur Internet, PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) permet, à partir d'une structure chimique, d'obtenir des prévisions d'activités biologiques (du domaine thérapeutique et toxicologique).⁸⁴ En effet, ce logiciel attribue à une structure chimique des probabilités d'activités sur différentes cibles et permet d'estimer avant toute expérimentation de biologie des affinités vis-à-vis de plusieurs cibles. Les algorithmes de calcul basent leurs données sur un set de plus de 260 000 molécules pour lesquelles les activités biologiques sont connues. Ce logiciel est consultable à l'adresse suivante : <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php>.

Contexte de la Conception de Ligands Inhibiteurs de MMP-24 au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie

Depuis 2016, le CERMN, sous la direction du Pr. Dallemagne, œuvre à concevoir et synthétiser des inhibiteurs sélectifs de MMP-24/MT5-MMP. L'objectif premier de ce projet a donc été de disposer d'information structurale concernant la cible visée : MT5-MMP. Ceci a été l'objet d'un stage de Master 2 réalisé en 2016 par M^{me} Saidoun.

Pour contourner le manque d'information sur la structure tridimensionnelle de MT5-MMP, M^{me} Saidoun a construit un modèle tridimensionnel du site catalytique de MT5-MMP. Pour ce faire, elle a réalisé des travaux de modélisation par homologie de MT5-MMP avec une structure du site catalytique de MT3-MMP co-cristallisée avec le Batimastat, inhibiteur de métalloprotéase matricielle (MMPi) à large spectre (PDB ID : 1RM8) (voir Figure 11). Comme énoncé précédemment, la structure tridimensionnelle des protéines est mieux conservée que leur séquence en acides aminés.⁶³ Ce postulat permet, *via* des mutations ponctuelles en acides aminés de protéines homologues, de disposer d'un modèle tridimensionnel des structures d'intérêt. Les protéines n'étant pas des systèmes immobiles dans le temps, elle a réalisé des simulations de dynamiques moléculaires sur le modèle pour disposer de cinq structures possibles du site actif de MT5-MMP.

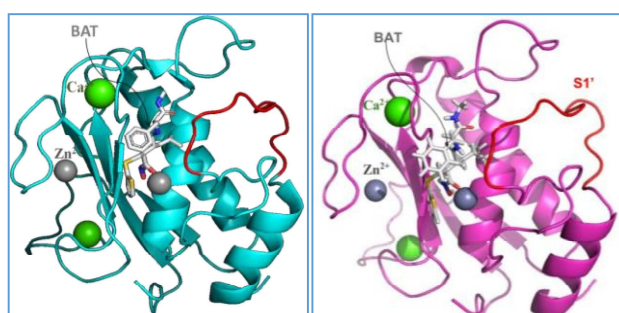


Figure 11. A gauche : Modélisation 3D du site catalytique de MT3-MMP co-cristallisé avec le Batimastat (PDB ID 1RM8). A droite : Modélisation par homologie de séquence de MT5-MMP à partir de MT3-MMP et docking du site actif avec le Batimastat

Par la suite, M^{me} Saidoun a criblé la chimiothèque du CERMN (18 362 molécules au moment de son criblage) sur les modèles du site catalytique de MT5-MMP. Après un choix de *hits* virtuels basé sur les *docking scores*, la diversité structurale (élucidée grâce à une méthode de *clustering*) et une inspection visuelle des poses de *docking* et des structures, 400 composés ont été envoyés à l'équipe du Pr. Santiago Rivera de l'Institut de Neurophysiopathologie de Marseille pour une

évaluation *in vitro* de l'activité des composés.ⁿ Cent composés ont été identifiés comme capables d'inhiber au moins 20% de l'activité enzymatique de MT5-MMP. Parmi ceux-ci, le composé SR1653, doué d'une capacité d'inhibition de l'activité de MT5-MMP d'au-moins 35% à 100 nM, a été choisi comme *hit* car ses groupements fonctionnels ne sont actuellement pas décrits dans la littérature comme des groupements portés par les MMPi référencés. Il a été entrepris sur ce *hit* des travaux de pharmacomodulations dont les modifications ont été guidées par Modélisation Moléculaire.^o

ⁿ Pour une explication brève du test biologique *in vitro* mené, voir Annexe n°7 : Test de l'évaluation *in vitro* de l'activité inhibitrice de MT5-MMP et MT1-MMP des composés synthétisés au CERMN.

^o Pour une explication détaillée de la démarche entreprise au CERMN, se référer à la Partie III de ce manuscrit.

Partie II

Place de la Modélisation Moléculaire dans la Conception de Nouveaux Principes Actifs

Conclusion et Perspectives de la Partie II

La Chémoinformatique est un outil précieux pour les projets de *Drug Design*, tant son étendue couvre de nombreuses étapes, précoces et plus tardives, du développement de nouveaux médicaments, et tant son coût et sa réalisation permet une multitude d'expérimentation avec des moyens matériels moindres comparés à d'autres domaines expérimentaux.

Son succès dans le domaine du *Drug Design* lui a permis d'étendre ses applications à d'autres disciplines, notamment en agroalimentaire, cosmétologie et plus largement en Chimie Analytique, plaçant désormais la Chémoinformatique au rang d'outil indispensable à tout projet impliquant de la Chimie.

Concernant le projet de conception de ligands inhibiteurs de MMP-24/MT5-MMP, la Chémoinformatique a permis de disposer d'informations structurales de la cible avant même que celles-ci ne soient disponibles expérimentalement. De plus, comme présenté dans la Partie III de ce manuscrit, la Chémoinformatique, et plus précisément la Modélisation Moléculaire, a permis de guider la suite de ce projet en permettant d'orienter des études de pharmacomodulation.

Partie III
Démarche de Conception de Ligands Inhibiteurs
de MMP-24

Partie III

Démarche de Conception de Ligands Inhibiteurs de MMP-24

Ce troisième chapitre a pour but de relater un travail de Modélisation Moléculaire réalisé au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN)^P sous la direction du Pr. Dallemagne et du Pr. Bureau. Ce travail a été l'objet de mon stage de Master 2 intégré au parcours Recherche de mes études de Pharmacie et a fait partie du cursus « Conception du Médicament ».

Comme énoncé dans les chapitres précédents, l'enjeu présenté ici vise à concevoir un nouveau ligand anti-Alzheimer inhibiteur d'une cible dont la structure tridimensionnelle est aujourd'hui inconnue : la Métalloprotéase Matricielle Transmembranaire MMP-24 ou MT5-MMP.

Ce travail de Chémoinformatique a été réalisé en collaboration avec la plateforme Chimie Organique et Médicinale du CERMN et avec l'Institut de Neurophysiopathologie de Marseille.

Voici le plan que suivra cette troisième Partie :

Partie III – Démarche de Conception de Ligands Inhibiteurs de MMP-24

Projet « Inhibition de MMP-24 » entrepris au CERMN

Etude structurale du site catalytique de MMP-24

Etude des hypothèses de liaison au site catalytique

Méthodologie

Résultats

Limites des expérimentations menées

Hypothèses de liaison Ligand-Cible

Sélectivité des ligands pour MT5-MMP en regard de MT1-MMP

Etudes de Relations Structure-Activité

Conclusion et Perspectives de la Partie III

^P Site de l'équipe de Recherche du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie : <http://cermn.unicaen.fr/>

Partie III

Place de la Modélisation Moléculaire dans la Conception de Nouveaux Principes Actifs

Glossaire des termes techniques employés dans la Partie III

M

Méthode PRCG : Méthode du Gradient Conjugué de Polak-Ribière. Il s'agit d'une méthode de minimisation de l'Energie de ligand se basant sur la méthode de dérivation de Polak-Ribière. C'est l'une des méthodes les plus efficace pour la minimisation de l'Energie d'une molécule mais qui ne permet pas de retrouver des états de transition.

Méthode SMPC : Méthode Systématique Pseudo-Monte Carlo. Méthode d'analyse conformationnelle permettant d'explorer toutes les valeurs de torsion de liaisons, même pour les torsions inhabituelles. Il s'agit de la méthode la plus efficace pour les petites molécules.

Projet “Inhibition de MMP-24” entrepris au CERMN

L'objectif des expériences *in silico* menées dans ce projet a été de conjuguer des données d'affinité *in vitro* et des données de simulations de *dockings* et de dynamiques moléculaires afin de comprendre et d'expliquer l'affinité d'un dérivé vs un autre dérivé, et de proposer des hypothèses de pharmacomodulation des ligands pour s'orienter vers une conception rationnelle de nouveaux ligands inhibiteurs de MMP-24.

Le schéma proposé en Figure 12 résume les différentes étapes de la démarche entreprise au CERMN pour la conception de ligands inhibiteurs de MMP-24. L'exposé suivant ne détaillera que la méthodologie employée en Chémoinformatique. Ce projet faisant actuellement l'objet d'une thèse de doctorat, les molécules conçues sont encore sous le sceau de la confidentialité et ne peuvent être montrées dans ce manuscrit. De même, les résultats biologiques associés aux structures des molécules sont eux-aussi confidentiels et ne peuvent être reportés dans ce manuscrit.

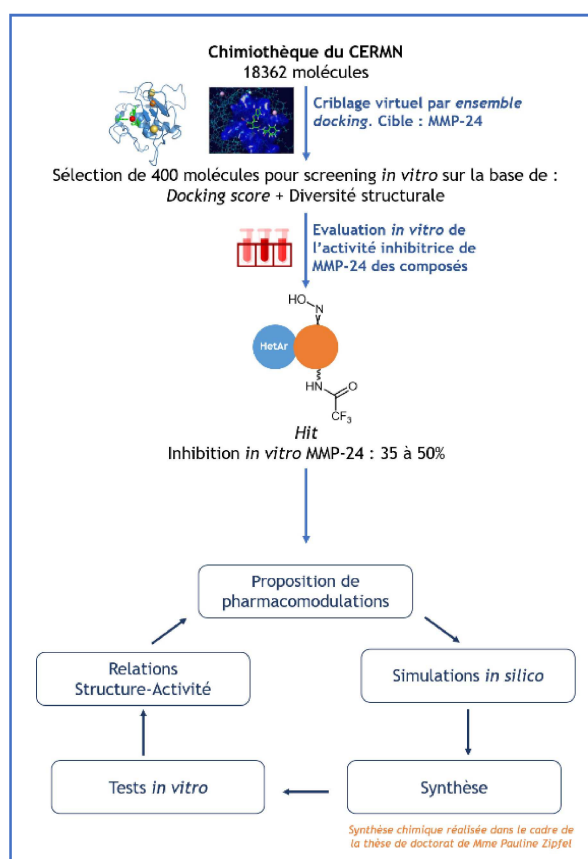


Figure 12. Démarche générale effectuée au CERMN pour la conception de ligands inhibiteurs de MMP-24

Etude structurale du site catalytique de MMP-24

Afin de mener un projet de *structure-based drug design*, il a été nécessaire de mener une étude structurale de l'environnement du site actif, permettant ensuite de mieux appréhender les interactions Ligand-Cible.^{85,86} Celle-ci a permis de s'enquérir de la structure primaire des sites de liaison possiblement envisageables pour les ligands développés. Cela a mené à l'identification des poches de liaison proches du zinc catalytique (voir Figure 13).

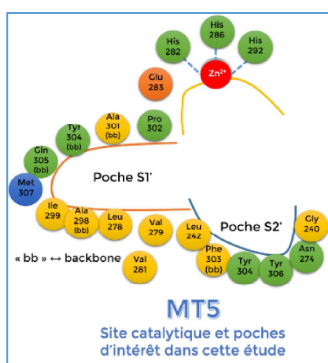


Figure 13. Représentation schématique des résidus constituant les zones clés du site catalytique de MMP-24

La nomenclature standard adoptée pour identifier les zones d'intérêt d'un site actif d'une protéase tient de sa complémentarité avec son substrat. Le site actif de la protéase est composé de sous-sites situés de chaque côté du site catalytique de l'enzyme. Chacun des sites du substrat interagissant avec les sous-sites de l'enzyme est nommé « P » et est numéroté en miroir de la zone de clivage : P1, P2, P3... côté N-terminal et P1', P2', P3'... côté C-terminal. De la même façon, chacun des sous-sites est nommé « S » et est numéroté en miroir du substrat : S3, S2, S1, S1', S2', S3'... (Voir schéma Figure 14).

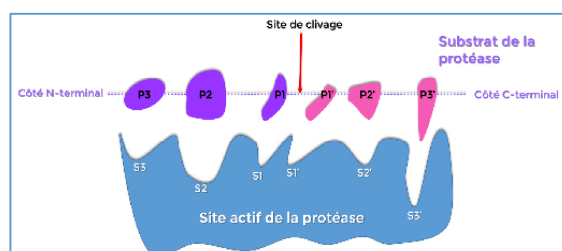


Figure 14. Schéma d'interaction protéase-substrat illustrant la nomenclature des zones d'interaction clés

Ainsi, les zones clés identifiées et retenues pour cette étude sont :

- L'atome de Zinc catalytique, dont les propriétés électrostatiques font de lui un atout pour le maintien de la liaison des ligands à la protéine ;⁸⁷

- La poche S1', profonde, poche de choix dans la conception de MMPi de par sa flexibilité et sa profondeur qui diffère d'une MMP à une autre ;^{88,89,90,23}
- La poche S2', très exposée au solvant et peu profonde, pouvant tout de même engager des interactions clés avec des ligands.

Etude des hypothèses de liaison au site catalytique

Méthodologie

Etude des interactions Ligand-Cible par *docking*

Les études d'hypothèse de liaison ont toutes commencé par des études de *docking*.

Conformation de la cible :

Mme Saidoun avait, au cours de son stage, sélectionné 5 conformations différentes de MT5-MMP (nommées « n69 », « n140 », « n180 », « n208 », « n224 ») suite à une étude de dynamique moléculaire. Ainsi, un travail préliminaire a consisté à ne retenir qu'une seule conformation de MT5-MMP pour les études ultérieures afin de pouvoir comparer entre elles les différentes hypothèses émises. Pour ce faire, nous avons comparé les fréquences d'apparition de chacune des conformations du site catalytique de MT5-MMP lors de l'ensemble *docking* des ligands issus de la chimiothèque du CERMN réalisé par Mme Saidoun et nous avons conservé la conformation dont la fréquence d'utilisation est la plus élevée. Ainsi, la conformation de MT5-MMP retenue pour toutes les analyses par *docking* est celle nommée « **n140** ». La conformation retenue correspond à une conformation où la poche S1' est la plus ouverte, permettant un plus grand nombre de pharmacomodulations. De la même façon avec MT1-MMP, la conformation retenue est celle nommée « **n203** ». (Voir Annexe n°9 : Choix d'une conformation de MT5-MMP et MT1-MMP).

Conformation des ligands :

Les ligands sont, avant toute analyse, minimisés (avec le module de mécanique moléculaire MacroModel de la suite Schrödinger®, champ de force OPLS_2005, sans solvant et en méthode PRCG). Puis une analyse conformationnelle est lancée sur chaque ligand minimisé afin de ne retenir que la conformation de plus basse énergie potentielle (avec l'outil MacroModel également, champ de force OPLS_2005, sans solvant et en méthode SPMC). Le paramétrage des ligands pour l'analyse par *docking* est « flexible ».

Précision de l'analyse :

Les analyses par *docking* sont lancées en *standard precision*.

Résultats

Hypothèse de liaison Ligand-Cible n° 1

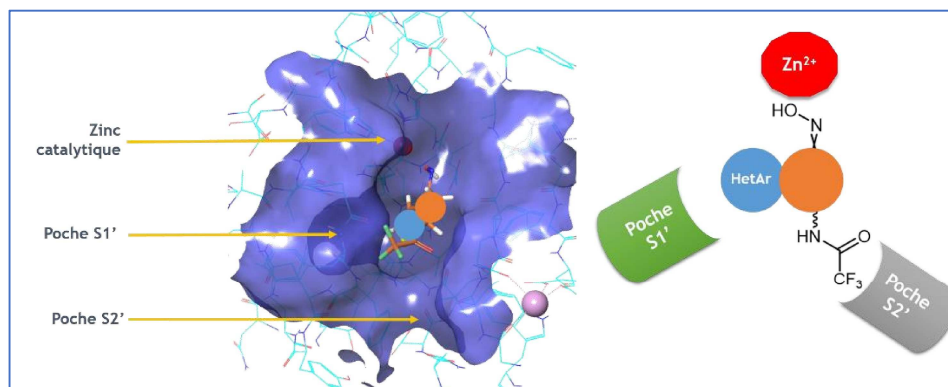


Figure 15. Représentations 3D et 2D - Hypothèse de liaison n°1
(Orange -> Hit ; Bleu ciel -> Résidus du site catalytique ; Bleu -> Surface de liaison)

L'hypothèse de liaison n°1, représentée sur la Figure 15, place l'oxime comme *Zinc Binding Group* (ZBG) et montre la substitution possible du bicyclic central permettant de projeter un substituant vers la poche S1'. De plus, cette hypothèse de liaison montre que le carbone asymétrique portant le trifluoroacétamide peut ou non, selon sa configuration, projeter ce groupement vers la poche S2'.

Cette hypothèse de liaison a permis de suggérer la synthèse d'une première série de dérivés, soit celle du bicyclic central substitué par un phényl, substitué ou non (voir Figure 16). De plus, il a été mis en lumière l'importance de la séparation des énantiomères R/S et des énantiomères E/Z avant de procéder aux tests biologiques, afin de préciser au mieux les études de Relations Structure-Activité.

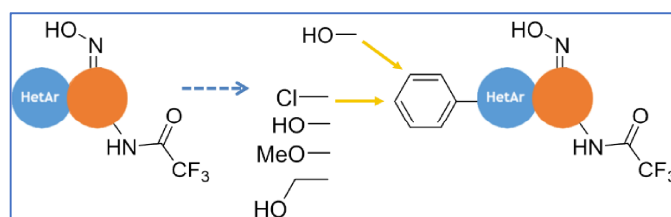


Figure 16. Modifications structurales suggérées après établissement de la première hypothèse de liaison

Hypothèse de liaison Ligand-Cible n° 2

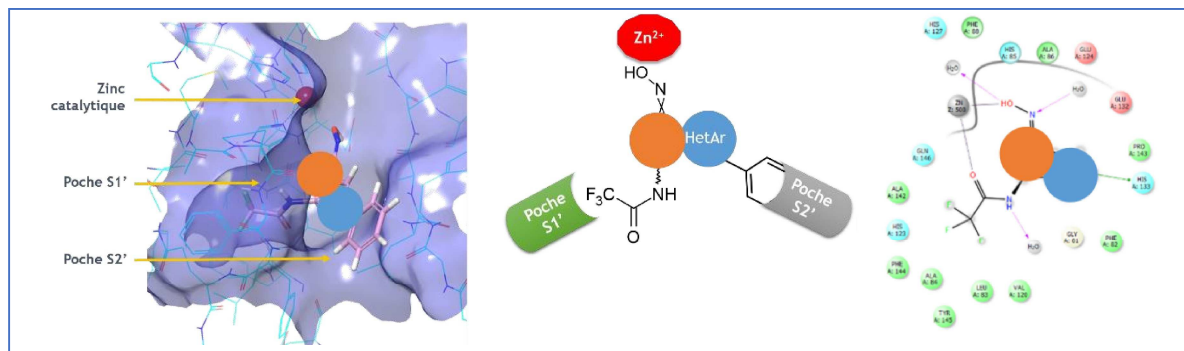


Figure 17. Représentations 3D et 2D - Hypothèse de liaison n°2
(Rose -> Hit ; Bleu ciel -> Résidus du site catalytique ; Bleu -> Surface de liaison)

L'hypothèse de liaison n°2 représentée sur la Figure 17 place :

- L'oxime comme ZBG ;
- Le trifluoroacétamide comme occupant la poche S1' ;
- Le substituant phényl comme projetant vers la poche S2'.

De plus, cette hypothèse permet d'envisager un autre mode de chélation du zinc que celui engagé par l'oxime seul. En effet, dans la pose de *Docking** présentée sur la droite de la Figure 17, on peut constater que le carbonyle porté par le substituant trifluoroacétamide est à une distance compatible une chélation bidentate du zinc (par l'oxygène du carbonyle et l'oxygène de l'oxime).

Cette hypothèse de liaison a permis la synthèse d'une seconde famille de dérivés, remplaçant le trifluorométhyle par des dérivés variés pouvant occuper la poche S1' (voir Figure 18).

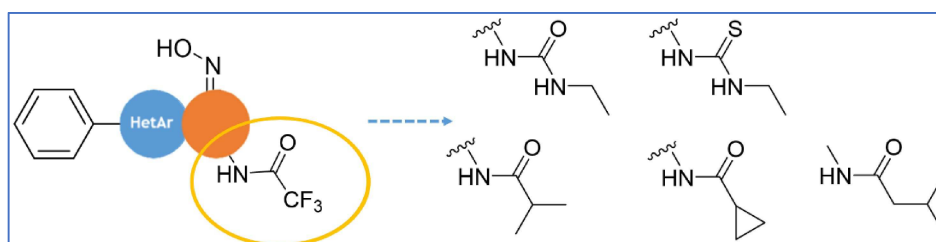


Figure 18. Modifications structurales suggérées après établissement de la deuxième hypothèse de liaison

Les 2 premières hypothèses de liaison présentées mettent en avant la nécessité de séparation énantiomérique des composés. En effet, les *docking scores* varient d'un énantiomère à un autre. Par exemple, le composé substitué par un phényl seul voit son *docking score* passer de -6,7 à -5,5 si son carbone asymétrique passe de la configuration R à la configuration S. Ceci s'explique par un changement de mode de liaison à la cible :

- Dans la configuration R, ce composé se lie à MT5-MMP selon l'hypothèse de liaison n°1 et engage des interactions avec les résidus de la poche S1' par l'intermédiaire de son phényle ;
- Dans la configuration S, ce composé se lie à MT5-MMP selon l'hypothèse de liaison n°2 et n'engage aucune interaction avec les résidus de la poche S1', la perte d'interaction faisant chuter son *docking score* par rapport à son énantiomère.

De la même façon que pour les analyses de *docking*, les analyses par dynamique moléculaire (*données non présentées*) favorisent, de par leur score, à chaque fois l'hypothèse de liaison n°1, dans laquelle un plus grand nombre d'interactions ligand-cible sont retrouvées de par le remplissage de la poche S1' par le phényle. De même, les analyses par simulation de perturbation de l'énergie libre (*données non présentées*) qui ont été lancées pour étudier l'influence des modulations suggérées après établissement de l'hypothèse de liaison n°2 ont montré des scores favorables à celles-ci si la liaison s'établissait selon l'hypothèse n°1.

Hypothèse de liaison Ligand-Cible n° 3

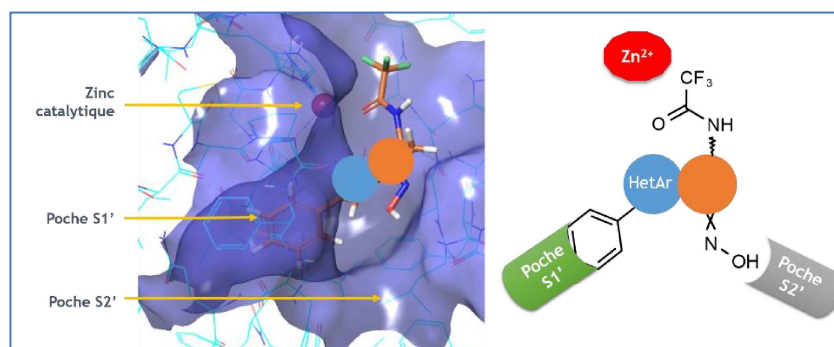


Figure 19. Représentations 3D et 2D - Hypothèse de liaison n°3
(Orange -> Hit ; Bleu ciel -> Résidus du site catalytique ; Bleu -> Surface de liaison)

L'hypothèse de liaison n°3 représentée sur la Figure 19, place cette fois-ci le carbonyle comme ZBG, l'oxime occupant la poche S2' et le phényle dans la poche S1'.

Ainsi, pour évaluer l'importance de la présence de l'oxime dans la chélation du zinc, il a été suggéré la synthèse de dérivés substitués au niveau de l'oxime, mais également d'un dérivé dépourvu d'oxime (voir Figure 20).

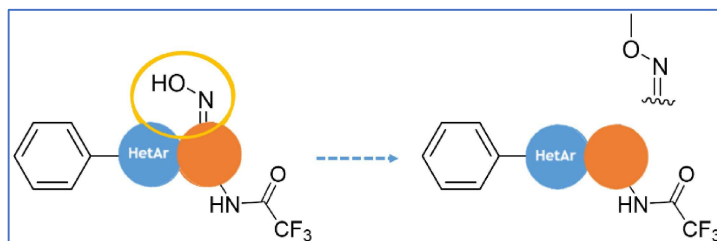


Figure 20. Modifications structurales suggérées après établissement de la 3^{ème} hypothèse de liaison

Limites des expérimentations menées

Hypothèses de liaison Ligand-Cible

Les hypothèses de liaison Ligand-Cible présentées ci-après ont toutes pris en compte la chélation du zinc catalytique par tous les composés. En effet, la présence de cet atome métallique dans le site actif de la protéine d'intérêt est un élément clé car ses propriétés électroniques permettent des liaisons électrostatiques très fortes avec les hypothétiques ligands. De plus, le composé choisi comme *hit* porte entre autres une fonction oxime. Si celle-ci s'avérait capable de chélater le zinc, alors cela permettrait de mettre en lumière un nouveau groupe fonctionnel chélateur du zinc (ZBG, *Zinc Binding Group*) jusqu'alors non répertorié.^{91,9} Cependant, cet atome de zinc est présent dans toutes les autres MMP ainsi que dans toutes les autres Métalloprotéases, plus généralement (tels que l'enzyme de conversion de l'Angiotensine).^{92,27} Il faut alors être conscient que cette chélation du zinc, confortable pour la création de complexes Ligands-Macromolécules, risque d'entraîner des problèmes de manque de sélectivité. Cependant il s'agit ici d'un développement précoce de nouveaux ligands, ainsi le but premier est d'obtenir un début d'affinité pour la cible souhaitée, pour ensuite s'enquérir des éventuelles affinités vis-à-vis d'autres cibles.

Sélectivités des ligands pour MT5-MMP en regard de MT1-MMP

Pour tenter de contourner le potentiel manque de sélectivité des ligands développés, une étude menée en parallèle des études d'interaction ligand-récepteur a tenté d'identifier clairement les potentiels sites d'interaction pouvant être atteints par les ligands à proximité du zinc catalytique, et pouvant possiblement expliquer certains résultats biologiques quant à une touche de sélectivité vis-à-vis MT5-MMP en regard de MT1-MMP. Cependant, les modèles de MT5-MMP et MT1-MMP dont nous disposons, tous deux bâtis par homologie avec MT3-MMP, voient certains de leurs résidus artificiellement alignés. Ainsi, certaines informations structurales pouvant être cruciales sont possiblement perdues.⁶³

⁹ Voir annexe n°8 : Les *Zinc Binding Groups* (ZBG) les plus fréquemment retrouvés.

Contrairement à MT5-MMP, la PDB dispose d'informations tridimensionnelles quant à la structure de MT1-MMP. Plusieurs entrées sont en effet disponibles sur la structure 3D de MT1-MMP, toutes co-cristallisant le site actif avec un TIMP (Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéases). Les TIMP, de structure peptidique, sont peu comparables structurellement aux ligands conçus dans ce projet. De ce fait, la co-cristallisation MMP-TIMP induit des structures tridimensionnelles de la protéase différentes de celles induites par une liaison de la protéase avec un inhibiteur synthétique. Ainsi, lors de la modélisation de MT1-MMP par homologie avec MT3-MMP cocrystallisé avec le Batimastat, des informations quant à l'orientation de certains résidus de la poche S1' de MT1-MMP semblent avoir été modifiées.

De plus, les inhibiteurs sélectifs des MMP décrits (sélectifs notamment vis-à-vis de MMP-13) sont des molécules de grande taille ne chélatant pas l'atome de zinc catalytique, peu comparables avec les molécules proposées dans cette étude. Ainsi une seconde étude parallèle est actuellement menée pour étudier un autre potentiel site de liaison à MT5-MMP, s'affranchissant de la liaison au zinc catalytique et visant à augmenter la taille des ligands potentiels.

Etudes de Relations Structure-Activité

Les tests *in vitro* menés sur les ligands développés au Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille ne sont pas des tests automatisés permettant un screening rapide des composés (la durée du test est de l'ordre de 1 heure par composé) (pour explication du test *in vitro* mené, voir Annexe n°7 : Test de l'évaluation *in vitro* de l'activité inhibitrice de MT5-MMP et MT1-MMP des composés synthétisés). De plus, au-delà de la longue durée imposée par le test biologique, les résultats se sont avérés difficilement répétables pour un même composé, rendant les hypothèses de Relations Structure-Activité peu robustes.

Conclusion et Perspectives de la Partie III

Ce travail de conception de composés assistée par la modélisation moléculaire a permis de disposer d'un *hit* et de le pharmacomoduler au sein de plusieurs séries.

Les hypothèses de liaison ont toutes pris en compte une chélation de l'atome de zinc catalytique. Des analyses *in silico* quant à une liaison ligand-cible dénuée de chélation de l'atome de zinc sont en cours. De plus, des manipulations au CERMN sont actuellement en cours pour une analyse spectroscopique suite à la mise en présence des ligands synthétisés avec du zinc pour conclure sur la capacité ou non des composés à chélater un atome de zinc.

Selon les résultats biologiques et analytiques qui suivront, les pharmacomodulations ultérieures des composés suivront les hypothèses de liaison associées aux meilleurs résultats d'inhibition et de chélation.

Ce travail a fait l'objet d'une présentation par affiche lors d'un congrès alliant les 32^{èmes} Journées Franco-Belges de Chimie Thérapeutique et 26^{èmes} Rencontres Internationales des Pharmacochimistes de l'Arc Atlantique à Asnelles-sur-Mer en Juin 2018.^r

^r Une version miniature de l'affiche est consultable en annexe n°10 : Poster.

Conclusion

Ce manuscrit a, au travers de ses deux premiers chapitres, explicité une nouvelle famille de protéines d'intérêt dans la Maladie d'Alzheimer, les Métalloprotéases Matricielles Transmembranaires, et montré comment une nouvelle cible médicamenteuse peut être exploitée précocement en Chimie Thérapeutique grâce à l'outil informatique. Il a dans son dernier chapitre illustré les propos précédemment énoncés par l'exposé d'une démarche concrète de développement précoce de nouveaux principes actifs d'intérêt au Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN).

En effet, suite à l'identification d'une nouvelle sécrétase impliquée dans la Maladie d'Alzheimer, la MMP-24 ou MT5-MMP, différentes étapes de *Drug Design* ont été menées au CERMN :

- Il a été construit un modèle tridimensionnel de son site actif ;
- Ce modèle a ensuite été exploité pour le criblage de la Chimiothèque du CERMN et l'identification de nouveaux *hits* ;
- Puis ce modèle a été utilisé à des fins de pharmacomodulation et d'exploration des Relations Structure-Activité des différentes familles de composés synthétisés.

Si ces nouvelles molécules conçues et synthétisées s'avéraient efficaces *in vitro*, alors ce développement précoce ouvrirait la voie de la suite du développement de nouveaux médicaments, à savoir des premiers essais de formulation associés à des tests *in vivo*.

Remerciements :

Le projet « Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs de MT5-MMP d'intérêt potentiel dans la Maladie d'Alzheimer » a été cofinancé par l'Union Européenne sous le programme opérationnel « FEDER-FSE 2014-2020 » et par la Région Normandie, et supporté par FRANCE ALZHEIMER.

Annexes

Annexes

- Annexe n°1 : Nomenclature des Enzymes
- Annexe n° 2 : Liste des MMP identifiées à ce jour
- Annexe n° 3 : Rôles des MMP dans les maladies neurodégénératives
- Annexe n°4 : Mini Mental State Examination
- Annexe n°5 : Voies de signalisation liées à la Maladie d'Alzheimer
- Annexe n°6 : Recommandations Vidal® pour la prise en charge de la Maladie d'Alzheimer
- Annexe n°7 : Test de l'évaluation *in vitro* de l'activité inhibitrice de MT5-MMP et MT1-MMP des composés synthétisés au CERMN
- Annexe n°8 : Les *Zinc Binding Groups* (ZBG) les plus fréquemment retrouvés
- Annexe n°9 : Choix d'une conformation de MT5-MMP et MT1-MMP
- Annexe n°10 : Poster

Annexe n° 1 : Nomenclature des Enzymes

Document issu de l' « ENZYME nomenclature database », mise à disposition par le SIB (Swiss Institute of Bioinformatics ; Genève, Suisse) et consultable sur le serveur ExpASY* sur <https://enzyme.expasy.org/> (date de consultation : 15/05/2019).

1. -- Oxidoreductases.
 1. 1. -- Acting on the CH-OH group of donors.
 1. 1. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 1. 1. 2.- With a cytochrome as acceptor.
 1. 1. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 1. 4.- With a disulfide as acceptor.
 1. 1. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
 1. 1. 9.- With a copper protein as acceptor.
 1. 1.98.- With other, known, acceptors.
 1. 1.99.- With other acceptors.
 1. 2. -- Acting on the aldehyde or oxo group of donors.
 1. 2. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 1. 2. 2.- With a cytochrome as acceptor.
 1. 2. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 2. 4.- With a disulfide as acceptor.
 1. 2. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
 1. 2. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
 1. 2.98.- With other, known, acceptors.
 1. 2.99.- With other acceptors.
 1. 3. -- Acting on the CH-CH group of donors.
 1. 3. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 1. 3. 2.- With a cytochrome as acceptor.
 1. 3. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 3. 4.- With a disulfide as acceptor.
 1. 3. 5.- With a quinone or related compound as acceptor.
 1. 3. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
 1. 3. 8.- With a flavin as acceptor.
 1. 3.98.- With other, known, acceptors.
 1. 3.99.- With other acceptors.
 1. 4. -- Acting on the CH-NH(2) group of donors.
 1. 4. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 1. 4. 2.- With a cytochrome as acceptor.
 1. 4. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 4. 4.- With a disulfide as acceptor.
 1. 4. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
 1. 4. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
 1. 4. 9.- With a copper protein as acceptor.
 1. 4.98.- With other, known, acceptors.
 1. 4.99.- With other acceptors.
 1. 5. -- Acting on the CH-NH group of donors.
 1. 5. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 1. 5. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 5. 4.- With a disulfide as acceptor.
 1. 5. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
 1. 5. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
 1. 5. 8.- With a flavin as acceptor.
 1. 5.98.- With other, known, acceptors.
 1. 5.99.- With other acceptors.
 1. 6. -- Acting on NADH or NADPH.
 1. 6. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 1. 6. 2.- With a heme protein as acceptor.
 1. 6. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 6. 4.- With a disulfide as acceptor.
 1. 6. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
 1. 6. 6.- With a nitrogenous group as acceptor.
 1. 6. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
 1. 6. 8.- With a flavin as acceptor.
 1. 6.99.- With other acceptors.
 1. 7. -- Acting on other nitrogenous compounds as donors.
 1. 7. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 1. 7. 2.- With a cytochrome as acceptor.
 1. 7. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 7. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
 1. 7. 6.- With a nitrogenous group as acceptor.
 1. 7. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
 1. 7. 9.- With a copper protein as acceptor.
 1. 7.99.- With other acceptors.
 1. 8. -- Acting on a sulfur group of donors.
 1. 8. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 1. 8. 2.- With a cytochrome as acceptor.
 1. 8. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 8. 4.- With a disulfide as acceptor.
 1. 8. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
 1. 8. 6.- With a nitrogenous group as acceptor.
 1. 8. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
 1. 8.98.- With other, known, acceptors.
 1. 8.99.- With other acceptors.
 1. 9. -- Acting on a heme group of donors.
 1. 9. 3.- With oxygen as acceptor.
 1. 9. 6.- With a nitrogenous group as acceptor.
 1. 9.98.- With other, known, acceptors.
 1. 9.99.- With other acceptors.
 - 1.10. -- Acting on diphenols and related substances as donors.
 - 1.10. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 - 1.10. 2.- With a cytochrome as acceptor.
 - 1.10. 3.- With oxygen as acceptor.
 - 1.10. 5.- With a quinone or related compound as acceptor.
 - 1.10. 9.- With a copper protein as acceptor.
 - 1.10.98.- With other, known, acceptors.
 - 1.10.99.- With other acceptors.
 - 1.11. -- Acting on a peroxide as acceptor.
 - 1.11. 1.- Peroxidases.
 - 1.11. 2.- With H(2)O(2) as acceptor, one oxygen atom of which is incorporated into the product.
 - 1.12. -- Acting on hydrogen as donors.
 - 1.12. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
 - 1.12. 2.- With a cytochrome as acceptor.
 - 1.12. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
 - 1.12. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
 - 1.12.98.- With other, known, acceptors.
 - 1.12.99.- With other acceptors.
 - 1.13. -- Acting on single donors with incorporation of molecular oxygen (oxygenases). The oxygen incorporated need not be derived from O(2).
 - 1.13. 1.- With NADH or NADPH as one donor.
 - 1.13.11.- With incorporation of two atoms of oxygen.
 - 1.13.12.- With incorporation of one atom of oxygen (internal monooxygenases or internal mixed function oxidases).
 - 1.13.99.- Miscellaneous.
 - 1.14. -- Acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen. The oxygen incorporated need not be derived from O(2).
 - 1.14. 1.- With NADH or NADPH as one donor.
 - 1.14. 2.- With ascorbate as one donor.
 - 1.14. 3.- With reduced pteridine as one donor.
 - 1.14.11.- With 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors.
 - 1.14.12.- With NADH or NADPH as one donor, and incorporation of two atoms of oxygen into one donor.
 - 1.14.13.- With NADH or NADPH as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.
 - 1.14.14.- With reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.
 - 1.14.15.- With reduced iron-sulfur protein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.
 - 1.14.16.- With reduced pteridine as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.
 - 1.14.17.- With reduced ascorbate as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.
 - 1.14.18.- With another compound as one donor, and incorporation of one atom of oxygen.
 - 1.14.19.- With oxidation of a pair of donors resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water.

- 1.14.20.- With 2-oxoglutarate as one donor, and the other dehydrogenated.
- 1.14.21.- With NADH or NADPH as one donor, and the other dehydrogenated.
- 1.14.99.- Miscellaneous.
- 1.15. -- Acting on superoxide as acceptor.
- 1.15. 1.- Acting on superoxide as acceptor.
- 1.16. -- Oxidizing metal ions.
- 1.16. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
- 1.16. 3.- With oxygen as acceptor.
- 1.16. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
- 1.16. 8.- With a flavin as acceptor.
- 1.16. 9.- With a copper protein as acceptor.
- 1.16.98.- With other known acceptors.
- 1.17. -- Acting on CH or CH(2) groups.
- 1.17. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
- 1.17. 2.- With a cytochrome as acceptor.
- 1.17. 3.- With oxygen as acceptor.
- 1.17. 4.- With a disulfide as acceptor.
- 1.17. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
- 1.17. 7.- With an iron-sulfur protein as acceptor.
- 1.17. 8.- With a flavin as acceptor.
- 1.17.98.- With other, known, acceptors.
- 1.17.99.- With other acceptors.
- 1.18. -- Acting on iron-sulfur proteins as donors.
- 1.18. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
- 1.18. 2.- With dinitrogen as acceptor.
- 1.18. 3.- With H(+) as acceptor.
- 1.18. 6.- With dinitrogen as acceptor.
- 1.18.96.- With other, known, acceptors.
- 1.18.99.- With H(+) as acceptor.
- 1.19. -- Acting on reduced flavodoxin as donor.
- 1.19. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
- 1.19. 6.- With dinitrogen as acceptor.
- 1.20. -- Acting on phosphorus or arsenic in donors.
- 1.20. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
- 1.20. 2.- With a cytochrome as acceptor.
- 1.20. 4.- With disulfide as acceptor.
- 1.20. 9.- With a copper protein as acceptor.
- 1.20.98.- With other, known acceptors.
- 1.20.99.- With other acceptors.
- 1.21. -- Catalyzing the reaction X-H + Y-H = 'X-Y'.
- 1.21. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
- 1.21. 3.- With oxygen as acceptor.
- 1.21. 4.- With a disulfide as acceptor.
- 1.21.98.- With other, known acceptors.
- 1.21.99.- With other acceptors.
- 1.22. -- Acting on halogen in donors.
- 1.22. 1.- With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.
- 1.23. -- Reducing C-O-C group as acceptor.
- 1.23. 1.- With NADH or NADPH as donor.
- 1.23. 5.- With a quinone or similar compound as acceptor.
- 1.97. -- Other oxidoreductases.
- 1.97. 1.- Other oxidoreductases.
- 1.98. -- Enzymes using H(2) as reductant.
- 1.98. 1.- Other oxidoreductases.
- 1.99. -- Other enzymes using O(2) as oxidant.
- 1.99. 1.- Hydroxylases.
- 1.99. 2.- Oxygenases.
2. -- Transferases.
2. 1. -- Transferring one-carbon groups.
2. 1. 1.- Methyltransferases.
2. 1. 2.- Hydroxymethyl-, formyl- and related transferases.
2. 1. 3.- Carboxy- and carbamoyltransferases.
2. 1. 4.- Amidinotransferases.
2. 1. 5.- Methylene transferases.
2. 2. -- Transferring aldehyde or ketonic groups.
2. 2. 1.- Transketolases and transaldolases.
2. 3. -- Acyltransferases.
2. 3. 1.- Transferring groups other than amino-acyl groups.
2. 3. 2.- Aminoacyltransferases.
2. 3. 3.- Acyl groups converted into alkyl groups on transfer.
2. 4. -- Glycosyltransferases.
2. 4. 1.- Hexosyltransferases.
2. 4. 2.- Pentosyltransferases.
2. 4.99.- Transferring other glycosyl groups.
2. 5. -- Transferring alkyl or aryl groups, other than methyl groups.
2. 5. 1.- Transferring alkyl or aryl groups, other than methyl groups.
2. 6. -- Transferring nitrogenous groups.
2. 6. 1.- Transaminases.
2. 6. 2.- Amidinotransferases.
2. 6. 3.- Oximinotransferases.
2. 6.99.- Transferring other nitrogenous groups.
2. 7. -- Transferring phosphorus-containing groups.
2. 7. 1.- Phosphotransferases with an alcohol group as acceptor.
2. 7. 2.- Phosphotransferases with a carboxy group as acceptor.
2. 7. 3.- Phosphotransferases with a nitrogenous group as acceptor.
2. 7. 4.- Phosphotransferases with a phosphate group as acceptor.
2. 7. 5.- Phosphotransferases with regeneration of donors, apparently catalyzing intramolecular transfers.
2. 7. 6.- Diphosphotransferases.
2. 7. 7.- Nucleotidyltransferases.
2. 7. 8.- Transferases for other substituted phosphate groups.
2. 7. 9.- Phosphotransferases with paired acceptors.
2. 7.10.- Protein-tyrosine kinases.
2. 7.11.- Protein-serine/threonine kinases.
2. 7.12.- Dual-specificity kinases (those acting on Ser/Thr and Tyr residues).
2. 7.13.- Protein-histidine kinases.
2. 7.14.- Protein-arginine kinases.
2. 7.99.- Other protein kinases.
2. 8. -- Transferring sulfur-containing groups.
2. 8. 1.- Sulfurtransferases.
2. 8. 2.- Sulfotransferases.
2. 8. 3.- CoA-transferases.
2. 8. 4.- Transferring alkylthio groups.
2. 9. -- Transferring selenium-containing groups.
2. 9. 1.- Selenotransferases.
- 2.10. -- Transferring molybdenum- or tungsten-containing groups.
- 2.10. 1.- Molybdenumtransferases or tungstenttransferases with sulfide groups as acceptors.
3. -- Hydrolases.
3. 1. -- Acting on ester bonds.
3. 1. 1.- Carboxylic ester hydrolases.
3. 1. 2.- Thiolester hydrolases.
3. 1. 3.- Phosphoric monoester hydrolases.
3. 1. 4.- Phosphoric diester hydrolases.
3. 1. 5.- Triphosphoric monoester hydrolases.
3. 1. 6.- Sulfuric ester hydrolases.
3. 1. 7.- Diphosphoric monoester hydrolases.
3. 1. 8.- Phosphoric triester hydrolases.
3. 1.11.- Exodeoxyribonucleases producing 5'-phosphomonoesters.
3. 1.12.- Exodeoxyribonucleases producing 3'-phosphomonoesters.
3. 1.13.- Exoribonucleases producing 5'-phosphomonoesters.
3. 1.14.- Exoribonucleases producing 3'-phosphomonoesters.
3. 1.15.- Exonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5'-phosphomonoesters.
3. 1.16.- Exonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 3'-phosphomonoesters.
3. 1.21.- Endodeoxyribonucleases producing 5'-phosphomonoesters.
3. 1.22.- Endodeoxyribonucleases producing other than 5'-phosphomonoesters.
3. 1.23.- Site specific endodeoxyribonucleases: cleavage is sequence specific.
3. 1.24.- Site specific endodeoxyribonucleases: cleavage is not sequence specific.
3. 1.25.- Site-specific endodeoxyribonucleases specific for altered bases.
3. 1.26.- Endoribonucleases producing 5'-phosphomonoesters.
3. 1.27.- Endoribonucleases producing other than 5'-phosphomonoesters.
3. 1.30.- Endoribonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5'-phosphomonoesters.
3. 1.31.- Endoribonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 3'-phosphomonoesters.

- 3. 2. -- Glycosylases.
 - 3. 2. 1.- Glycosidases, i.e. enzymes hydrolyzing O- and S-glycosyl compounds.
 - 3. 2. 2.- Hydrolyzing N-glycosyl compounds.
 - 3. 2. 3.- Hydrolyzing S-glycosyl compounds.
- 3. 3. -- Acting on ether bonds.
 - 3. 3. 1.- Thioether and trialkylsulfonium hydrolases.
 - 3. 3. 2.- Ether hydrolases.
- 3. 4. -- Acting on peptide bonds (peptidases).
 - 3. 4. 1.- alpha-Amino-acyl-peptide hydrolases.
 - 3. 4. 2.- Peptidyl-amino-acid hydrolases.
 - 3. 4. 3.- Dipeptide hydrolases.
 - 3. 4. 4.- Peptidyl peptide hydrolases.
 - 3. 4.11.- Aminopeptidases.
 - 3. 4.12.- Peptidylamino-acid hydrolases or acylamino-acid hydrolases.
 - 3. 4.13.- Dipeptidases.
 - 3. 4.14.- Dipeptidyl-peptidases and tripeptidyl-peptidases.
 - 3. 4.15.- Peptidyl-dipeptidases.
 - 3. 4.16.- Serine-type carboxypeptidases.
 - 3. 4.17.- Metallo-carboxypeptidases.
 - 3. 4.18.- Cysteine-type carboxypeptidases.
 - 3. 4.19.- Omega peptidases.
 - 3. 4.21.- Serine endopeptidases.
 - 3. 4.22.- Cysteine endopeptidases.
 - 3. 4.23.- Aspartic endopeptidases.
 - 3. 4.24.- Metalloendopeptidases.
 - 3. 4.25.- Threonine endopeptidases.
 - 3. 4.99.- Endopeptidases of unknown catalytic mechanism.
- 3. 5. -- Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds.
 - 3. 5. 1.- In linear amides.
 - 3. 5. 2.- In cyclic amides.
 - 3. 5. 3.- In linear amidines.
 - 3. 5. 4.- In cyclic amidines.
 - 3. 5. 5.- In nitriles.
 - 3. 5.99.- In other compounds.
- 3. 6. -- Acting on acid anhydrides.
 - 3. 6. 1.- In phosphorus-containing anhydrides.
 - 3. 6. 2.- In sulfonyl-containing anhydrides.
 - 3. 6. 3.- Acting on acid anhydrides; catalyzing transmembrane movement of substances.
 - 3. 6. 4.- Acting on ATP; involved in cellular and subcellular movement.
 - 3. 6. 5.- Acting on GTP; involved in cellular and subcellular movement.
- 3. 7. -- Acting on carbon-carbon bonds.
 - 3. 7. 1.- In ketonic substances.
- 3. 8. -- Acting on halide bonds.
 - 3. 8. 1.- In C-halide compounds.
 - 3. 8. 2.- In P-halide compounds.
- 3. 9. -- Acting on phosphorus-nitrogen bonds.
 - 3. 9. 1.- Acting on phosphorus-nitrogen bonds.
- 3.10. -- Acting on sulfur-nitrogen bonds.
 - 3.10. 1.- Acting on sulfur-nitrogen bonds.
- 3.11. -- Acting on carbon-phosphorus bonds.
 - 3.11. 1.- Acting on carbon-phosphorus bonds.
- 3.12. -- Acting on sulfur-sulfur bonds.
 - 3.12. 1.- Acting on sulfur-sulfur bonds.
- 3.13. -- Acting on carbon-sulfur bonds.
 - 3.13. 1.- Acting on carbon-sulfur bonds.
- 4. -- Lyases.
 - 4. 1. -- Carbon-carbon lyases.
 - 4. 1. 1.- Carboxy-lyases.
 - 4. 1. 2.- Aldehyde-lyases.
 - 4. 1. 3.- Oxo-acid-lyases.
 - 4. 1.99.- Other carbon-carbon lyases.
 - 4. 2. -- Carbon-oxygen lyases.
 - 4. 2. 1.- Hydro-lyases.
 - 4. 2. 2.- Acting on polysaccharides.
 - 4. 2. 3.- Acting on phosphates.
 - 4. 2.99.- Other carbon-oxygen lyases.
 - 4. 3. -- Carbon-nitrogen lyases.
 - 4. 3. 1.- Ammonia-lyases.
 - 4. 3. 2.- Lyases acting on amides, amidines, etc.
 - 4. 3. 3.- Amine-lyases.
 - 4. 3.99.- Other carbon-nitrogen lyases.
 - 4. 4. -- Carbon-sulfur lyases.
 - 4. 4. 1.- Carbon-sulfur lyases.
 - 4. 5. -- Carbon-halide lyases.
 - 4. 5. 1.- Carbon-halide lyases.
 - 4. 6. -- Phosphorus-oxygen lyases.
 - 4. 6. 1.- Phosphorus-oxygen lyases.
 - 4. 7. -- Carbon-phosphorus lyases.
 - 4. 7. 1.- Carbon-phosphorus lyases.
- 4.99. -- Other lyases.
 - 4.99. 1.- Other lyases.
- 5. -- Isomerases.
 - 5. 1. -- Racemases and epimerases.
 - 5. 1. 1.- Acting on amino acids and derivatives.
 - 5. 1. 2.- Acting on hydroxy acids and derivatives.
 - 5. 1. 3.- Acting on carbohydrates and derivatives.
 - 5. 1.99.- Acting on other compounds.
 - 5. 2. -- Cis-trans-isomerases.
 - 5. 2. 1.- Cis-trans isomerases.
 - 5. 3. -- Intramolecular oxidoreductases.
 - 5. 3. 1.- Interconverting aldoses and ketoses.
 - 5. 3. 2.- Interconverting keto- and enol-groups.
 - 5. 3. 3.- Transposing C=C bonds.
 - 5. 3. 4.- Transposing S-S bonds.
 - 5. 3.99.- Other intramolecular oxidoreductases.
 - 5. 4. -- Intramolecular transferases.
 - 5. 4. 1.- Transferring acyl groups.
 - 5. 4. 2.- Phosphotransferases (phosphomutases).
 - 5. 4. 3.- Transferring amino groups.
 - 5. 4. 4.- Transferring hydroxy groups.
 - 5. 4.99.- Transferring other groups.
 - 5. 5. -- Intramolecular lyases.
 - 5. 5. 1.- Intramolecular lyases.
 - 5.99. -- Other isomerases.
 - 5.99. 1.- Other isomerases.
- 6. -- Ligases.
 - 6. 1. -- Forming carbon-oxygen bonds.
 - 6. 1. 1.- Ligases forming aminoacyl-tRNA and related compounds.
 - 6. 1. 2.- Acid--alcohol ligases (ester synthases).
 - 6. 1. 3.- Cyclo-ligases.
 - 6. 2. -- Forming carbon-sulfur bonds.
 - 6. 2. 1.- Acid--thiol ligases.
 - 6. 3. -- Forming carbon-nitrogen bonds.
 - 6. 3. 1.- Acid--ammonia (or amine) ligases (amide synthases).
 - 6. 3. 2.- Acid--amino-acid ligases (peptide synthases).
 - 6. 3. 3.- Cyclo-ligases.
 - 6. 3. 4.- Other carbon--nitrogen ligases.
 - 6. 3. 5.- Carbon--nitrogen ligases with glutamine as amido-N-donor.
 - 6. 4. -- Forming carbon-carbon bonds.
 - 6. 4. 1.- Forming carbon-carbon bonds.
 - 6. 5. -- Forming phosphoric ester bonds.
 - 6. 5. 1.- Forming phosphoric ester bonds.
 - 6. 6. -- Forming nitrogen-metal bonds.
 - 6. 6. 1.- Forming coordination complexes.
- 7. -- Translocases.
 - 7. 1. -- Catalysing the translocation of hydrons.
 - 7. 1. 1.- Hydron translocation or charge separation linked to oxidoreductase reactions.
 - 7. 1. 2.- Hydron translocation linked to the hydrolysis of a nucleoside triphosphate.
 - 7. 1. 3.- Hydron translocation linked to the hydrolysis of diphosphate.
 - 7. 2. -- Catalysing the translocation of inorganic cations.
 - 7. 2. 1.- Linked to oxidoreductase reactions.
 - 7. 2. 2.- Linked to the hydrolysis of a nucleoside triphosphate.
 - 7. 2. 3.- Linked to the hydrolysis of diphosphate.
 - 7. 2. 4.- Linked to decarboxylation.
 - 7. 3. -- Catalysing the translocation of inorganic anions and their chelates.
 - 7. 3. 2.- Linked to the hydrolysis of a nucleoside triphosphate.
 - 7. 4. -- Catalysing the translocation amino acids and peptides.
 - 7. 4. 2.- Linked to the hydrolysis of a nucleoside triphosphate.
 - 7. 5. -- Catalysing the translocation carbohydrates and their derivatives.
 - 7. 5. 2.- Linked to the hydrolysis of a nucleoside triphosphate.
 - 7. 6. -- Catalysing the translocation of other compounds.
 - 7. 6. 2.- Linked to the hydrolysis of a nucleoside triphosphate.

Annexe n° 2 : Liste des MMP identifiées à ce jour

Liste des MMP répertoriant l'identifiant Uniprot, un exemple d'identifiant *Protein Data Bank* (PDB) si la structure a déjà été élucidée, l'identifiant ChEMBL, la dénomination alternative et l'*EC number* s'il a été défini. (Tableau créé à l'aide de la publication de Kapoor C. et Al., 2016⁹³).

MMP	Dénomination alternative	Numérotation EC	Gène (Humain)	Substrat	PDB ID	UNI PROT	ChEMBL ID	Organisme
MMP-1	Interstitial collagenase	3.4.24.7	11q22.2	Collagens (I-III, VII, VIII, X), gelatin, aggrecan, L-selectin, IL-1 β , proteoglycans, entactin, ovostatin, MMP-2, MMP-9	3SHI	P03956	CHEMBL332 ; CHEMBL20952 16 ; CHEMBL21114 22	Homo sapiens
MMP-2	72 kDa type IV collagenase ; Gelatinase A	3.4.24.24	16q12.2	Gelatin, collagen IV-VI, X, elastin, fibronectin	1QIB (catalytic domain)	P33434 P33436 P08253	CHEMBL3095 CHEMBL10751 75 CHEMBL20952 16 ; CHEMBL333 ; CHEMBL21113 21	Mus musculus Rattus norvegicus Homo sapiens
MMP-3	Stromelysin-1	3.4.24.17	11q22.2	Collagens (III-V, IX), gelatin, aggrecan, perlecan, decorin, laminin, elastin, casein, osteonectin, ovostatin, entactin, plasminogen, MBP, IL-1 β , MMP-2/TIMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13	2JT6 (cat domain)	P08254	CHEMBL21113 21 ; CHEMBL283	Homo sapiens
MMP-7	Matrilysin	3.4.24.23	11q22.22	Collagens (IV, X), gelatin, aggrecan, decorin, fibronectin, laminin, elastin, casein, transferrin, plasminogen, MBP, β 4-integrin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, and MMP-9/TIMP-1	1MMP	P09237	CHEMBL4073	Homo sapiens
MMP-8	Neutrophil collagenase	3.4.24.34	11q22.2	Collagens (I-III, V, VII, VIII, X), gelatin, aggrecan, fibronectin	1JH1	O88766 P22894	CHEMBL2312 CHEMBL20952 16 ; CHEMBL4588	Rattus norvegicus Homo sapiens
MMP-9	92 kDa type IV collagenase ; 92 kDa gelatinase ; Gelatinase B	3.4.24.35	20q13.12	Collagens (IV, V, VII, X, XIV), gelatin, entactin, aggrecan, elastin, fibronectin, osteonectin, plasminogen, MBP, IL-1 β	1GKC	P14780 P50282 P52176 P41245	CHEMBL20952 16 ; CHEMBL321 CHEMBL3870 CHEMBL5846 CHEMBL2214	Homo sapiens Rattus norvegicus Bos taurus Mus musculus

MMP-10	Stromelysin-2	3.4.24.22	11q22.2	Collagens (III-V), gelatin, casein, aggrecan, elastin, MMP-1, MMP-8	1Q3A	P09238	CHEMBL4270	Homo sapiens
MMP-11	Stromelysin-3		11q22.23		1HV5 (rat)	P24347	CHEMBL2867	Homo sapiens
						Q02853	CHEMBL3412	Mus musculus
MMP-12	Macrophage metalloelastase	3.4.24.65	11q22.2	Collagen IV, gelatin, elastin, casein, fibronectin, vitronectin, laminin, entactin, MBP, fibrinogen, fibrin, and plasminogen	1JK3	P39900	CHEMBL4393	Homo sapiens
						P79227	CHEMBL1932899	Oryctolagus cuniculus
						P34960	CHEMBL2594	Mus musculus
						Q63341	CHEMBL5506	Rattus norvegicus
						A9X4R8	CHEMBL1932900	Canis familiaris
MMP-13	Collagenase-3		11q22.2	Collagens (I-IV, IX, X, XIV), gelatin, plasminogen, aggrecan, perlecan, fibronectin, osteonectin, MMP-9	5UWK	P33435	CHEMBL3638350	Mus musculus
						O77656	CHEMBL5327	Bos taurus
						P23097	CHEMBL4944	Rattus norvegicus
						P45452	CHEMBL2111422 ; CHEMBL280	Homo sapiens
MMP-14	MT1-MMP	3.4.24.80	14q11.2	Collagens (I-III), gelatin, casein, fibronectin, laminin, vitronectin, entactin, proteoglycans, MMP-2, MMP-13	3MA2 (catalytic domain)	P50281	CHEMBL3869	Homo sapiens
MMP-15	MT2-MMP		16q21	Fibronectin, entactin, laminin, aggrecan, perlecan, MMP-2		P51511	CHEMBL2963	Homo sapiens
MMP-16	MT3-MMP		8q21.3	Collagen III, gelatin, casein, fibronectin, MMP-2	1RM8 (catalytic domain)	P51512	CHEMBL2200	Homo sapiens
MMP-17	MT4-MMP		12q24.33			Q9ULZ9	CHEMBL2937	Homo sapiens
MMP-19	Matrix metalloproteinase RAS1 ; MMP-18		12q13.2	Type I collagen		Q99542	CHEMBL1938214	Homo sapiens
MMP-20	Enamelysin		11q22.2	Amelogenin, aggrecan, COMP		O60882	CHEMBL1938226	Homo sapiens
MMP-24	MT5-MMP		20q11.22	Fibronectin, but not collagen type I or laminin		Q9Y5R2	CHEMBL5050	Homo sapiens
MMP-25	MT6-MMP ; Leukolysine		16q13.3	Progelatinase		Q9NPA2	CHEMBL1795103	Homo sapiens

MMP-26	Matrilysin-2 ; Endometase	11q15.4	Collagen IV, fbronectin, fbrinogen, gelatin, α (1)-proteinase inhibitor	Q9NRE1	CHEMBL4707	Homo sapiens
--------	---------------------------	---------	--	--------	------------	--------------

Collagénases
Matrylisine

Gélatinases
Transmembranaires

Stromélysines
Autres

Annexe n° 3 : Rôles des MMP dans les maladies neurodégénératives

Document issu de la publication de Brkic et Al. **2015** « Friends or Foes Matrix Metalloproteinases and Their Multifaceted Roles in Neurodegenerative Diseases ». ¹⁰

TABLE 2: Overview of the role of different MMPs in neurodegenerative diseases.

Neurodegenerative disease	MMPs involved	Role of MMPs	Model system	
Alzheimer's disease	MMP-1	Increased in AD patients Decreased MMP-2 activity and low MMP-9 levels after stimulation with A β oligomers	Patients <i>In vitro</i> (primary astrocytes)	
	MMP-2	Increased MMP-2 and proinflammatory cytokine levels in the brain Induced upon interaction of A β and RAGE MMP-2 and MT1-MMP expression observed in reactive astrocytes around plaques	<i>In vivo</i> (APP/PS1 mice) <i>In vitro</i> (brain endothelial cells) <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> (Tg-SwDI and Tg2576 mice)	
	MMP-3	Increased expression upon stimulation with A β_{1-40} Increased expression in microglia after stimulation with A β_{1-42} Involved in synaptic plasticity Significantly upregulated plasma and levels correlate with CSF Ability to degrade A β Increased expression Increased BCSFB permeability	<i>In vitro</i> (astrocyte and mixed hippocampal cultures) <i>In vitro</i> (microglial cell line Ra2) <i>In vivo</i> (rats) Patients (plasma and CSF) <i>In vitro</i> (APP-CHO cells) <i>In vivo</i> (icv injection of A β oligomers) <i>In vivo</i> (icv injection of A β oligomers)	
	MMP-9	Strong expression in microglia, astrocytes, and endothelial cells in the brain Biomarker to differentiate AD from dementia Cognitive impairment Elevated serum MMP-9 levels Degrades A β fibrils <i>in vitro</i> and A β plaques in <i>ex vivo</i> brain slices	Patients (postmortem brain tissue) <i>In vitro</i> (primary astrocytes) <i>In vitro</i> (isolates from patients brains) <i>In vivo</i> (rats) <i>In vivo</i> (mice) <i>In vitro</i> (hippocampal neurons)	
	MMP-12	Regulator of NMDA receptor	Patients (CSF)	
	MMP-13	BBB disruption, activation of CypA/MMP-9 in pericytes Increase in microglia	Patients (CSF) <i>In vitro</i> (microglial cell line Ra2) <i>In vitro</i> (microglial cell line Ra2)	
	MMP-2	Detected in astrocytes and microglia Activates microglia MMP-3 dependent ERK signal pathway activation in microglia Induces dopaminergic neuron cell death in mesencephalic neuron-glia mixed culture of wild-type	Patients <i>In vitro</i> (PCI2 cells) Patients (postmortem brain tissue) <i>In vitro</i> (neuron-glia mixed culture)	
	MMP-3	Induce production of NO in microglia MMP-3 secretion by neurons	<i>In vitro</i> (primary mesencephalic cultures from NADPH oxidase null or wild-type mice) <i>In vitro</i> (primary cultured dopaminergic neurons of wild-type and MMP-3 knockout)	
	MMP-9	Proteolysis of α -synuclein Increased MMP-9 activity in striatum and substantia nigra after MPTP treatment	<i>In vitro</i> (human dopaminergic neuroblastoma (SK-N-BE) cell line) <i>In vivo</i> (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of PD)	
	MMP-9	MMP-9 was primarily localized in neurons Increased MMP-9 expression substantia nigra	Patients (postmortem brain tissue) <i>In vivo</i> (mouse and monkey models of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-(MPTP-) induced PD)	
	Amyotrophic lateral sclerosis	MMP-2	To evaluate ALS disease progression	Patients (serum)
		MMP-3	Increased BBB permeability Contributes to motor neuronal cell death Upregulates neuronal TNF and FasL expression and activation Dysregulated activity with disease progression	Patients <i>In vivo</i> (G93A SOD1 mice) <i>In vivo</i> (G93A SOD1 mice) <i>In vivo</i> (mutant SOD1 transgenic mice)
MMP-9		Low levels of MMP-9 in CSF Elevated in skin and CSF MT-MMP-1/MMP-9 as a marker to distinguish ALS patients from healthy individuals Genetic risk factor for ALS	Patients (CSF) Patients (skin and CSF) Patients (serum) Patients (peripheral blood leukocytes)	
MMP-10		Cleaves huntingtin	<i>In vitro</i> (striatal cell culture expressing mutant Htt)	
MMP-9		Increased MMP-9 expression Increased MMP-9 expression	Patients (postmortem brain tissue) <i>In vivo</i> (3-nitropropionic acid animal model of the disease)	
Huntington disease	MMP-14	Knockdown of MMP-14 reduces toxicity	<i>In vitro</i> (striatal cell culture) expressing mutant Htt)	
	MMP-23	Knockdown of MMP-23 reduces toxicity	<i>In vitro</i> (striatal cell culture expressing mutant Htt)	
Multiple sclerosis (MS)	MMP-1	Expression in macrophages, and weak expression in astrocytes near necrotic lesions Increased mRNA levels	Patients (active lesion sites of postmortem brain samples) Patients (monocytes)	
	MMP-2	Expression in macrophages and weak expression in astrocytes near necrotic lesions	Patients (active lesion sites of postmortem brain samples)	
	MMP-3	Expression in endothelial cells Increased mRNA levels	Patients (active lesion sites of postmortem brain samples) Patients (monocytes)	
	MMP-7	Secreted by activated macrophages Increased mRNA levels	Patients (active lesion sites of postmortem brain samples) Patients (monocytes)	
	MMP-9	Secreted by blood vessels Increased mRNA levels	Patients (active lesion sites of postmortem brain samples) Patients (monocytes)	
	MMP-9	Expression in macrophages and weak expression in astrocytes near necrotic lesions Secreted by T-cells and macrophages, contributes to tissue damage surrounding lesion Increased levels of MMP-9 in serum along with TIMP-1 and TIMP-2	Patients (active lesion sites of postmortem brain samples) Patients (CSF samples from both RRMS and PPMS patients) Patients (serum)	

A β , β -amyloid; AD, Alzheimer's disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; APP, amyloid precursor protein; BBB, blood-brain barrier; BCSFB, blood-CSF barrier; CSF, cerebrospinal fluid; Cyp A, cyclophilin A; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; ERK, extracellular signal-regulated kinases; FasL, Fas ligand; icv, intracerebroventricular; MMP, matrix metalloproteinase; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; NO, nitric oxide; PSI, presenilin-1; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PPMS, primary progressive multiple sclerosis; RAGE, receptor for advanced glycation end products; RRMS, relapsing-remitting multiple sclerosis; SOD, superoxide dismutase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TNF, tumor necrosis factor.

Annexe n° 4 : Mini Mental State Examination

Document disponible sur le site de la Société de Gérontologie Centre Auvergne (<http://www.sgca.fr/>) ; consulté le 17 Mai 2018).

MINI MENTAL STATE EXAMINATION (M.M.S.E)		Etiquette du patient
Date :	
Évalué(e) par :	
Niveau socio-culturel	
ORIENTATION		
Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire. Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.		
Quelle est la date complète d'aujourd'hui ?		
☞ Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posez les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :		
1. en quelle année sommes-nous ?
2. en quelle saison ?
3. en quel mois ?
4. Quel jour du mois ?
5. Quel jour de la semaine ?
☞ Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous nous trouvons.		
9. Quel est le nom de l'hôpital où nous sommes ?
7. Dans quelle ville se trouve-t-il ?
8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ?
9. Dans quelle région ce département est-il situé ?
10. A quel étage sommes-nous ici ?
APPRENTISSAGE		
☞ Je vais vous dire 3 mots ; je voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les demanderai tout à l'heure.		
11. Cigare	[ciron	[fauteuil
12. fleur	[cé	[tulipe
13. porte	[ballon	[canard
Répétez les 3 mots.		
14. 93
15. 86
16. 77
17. 72
18. 65
ATTENTION ET CALCUL		
☞ Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois ?		
19. Cigare	[ciron	[fauteuil
20. fleur	[cé	[tulipe
21. porte	[ballon	[canard
RAPPEL		
☞ Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandé de répéter et de retenir tout à l'heure ?		
22. quel est le nom de cet objet ?
23. Quel est le nom de cet objet ?
24. Ecoutez bien et répétez après moi : « PAS DE PAIS, DE SI, NI DE ET »
☞ Prenez une feuille de papier sur laquelle je voudrais que vous m'écriviez le nom de la ville dans laquelle vous vous trouvez (à l'envers) :		
25. prenez cette feuille de papier avec la main droite.
26. Pliez-la en deux.
27. et jetez-la par terre ».
☞ Tendez au sujet une feuille de papier sur laquelle est écrit en gros caractères : « FERMEZ LES YEUX » et dire au sujet :		
28. « faites ce qui est écrit ».
29. voulez-vous m'écrire une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière. »
PRAXIES CONSTRUCTIVES		
☞ Tendez au sujet une feuille de papier et lui demandez :		
30. « Voulez-vous recopier ce dessin ».

Consignes de passation et de cotation du Mini Mental State Examination : M.M.S.E

ORIENTATION

- ☞ Pour tous ces items, n'accepter que la réponse exacte. Cependant, lors des changements de saison ou de mois, ou pour l'étage, permettre au patient de corriger une réponse erronée, en lui demandant : « êtes-vous sûr ? ».
- ☞ Les seules tolérances admises concernent :
 - Pour la question n°6 : lorsque le patient vient d'une autre ville, on peut se contenter de l'hôpital de la ville (car le nom de l'hôpital peut ne pas être connu du patient) ; si l'examen est réalisé en cabinet, demander le nom du médecin.
 - Pour la question n°8 : lorsque le nom du département et de la région sont identiques (par exemple : Nord), il faut alors demander : « dans quel pays est située ce département ».
- ☞ Chaque réponse vaut 1 point. Si la réponse est fautive ou si l'n'y a pas de réponse, comptez 0 point.
- ☞ Accorder 10 secondes pour chaque réponse.

APPRENTISSAGE

- ☞ Dire les 3 mots groupés, un par seconde, face au malade en articulant bien.
- ☞ Accorder 20 secondes pour la réponse.
- ☞ Compter 1 point pour chaque mot répété correctement au premier essai.
- ☞ Si le sujet ne répète pas les 3 mots au premier essai, les redonner jusqu'à ce qu'ils soient répétés correctement. En effet, l'épreuve de rappel ne peut être analysée que si les 3 mots ont été bien enregistrés.
- ☞ Maximum : 6 essais.

ATTENTION ET CALCUL

- ☞ Il faut donner au sujet le maximum de chances, car il s'agit d'une épreuve difficile même pour des sujets témoins. Pour cela, on donnera la consigne suivante : « maintenant, je vais vous demander de compter en arrière de 7 en 7 à partir de 100 : combien font 100 - 7 ? ». Si la réponse est incorrecte, le point n'est pas accordé et on corrige le sujet : « non, c'est 93. Et maintenant, combien font 93 - 7 ? » ; et ainsi de suite, pour les 5 soustractions.
- ☞ Noter le nombre de lettres données dans l'ordre correct : ce chiffre ne doit pas figurer dans le score global.

RAPPEL

- ☞ Accorder 10 secondes pour répondre.
- ☞ Compter 1 point par réponse correcte.
- ☞ Aucune tolérance n'est admise puisque l'encodage a été contrôlé lors de l'enregistrement.

LANGAGE

- D'une façon générale, compter 1 point par réponse correcte et accorder 10 secondes pour chaque réponse.
- ☞ Il faut montrer un crayon (et non un stylo ou un stylo à bille). Aucune réponse autre que crayon n'est admise.
- ☞ Aucune autre réponse que montre ou montre-bracelet n'est admise.
- ☞ La phrase doit être prononcée à haute voix, bien distinctement, face au malade ; ne compter 1 point que si la répétition est entièrement correcte.
- ☞ Comptez 1 point par item correctement exécutés. Si le sujet s'arrête et demande ce qu'il doit faire, il ne faut pas répéter la consigne mais dire : « faites ce que je vous ai dit ».
- ☞ Compter 1 point si la phrase comprend un sujet et un verbe, sans tenir compte des fautes d'orthographe ou de syntaxe. Accorder 20 secondes.

PRAXIES CONSTRUCTIVES

- Compter 1 point si tous les angles sont présents et si les figures se coupent sur 2 côtés différents. On peut autoriser plusieurs essais et accorder un temps d'une minute.

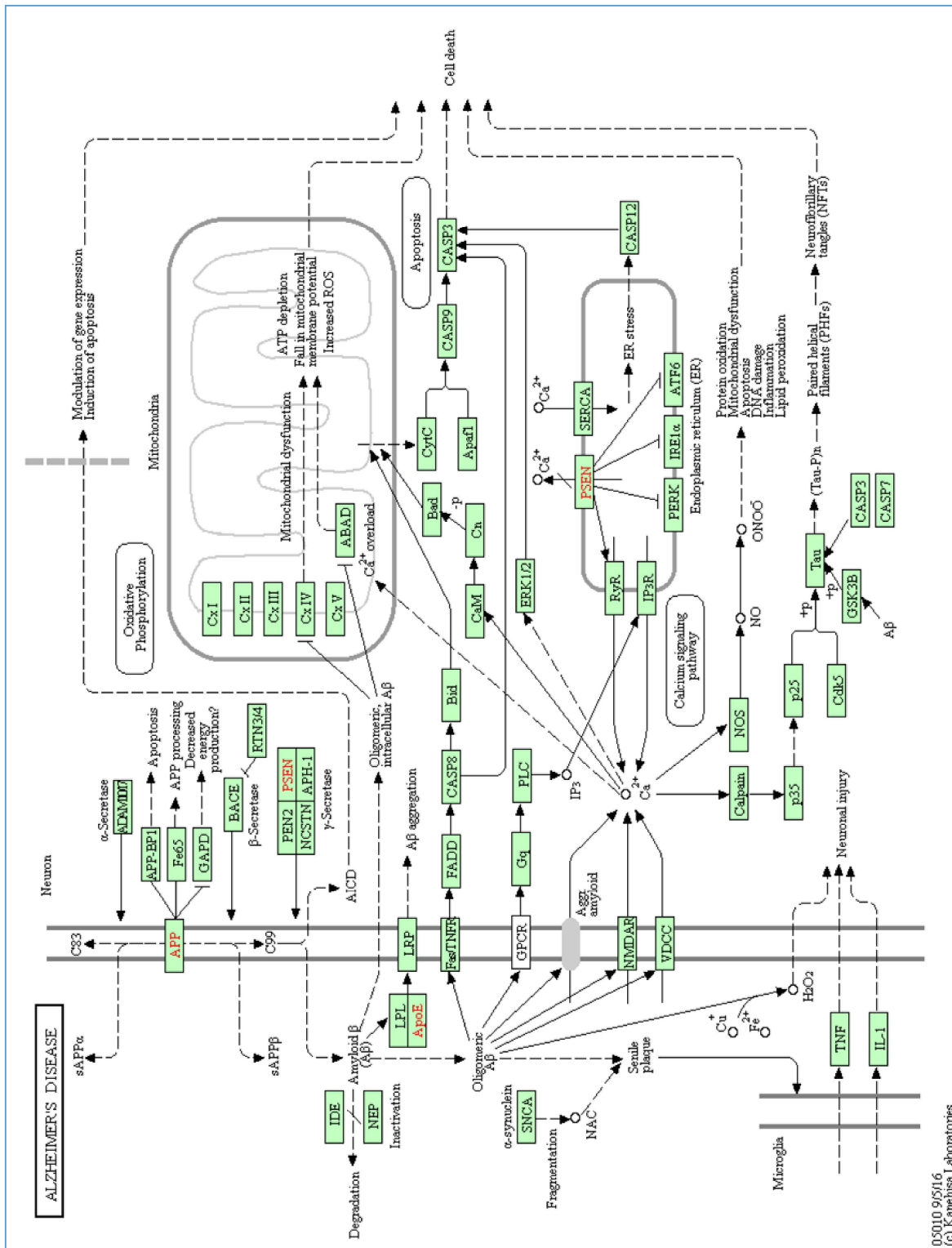


SCORE TOTAL (0 à 30)

Service de Gérontologie - 10 décembre 2007. 1/2

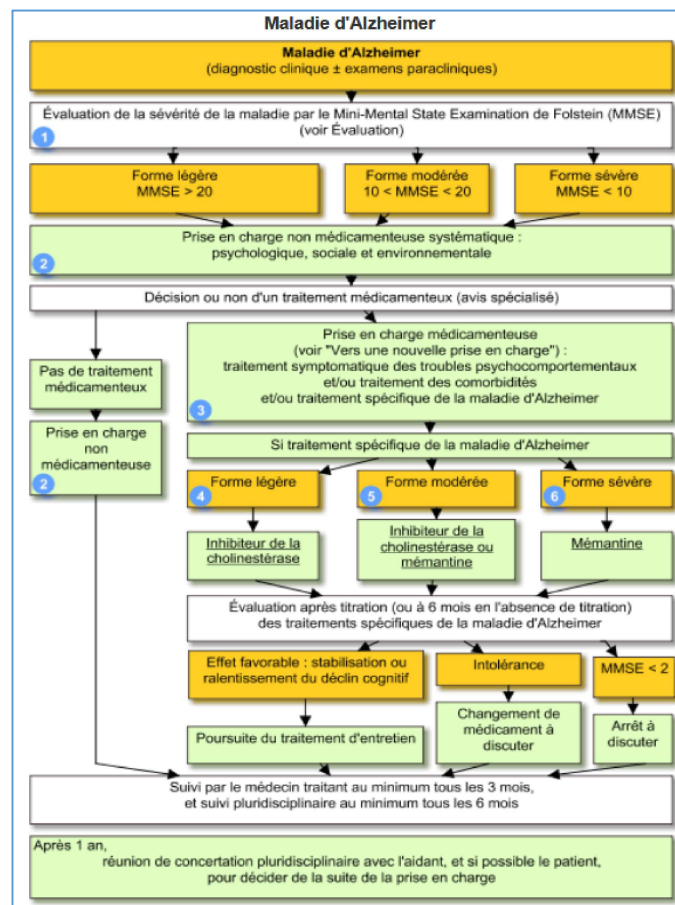
Annexe n° 5 : Voies de signalisation liées à la Maladie d'Alzheimer

Voies de signalisation liées à la MA, décrites en 2016 et mises à disposition sur la base de données KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) et consultable sur genome.jp/kegg/pathway.html



05010 9/5/16
(c) Kanehisa Laboratories

Annexe n° 6 : Recommandations Vidal® pour la prise en charge de la Maladie d'Alzheimer^s



1 - Évaluation de la sévérité de la maladie

Elle est basée sur le Mini-Mental State Examination de Folstein (MMSE). Voir Évaluation.

2 - Mesures non pharmacologiques

Elles visent à préserver le plus longtemps possible l'autonomie du patient : aménagement de l'environnement, stimulation cognitive, prise en charge comportementale.

Des mesures non pharmacologiques sont également utilisées de façon préférentielle pour prévenir ou traiter les troubles psychocomportementaux induits par la maladie : activité motrice, sensorielle, langage, etc.

3 - Traitement médicamenteux

Traitement spécifique : il doit être décidé par un neurologue, gériatre ou psychiatre. L'ordonnance initiale, valable 1 an, peut être renouvelée par le généraliste. Après une nouvelle réévaluation en 2016, la HAS a estimé que du fait d'un intérêt très limité, ces médicaments n'avaient plus de place dans la stratégie thérapeutique (voir « Vers une nouvelle prise en charge sans médicaments spécifiques »).

Traitement symptomatique : des psychotropes peuvent être prescrits de façon ponctuelle pour traiter certains troubles psychologiques ou comportementaux induits par la maladie (dépression, anxiété, etc.).

Traitement des comorbidités : il peut faire réenvisager la prescription des traitements spécifiques et symptomatiques de la maladie d'Alzheimer en fonction des interactions attendues et du rapport bénéfice/risque.

4 - Forme légère (MMSE > 20)

Un inhibiteur de l'acétylcholinestérase peut être utilisé : donépézil, galantamine ou rivastigmine, sans critère de choix entre l'un ou l'autre.

5 - Forme modérée (MMSE entre 10 et 20)

Un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (sans privilégier l'un ou l'autre) ou la mémantine peuvent être utilisés, sans critère de choix.

Il n'y a pas d'argument pour recommander une bithérapie.

6 - Forme sévère (MMSE < 10)

Seule la mémantine dispose d'une AMM, mais son bénéfice clinique attendu est très limité.

^s D'après le site https://www.vidal.fr/recommandations/1530/alzheimer_maladie_d/prise_en_charge/ (consulté le 18/12/18)

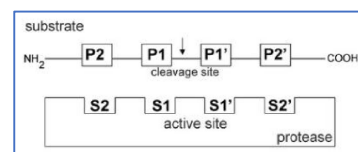
Annexe n° 7 : Test de l'évaluation *in vitro* de l'activité inhibitrice de MT5-MMP et MT1-MMP des composés synthétisés au CERMN

Dans le cadre du projet « Conception et Synthèse de ligands inhibiteurs de MT5-MMP », une collaboration a été entreprise avec l'équipe du Dr. Santiago Rivera du Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille (UMR 7286). Tandis que le CERMN gère la conception et la synthèse de ligands, l'URM 7286 elle est en charge des tests *in vitro* d'inhibition de MT1 et MT5-MMP.

Les tests d'inhibition menés sont des tests enzymatiques de fluorescence.

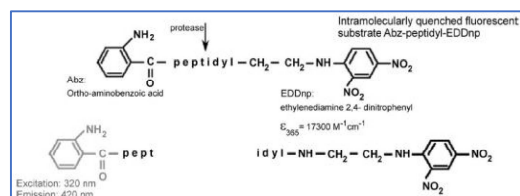
Principe : Mesure d'une vitesse d'apparition de fluorescence.

- ⇒ Test réalisé en plaque 96 puits avec :
 - Protéase recombinante (ici domaine catalytique de MT1 ou MT5-MMP) ;
 - Substrat fluorogénique intrinsèquement quenché 5 μM ;
 - Ligands ;
- ⇒ Incubation 15 min, 37°C.



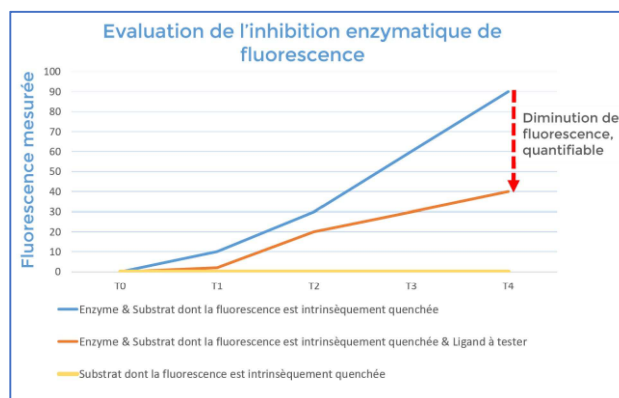
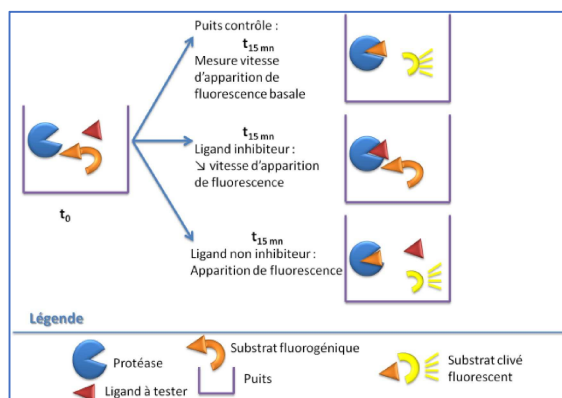
Matériel utilisé :

- Ligands, synthétisés au CERMN (1 - 50 - 100 nM)
- Protéase recombinante commerciale (Enzo BioLabs®) (2 nM)
- Substrat fluorogénique quenché Abz-peptidyl-EDDnp (5 μM)



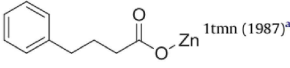
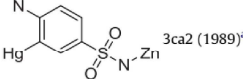
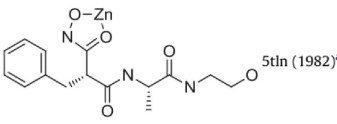
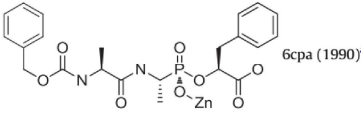
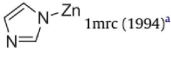
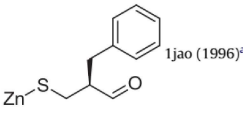
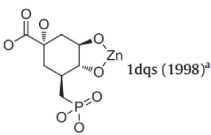
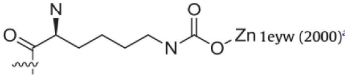
Interprétation des résultats : Comparaison vitesse d'apparition de fluorescence entre contrôle et ligands

- ⇒ Estimation des pourcentages d'inhibition par protéase et par ligand.



Annexe n°8 : Les Zinc Binding Groups (ZBG) les plus fréquemment retrouvés

Liste des ZBG telle qu'établie dans la publication suivante : Kawai K., Nagata N. « Metal-ligand interactions: An analysis of zinc binding groups using the Protein Data Bank »,⁹¹

ZBG	Ligand example	Targeted protein and the number of entries
Carboxylate (249 ligands)	 1tmn (1987) ^a	Aminopeptidase (20), Thermolysin (14), MMP (14), Lactamase (13), Others (incl. CA) (188)
Sulfonamide (147)	 3ca2 (1989) ^a	CA (146), Beta lactamase (1)
Hydroxamate (132)	 5tln (1982) ^a	MMP (50), HDAC (14), TACE (10), Aldolase (8), Others (incl. CA) (50)
Phosphonate/phosphate (132)	 6cpa (1990) ^a	Carboxypeptidase (25), Thermolysin (11), PMM/PGM ^b (10), PDE (9), Others (incl. CA and MMP) (77)
Imidazole (60)	 1mrc (1994) ^a	Farnesyltransferase (16), Glutaminy cyclase (8), Antibody fragment (5), Histidinol dehydrogenase (3), Others (23)
Thiol (52)	 1jao (1996) ^a	Beta lactamase (6), Thermolysin (6), Carboxypeptidase (5), CA (4), Others (incl. MMP) (31)
Diol (49)	 1dqs (1998) ^a	Mannosidase (37), Dehydroquinase synthase (5), Aldolase (3), Isomerase (1), Others (3)
Carbamate (41)	 1eyw (2000) ^a	Dihydroorotase (15), Phosphotriesterase (7), Isoaspartyl dipeptidase (5), Adenine deaminase (1), Others (13)

^a The earliest deposited structure is described with 4-character PDB ID. Deposition year is shown in parenthesis.
^b Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase.

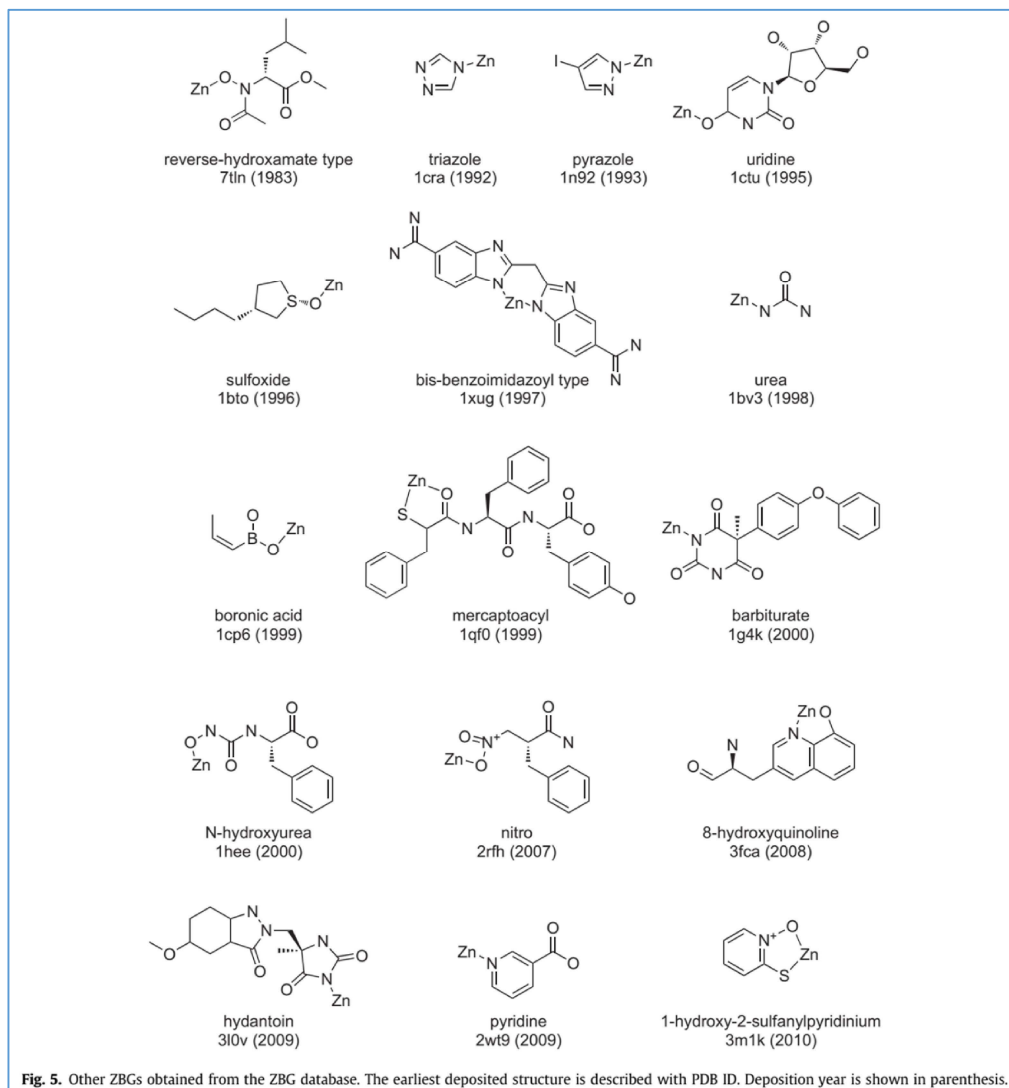
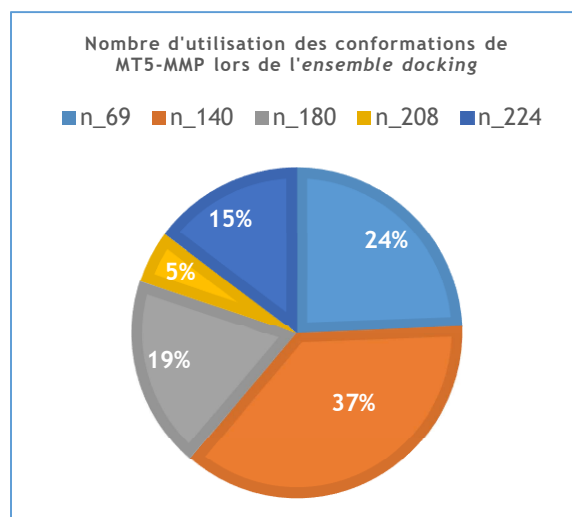


Fig. 5. Other ZBGs obtained from the ZBG database. The earliest deposited structure is described with PDB ID. Deposition year is shown in parenthesis.

Annexe n° 9 : Choix d'une conformation de MT5-MMP et MT1-MMP

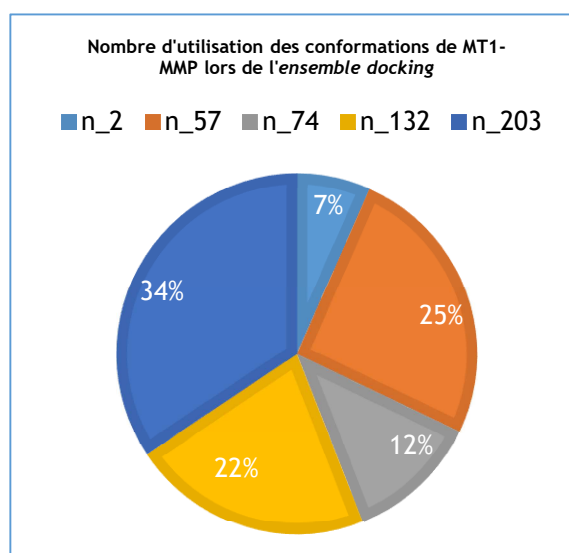
Fréquence d'apparition des conformations de MT5-MMP lors de l'ensemble docking de la chimiothèque du CERMN (nombre de composés utilisés n=10 000) :

Conformation	ID	Nombre d'apparition
1	n_69	2440
2	n_140	3679
3	n_180	1894
4	n_208	511
5	n_224	1476



Fréquence d'apparition des conformations de MT1-MMP lors de l'ensemble docking de la base de données ChEMBL des ligands de MT1-MMP (nombre de composés n=3 518).


Conformation	ID	Nombre d'apparition
1	n_2	233
2	n_57	898
3	n_74	418
4	n_132	758
5	n_203	1211



Annexe n° 10 : Poster

Présenté lors des 32^{èmes} Journées Franco-Belges de Chimie Thérapeutique et 26^{èmes} Rencontres Internationales des Pharmacochimistes de l'Arc Atlantique à Asnelles-sur-Mer lors des 13-14-15 Juin 2018.


Molecular modeling-assisted conception of MMP-24 inhibitors



Johanna Giovannini^a, Hassiba Saidoun^a, Meziane Yahia-Ouahmed^a, Jean-Philippe Métivier^a, Pauline Zipfel^a, Julien Lalut^a, Peggy Suzanne^a, Christophe Rochais^a, Patrick Dallemagne^a, Kevin Baranger^b, Michel Khrestchatsky^b, Santiago Rivera^b, Ronan Bureau^a and Alban Lepailleur^a

^a Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), Normandie Univ, UNICAEN, 14000 Caen, France.
^b Institut de Neurophysiologie et de Psychophysologie (INP), UMR7051, CNRS, Aix Marseille Université, 13000 Marseille, France.

E-mail: johanna.giovannini@gmail.com



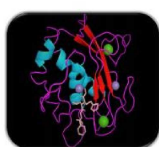
Introduction

Historically, β -amyloid (A β) plaques and neurofibrillary tangles have been largely associated with the development of Alzheimer's Disease (AD) through the amyloid cascade hypothesis. A new metabolic pathway of the amyloid precursor protein (APP), the η -secretase pathway, was revealed in 2015¹ as a target of interest for AD treatment. Actually, the cleavage of APP leads to the secretion of neurotoxic peptides in the hippocampus¹, an area for long-term memory. In this context, a research program was launched at the CERMN in order to discover novel η -secretase inhibitors.

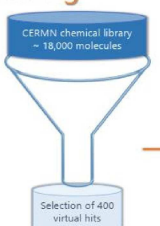
Objectives

Currently, no information is reported for selective or non-selective ligands of MMP-24. The main objective of this project is to discover MMP-24 ligands from our in-house chemical library by applying a structure-based virtual screening protocol. To this aim, we constructed original 3D homology models of the enzyme. Following the selection of the initial hits, pharmacomodulations will be proposed in order to understand structure-activity relationships (SAR) and to take a first step towards first leads for this target.

Structure-based virtual screening

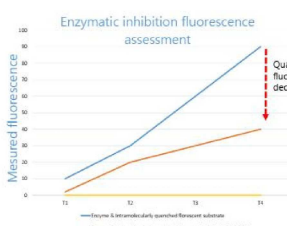


Homology model of MMP-24
Built using homology protein MMP-16 catalytic domain [PDB ID 1RM8] (92% similarity between MMP16 and MMP-24 catalytic domains) with Prime Homology Modeling workflow (2015-4 release of Schrödinger).
On this picture, MMP-24 is complexed to Batimastat, a broad-spectrum MMP inhibitor



CERMN chemical library ~ 18,000 molecules
Selection of 400 virtual hits

In silico screening of the CERMN chemical library
By ensemble docking using Glide® (Schrödinger suite)
Precision : high throughput virtual screening. Hit selection based on docking score, structural diversity, and visual inspection.



Enzymatic inhibition fluorescence assessment

Measured fluorescence vs Time (t1 to t4)

Quantifiable fluorescence decay

Hit
82 structures are able to inhibit up to 35% of MMP-24 activity *in vitro*. Scaffold 1 was selected for further studies.

Hit pharmacomodulations assisted by molecular modeling studies

Docking (Glide), molecular dynamics (Desmond, 50 ns, MM-GBSA) and free-energy perturbation (Desmond, FEP) simulations were carried out in order to guide the pharmacomodulations around scaffold 1. All the following binding mode hypotheses involve the chelation of the catalytic zinc (red sphere).

Hypothesis #1

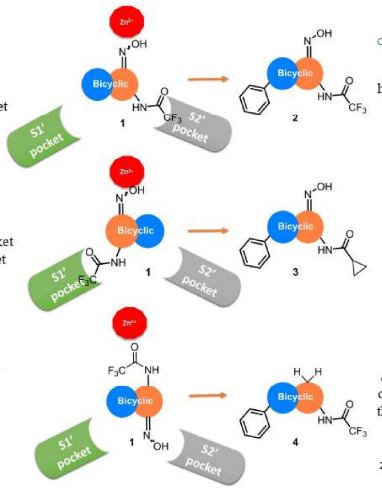
- Oxime group as a zinc binding group \rightarrow Tetravalent zinc
- Trifluoroacetamide located in the S2' pocket
- Potential substituant located in the S1' pocket

Hypothesis #2

- Oxime group as a zinc binding group \rightarrow Tetravalent or pentavalent zinc
- Potential substituant located in the S2' pocket
- Trifluoroacetamide located at the S1' pocket entry

Hypothesis #3

- Trifluoroacetamide as a zinc binding group \rightarrow Tetravalent zinc
- Potential substituant located in the S1' pocket
- Oxime group located in the S2' pocket



From compound 1:
Synthesis of heteroaromatic substituted derivatives (2)

Synthesis of acetamide derivatives (3)

Synthesis of oxime-less derivatives in order to assess the importance of the oxime group in the zinc chelation (4)

Conclusion and perspectives

The reported studies identified 82 hits for MMP-24 inhibition. The pharmacomodulations of a selected chemical series is on-going based on three binding mode hypotheses. In the next months, *in vitro* evaluations will confirm or reject these hypotheses, thus leading to new insights into the SAR of MMP-24 inhibitors.

References

¹Willem, M. et al., *Nature* **2015** (526), 443–447 ;
²Liano E. et al., *Cancer Research* **1999** (59), 2570–2576 ;
³Baranger, K. et al., *Cell. Mol. Life Sci.* **2016** (73), 217–236 ;
⁴Baranger, K. et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **2017** (9), 163.

The project *MTI-MMP* : Design, synthesis and biological evaluation of novel *MTI-MMP* inhibitors with potential interest for Alzheimer's disease is co-financed by the European Union under the "FEDER-FSE 2014-2020" operational program and supported by FRANCE ALZHEIMER. This work is co-funded by Région Normandie.

Bibliographie

1. Khrestchatisky, M., Jourquin, J., Ogier, C., Charton, G. & Bernard, A. Les Métalloprotéases de la matrice et leurs inhibiteurs , des modulateurs des interactions neuro-immunes et des processus physiopathologiques dans le système nerveux. **197**, 133–144 (2003).
2. Christiane, Y., Emonard, V. & Emonard, H. Implication des métalloprotéases matricielles en obstétrique: De la nidation a l'accouchement. *Rev. Med. Liege* **69**, 46–50 (2014).
3. Gross, J. & Lapiere, C. M. Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: a Tissue Culture Assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **48**, 1014–1022 (1962).
4. Bauer, E., Gordon, J., Reddick, M. & Eisen, A. Quantitation and Immunocytochemical Localization of Human Skin Collagenase in Basal Cell Carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **69**, 363–367 (1977).
5. Artimo, P. *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* **40**, 597–603 (2012).
6. Nagase, H. & Woessner, J. F. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491–21494 (1999).
7. Beaudoux, J. L., Giral, P., Bruckert, É., Foglietti, M.-J. & Chapman, J. Métalloprotéases matricielles et athérosclérose. Perspectives thérapeutiques. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **61**, 147–158 (2003).
8. Khoury, M., Giral, P., Bruckert, É., Chapman, J. & Beaudoux, J. L. Le système MMP/TIMP: Une cible thérapeutique de l'athérosclérose? *Sang Thromb. Vaiss.* **18**, 247–256 (2006).
9. David, A. Protéomique fonctionnelle des Métalloprotéases Matricielles (MMPs) dédié à la détection des formes actives de MMPs dans des protéomes complexes. (Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, 2007).
10. Brkic, M., Balusu, S., Libert, C. & Vandenbroucke, R. E. Friends or Foes: Matrix Metalloproteinases and Their Multifaceted Roles in Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).
11. Bertini, I. *et al.* Snapshots of the reaction mechanism of matrix metalloproteinases. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 7952–7955 (2006).
12. Sagi, I. & Gaffney, J. *Matrix Metalloproteinase Biology*. Wiley Blackwell (2015). doi:10.1002/9781118772287

13. Itoh, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* **44–46**, 207–223 (2015).
14. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
15. Beekman, B., Drijfhout, J. W., Ronday, H. K. & TeKoppele, J. M. Fluorogenic MMP activity assay for plasma including MMPs complexed to α 2-macroglobulin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **878**, 150–158 (1999).
16. Maskos, K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* **87**, 249–263 (2005).
17. Arpino, V., Brock, M. & Gill, S. E. The role of TIMPs in regulation of Extracellular Matrix Proteolysis. *Matrix Biol.* **44**, 247–254 (2015).
18. Khrestchatisky, M. *et al.* Les Métalloprotéases de la matrice et leurs inhibiteurs , des modulateurs des interactions neuro-immunes et des processus physiopathologiques dans le système nerveux. *J. Soc. Biol.* **197**, 133–144 (2003).
19. Gonzalez-Avila, G. *et al.* Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **137**, 57–83 (2019).
20. Hu, J., Van den Steen, P. E., Sang, Q.-X. A. & Opdenakker, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 480–498 (2007).
21. Devel, L. *et al.* Third generation of matrix metalloprotease inhibitors: Gain in selectivity by targeting the depth of the S1' cavity. *Biochimie* **92**, 1501–1508 (2010).
22. Jain, P., Saravanan, C. & Singh, S. K. Sulphonamides: Deserving class as MMP inhibitors? *Eur. J. Med. Chem.* **60**, 89–100 (2013).
23. Devel, L. *et al.* Third generation of matrix metalloprotease inhibitors: Gain in selectivity by targeting the depth of the S1' cavity. *Biochimie* **92**, 1501–1508 (2010).
24. Savi, C. De *et al.* Selective non zinc binding inhibitors of MMP13. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 4215–4219 (2011).

25. De Savi, C. *et al.* Lead optimisation of selective non-zinc binding inhibitors of MMP13. Part 2. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **22**, 271–277 (2012).
26. Malemud, C. J. Inhibition of MMPs and ADAM / ADAMTS. *Biochem. Pharmacol.* (2019). doi:10.1016/j.bcp.2019.02.033
27. Wang, X. X., Tan, M. S., Yu, J. T. & Tan, L. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* **2014**, (2014).
28. Park, S.-K. *et al.* Gene Expression Profiling of Aging in Multiple Mouse Strains: Identification of Aging Biomarkers and Impact of Dietary Antioxidants. *Aging Cell* **8**, 484–495 (2009).
29. Safciuc, F. *et al.* Advanced Glycation End Products, Oxidative Stress and Metalloproteinases are altered in the Cerebral Microvasculature during Aging. *Curr. Neurovasc. Res.* **4**, 228–234 (2007).
30. Romero *et al.* Association of matrix metalloproteinases with MRI indices of brain ischemia and aging. *Neurobiol. Aging* **31**, 2128–2135 (2010).
31. Liu, Y. *et al.* Matrix metalloproteinase-12 contributes to neuroinflammation in the aged brain. *Neurobiol. Aging* **34**, 1231–1239 (2013).
32. Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H. & Xu, H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* **4**, 1–13 (2011).
33. Willem, M. *et al.* η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **526**, 443–447 (2015).
34. Ahmad, M. Cleavage of Amyloid- Precursor Protein (APP) by Membrane-Type Matrix Metalloproteinases. *J. Biochem.* **139**, 517–526 (2006).
35. Philippi, N. *et al.* Hippocampe et mémoire autobiographique: une étude en IRM volumétrique dans la maladie d'Alzheimer. *Rev. Neurol. (Paris)*. **168**, A24 (2012).
36. Baranger, K. *et al.* MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 217–236 (2016).
37. Baranger, K., Khrestchatisky, M. & Rivera, S. MT5-MMP, just a new APP processing proteinase in Alzheimer's disease? *J. Neuroinflammation* **13**, 167 (2016).

38. Baranger, K. *et al.* MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5xFAD Mice and APP Trafficking in vitro. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 1–17 (2017).
39. Pei, D. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J. Biol. Chem.* **274**, 8925–8932 (1999).
40. Llano, E. *et al.* Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-bound Activator of Progelatinase A Overexpressed in Brain Tumors 1. *Cancer Res.* **59**, 2570–2576 (1999).
41. Helmer, C., Grasset, L., Pérès, K. & Dartigues, J.-F. Évolution temporelle des démences : état des lieux en France et à l'international. *Bull. épidémiologique Hebd.* **28–29**, 467–473 (2016).
42. Eustache, F. & Desgranges, B. Les conceptions de la mémoire déclarative d'Endel Tulving et leurs conséquences actuelles. *Rev. Neuropsychol.* **3**, 94–103 (2011).
43. Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 1906–1909 (1997).
44. Jin, J. Alzheimer Disease. *JAMA* **313**, 1488 (2015).
45. Croisile, B. Le Mini-Mental State, un incontournable de la neuropsychologie. *Sci. Soc. Sante* **32**, 71–77 (2014).
46. Baptiste, B. Un test rudimentaire mais pratique. Enquête sur le succès du Mini-Mental State Examination. *Sci. Soc. Sante* **32**, 43–70 (2014).
47. Cavalli, A. *et al.* Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* **51**, 347–372 (2008).
48. Friedland, R. P. & Chapman, M. R. The role of microbial amyloid in neurodegeneration. *PLoS Pathog.* **13**, 1–12 (2017).
49. Reitz, C. Genetic diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease: Challenges and opportunities. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **15**, 339–348 (2015).
50. Epperly, T., Dunay, M. A. & Boice, J. L. Alzheimer Disease: Pharmacologic and Nonpharmacologic Therapies for Cognitive and Functional Symptoms. *Am. Fam. Physician* **95**, 771–778 (2017).
51. Madav, Y., Wairkar, S. & Prabhakar, B. Recent therapeutic strategies targeting

- beta amyloid and tauopathies in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* **146**, 171–184 (2019).
52. Hung, S. Y. & Fu, W. M. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci.* **24**, 1–12 (2017).
 53. Claeysen, S., Bockaert, J. & Giannoni, P. Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 940–943 (2015).
 54. Zlomuzica, A. *et al.* Neuronal histamine and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **106**, 135–145 (2016).
 55. Popugaeva, E., Pchitskaya, E. & Bezprozvanny, I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease – a therapeutic opportunity? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 998–1004 (2017).
 56. Golde, B. T. E., Dekosky, S. T. & Galasko, D. Alzheimer's disease: The right drug, the right time. **362**, 1250–1252 (2018).
 57. Preische, O. & Schultz, S. A. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **25**, 277–283 (2019).
 58. Rognan, D. Méthodes de criblage in silico de chimiothèques. *Tech. l'Ingénieur* **33**, (2014).
 59. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology 2nd ed. (the 'Gold Book'). *Blackwell Sci. Publ. Oxford* 1670 (2014). doi:10.1351/goldbook.I03352
 60. Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P. & Mitscher, L. A. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **70**, 1129–1143 (1998).
 61. Kirkiacharian, S. Chimie médicinale - Structure et activité du médicament. *Tech. l'Ingénieur* **33**, (2007).
 62. Engel, T. & Gasteiger, J. *Applied Chemoinformatics : Achievements and Future Opportunities.* (2018).
 63. França, T. C. C. Homology modeling: An important tool for the drug discovery. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **33**, 1780–1793 (2015).
 64. Murphy, M. *et al.* *Gene Help: Integrated Access to Genes of Genomes in the Reference Sequence Collection.* (2006).
 65. Zerbino, D. R. *et al.* Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).

66. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
67. Apweiler, R. *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **32**, D115–D119 (2006).
68. Fabregat, A. *et al.* The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **46**, D649–D655 (2018).
69. Slenter, D. N. *et al.* WikiPathways: A multifaceted pathway database bridging metabolomics to other omics research. *Nucleic Acids Res.* **46**, D661–D667 (2018).
70. Cerami, E. G. *et al.* Pathway Commons, a web resource for biological pathway data. *Nucleic Acids Res.* **39**, 685–690 (2011).
71. Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K. & Tanabe, M. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 1–6 (2018). doi:10.1093/nar/gky962
72. Carvalho-Silva, D. *et al.* Open Targets Platform: new developments and updates two years on. *Nucleic Acids Res.* 1–10 (2018). doi:10.1093/nar/gky1133
73. MacArthur, J. *et al.* The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res.* **45**, D896–D901 (2017).
74. Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603–607 (2012).
75. Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Schiettecatte, F., Scott, A. F. & Hamosh, A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an Online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* **43**, D789–D798 (2015).
76. Tony Tse, A. B. & Zarin, D. A. Trialists’ Intent to Share Individual Participant Data as Disclosed at ClinicalTrials.gov. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **319**, 406–408 (2018).
77. Tsherniak, A. *et al.* Defining a Cancer Dependency Map. *Cell* **170**, 564–576 (2017).
78. Aksoy, B. A. *et al.* CTD2 Dashboard: a searchable web interface to connect

- validated results from the Cancer Target Discovery and Development Network. *Database (Oxford)*. **2017**, 1–10 (2017).
79. Gaulton, A. *et al.* ChEMBL: A large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1100–1107 (2012).
 80. Kim, S. *et al.* PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* **44**, D1202–D1213 (2015).
 81. Little, J. L., Williams, A. J., Pshenichnov, A. & Tkachenko, V. Identification of ‘known unknowns’ utilizing accurate mass data and chemspider. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 179–185 (2012).
 82. Sterling, T. & Irwin, J. J. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 2324–2337 (2015).
 83. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1074–D1082 (2018).
 84. Lagunin, A., Stepanchikova, A., Filimonov, D. & Poroikov, V. PASS : prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinforma. Appl. Note* **16**, 747–748 (2000).
 85. Nguyen, A. & Van Nguyen, A. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chem. Biol.* **10**, 787–797 (2003).
 86. Blundell, T. L. Structure-based drug design. *Nature* **384**, 23–26 (1996).
 87. Vallee, B. L. & Auld, D. S. Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 220–224 (1990).
 88. Pirard, B. Insight into the structural determinants for selective inhibition of matrix metalloproteinases. *Drug Discov. Today* **12**, 640–646 (2007).
 89. Tochowicz, A. *et al.* Crystal Structures of MMP-9 Complexes with Five Inhibitors: Contribution of the Flexible Arg424 Side-chain to Selectivity. *J. Mol. Biol.* **371**, 989–1006 (2007).
 90. Fabre, B., Ramos, A. & De Pascual-Teresa, B. Targeting matrix metalloproteinases: Exploring the dynamics of the S1' pocket in the design of selective, small molecule inhibitors. *J. Med. Chem.* **57**, 10205–10219 (2014).
 91. Kawai, K. & Nagata, N. Metal-ligand interactions: An analysis of zinc binding groups using the Protein Data Bank. *Eur. J. Med. Chem.* **51**, 271–276 (2012).

92. Leung, D., Abbenante, G. & Fairlie, D. P. Protease inhibitors: Current status and future prospects. *J. Med. Chem.* **43**, 305–341 (2000).
93. Kapoor, C. *et al.* Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J. Cancer Res. Ther.* **12**, 28–35 (2016).



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.