



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



Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme
de Master académique en

Filière : **sciences biologique**

Spécialité : **Biochimie Appliquée**

Présentée par : **OUARI Malika**

Thème

**L'utilisation de docking moléculaire pour la recherche
des chélateurs des métaux lourds inspirés des
métallothionéines.**

Soutenu le, 23/06/2022

Devant le Jury :

BENSAADI Nawel	Président	M.C.A.	Univ-Tissemsilt
HALLAL Nouria	Encadrant	M.C.B.	Univ-Tissemsilt
BEKADA Ahmed Med Ali	Examineur	Prof.	Univ-Tissemsilt

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

*Tout d'abord, je remercie **Dieu** Tout-Puissant de m'avoir donné le courage et la patience d'accomplir ce travail.*

Je tiens à remercier sincèrement nos chers parents pour leur soutien et leurs encouragements dans notre cheminement scolaire.

*Je tiens également à remercier mon superviseur, Mme **HALLAL Nouria**, pour la gestion de ce travail*

*J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du jury, **M. BEKADA Ahmed Med Ali** et Mme **BENSAADI Nawel**, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes recherches en acceptant d'examiner nos travaux.*

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé directement ou indirectement dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

C'est avec un grand plaisir que je dédie ce modeste travail à mes chers parents pour leur amour et soutien, que Dieu les garde pour moi.

A mes frères Aziz, Rashid, Jamal et Hussein, mes sœurs Siham, Donia et Karima et Sabrina, et mes neveux, Afaf et Islam Wejdan qui ont rendu ma vie pleine de bonheur.

À tous les membres de ma famille. et À tous mes amis.

Malika

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 01: LE MERCURE ET LA MALADIE D'ALZHEIMER

1. Le mercure est-il impliqué dans la maladie d'Alzheimer ?.....6
2. Le cerveau, principale cible des vapeurs de mercure.....6
3. Imprégnation mercurielle des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer.....7
4. Les caractéristiques biochimiques de la maladie d'Alzheimer.....7
5. L'exposition au mercure entraîne l'apparition des perturbations caractéristiques de la MA.....7
6. Principaux mécanismes impliqués dans l'agression oxydante due au mercure.....8
7. Perturbations liées à la forte affinité du cation mercurique pour les groupements thiols des protéines.....9
8. Le mercure perturbe le transport du glutamate et l'activité de la glutamine- synthétase (GS).....10
9. Allèles APOE, risque de MA et exposition au mercure.....11

CHAPITRE 02: LES METALLOTHIONEINES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

1. Les Méthallothionéines (MTs).....14
2. Classification et propriétés biochimiques de la MT.....14
3. Physiologie des MT.....15
4. MT dans le système nerveux central.....16
5. MT et la maladie d'Alzheimer.....18
6. MT et le mercure.....21

CHAPITRE 03: LES CHELATEURS DU MERCURE A BASE DE PLANTES MEDICINALES

1. Définition et spécificité de la thérapie par chélation	23
2. Les chélateurs pour traiter la maladie d'Alzheimer	24
3. Les chélateurs du mercure	24
4. Les composés naturels comme chélateurs du mercure	25

CHAPITRE 04: LE DOCKING MOLECULAIRE

1. Définition du docking moléculaire.....	30
2. Intérêt du docking.....	30
3. Applications du docking moléculaire.....	31
4. Différents types de docking moléculaire.....	31
4.1 Docking rigide.....	31
4.2 Docking flexible.....	32
4.3 Docking semi-flexible.....	32
5. Etapes de docking moléculaire.....	32
5.1 Docking proprement dit.....	32
5.2 Scoring.....	33
6. Les outils du docking moléculaires.....	33
6.1 Le récepteur.....	33
6.2 Le ligand	33
7. Un programme de docking moléculaire.....	33
7.1 Autodock.....	34
7.2 Autodock vina	34
7.3 Autodock tools	34
7.4 PubChem.....	34
7.5 PDB :(protein-data-bank).....	35
8. Fonction de score	35
9. Le Redocking	35
10. Les interactions Protéine- ligand (complexe protéine-ligand)	36
10.1 Les liaisons hydrogènes.....	36
10.2 Les interactions de Van Der Walls.....	37
10.3 Les interactions hydrophobes.....	37
10.4 Les interactions électrostatiques.....	38

PARTIE PRATIQUE

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Spécifications de matérielles.....	41
2. Spécifications de logiciels.....	41
3. Préparation de récepteur.....	41
4. Préparation des ligands	43
5. L'amarrage moléculaire.....	45
6. Grid Box du MT3.....	45

RESULTATS

Analyse de docking moléculaire.....	48
1. β -carotène.....	48
2. Fisétine	49
3. Berbérine.....	51
4. Myricétine	52
5. Curcumine.....	54

CONCLUSION ET PERSPECTIVES57

Résumé

Abstract

الملخص

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes de dégradation des molécules biologiques du système nerveux central par le cation mercurique et les entités réduites du dioxygène (ROS).....	9
Figure 2 : Représentation schématique de la structure MT.....	15
Figure 3 : Intérêt du docking (Khadidja M et Ikram L.2019).....	30
Figure 4 : Types de docking (Chevrollier N.2019).....	31
Figure 5 : Schéma représente que l'AutoDock est la plus utilisé (https://www.google.com/search?q=autodock).....	34
Figure 6 : Représentation des étapes du docking.....	36
Figure 7 : Liaisons hydrogènes (https://ressources.unisciel.fr).....	37
Figure 8 : Interaction de van der Waal (Khadidja M et Ikram L.2019).....	37
Figure 9 : liaison hydrophobe (Khadidja M et Ikram L.2019).....	38
Figure10: Interaction électrostatique (https://ressources.unisciel.fr/).....	38
Figure 11: Chaîne A de la Metallothionein-3 (PDB ID : 2FJ5).....	41
Figure 12: structures de Métallothioneine-3 préparées par l'utilisation d'un programme Auto Dock Tools-1.5.6.....	42
Figure 13 : Positionnement de la Grid Box dans le site actif du Métallothioneine-3.....	45
Figure14 : l'exécution des calculs de docking moléculaire.....	46
Figure 15 : les liaisons alkyl hydrophobique la β -carotène au sien du site actif de la Métallothionéine 3 : la β -carotène (jaune) établit trois liaisons alkyl hydrophobique (rose).....	49
Figure 16 : Les interactions entre le site actif de la Métallothionéine 3 et le Fisétine.....	50
Figure 17 : Les interactions entre le site actif de la Métallothionéine 3 et le Berbérine.....	52
Figure 18: Les interactions entre le site actif de la Métallothionéine 3 et le Myricétine	53
Figure 19 : Les interactions entre le site actif de la Métallothionéine 3 et le Curcumine.....	55

Liste de tableaux

Tableau 1 : quelque produits naturels ayant un potentiel de réduire la toxicité du mercure dans le cerveau.....	26
Tableau 2 : quelque plantes médicinales ayant un potentiel de réduire la toxicité du mercure dans le cerveau.....	26
Tableau 3 :Caractéristiques du Métallothionéines-3 (PDB ID : 2FJ5).....	42
Tableau 4 :Le ligand naturel de la Métallothionéines-3 (PDB ID : 2FJ5).....	42
Tableau 5 : Les structures des ligands utilisés pour l’amarrage moléculaire dans notre étude.....	43
Tableau 6 : affinité de liaison des composés anti-Alzheimer avec le récepteur MT3 (2FJ5.....	48
Tableau 7 : Les caractéristiques de complexe MT ₃ _ β-carotène et le nombre de liaisons formé.....	49
Tableau 8 : Les caractéristiques de complexe MT ₃ _ Fisétine et le nombre de liaisons formé.....	50
Tableau 9 : Les caractéristiques de complexe MT ₃ _ Berbérine et le nombre de liaisons formé.....	51
Tableau 10 : Les caractéristiques de complexe MT ₃ _ Myricétine et le nombre de liaisons formé.....	53
Tableau 11 : Les caractéristiques de complexe MT ₃ _ Curcumine et le nombre de liaisons formé.....	54

Liste des abréviations

A β = amyloïde β
AD: alzheimer's disease
Mt3: metallothionein 3
CNS: central nervous system
MT: Metallothionein
CD : CADMIUM
Zn:zinc
Hg : mercure
Cu:cuivre
CH₃ Hg : méthylmercure
APP = amyloïd précurseur de la protéine
APP: Protéine Précurseur Amyloïde
BHE : barrière hémato-encéphalique
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
ROS : réactives oxygénées
ADN : acide désoxyribonucléique
ADN : acide désoxyribonucléique
GTP : guanosine-tri-phosphate
ADP : Adénosine diphosphate
Pb : plomb
GS : glutamine- synthétase
GABA : gamma-amino-butyrique
APOE : _Apolipoprotéine E
CHCl₃ = chloroforme
DMPS : dimercaprol, le 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate
DMSA : méso-2,3-dimercaptosuccinique acide
RMN : résonance magnétique nucléaire
MT-I : metallothionein **I**
MT-II : metallothionein **II**
ARNm : Acide Ribonucléique Messenger
TNF : facteurs de Nécrose Tumorale
NFT : neurofibrillaires intraneurales
ETC : transport électronique

MTF-1 : metal-responsive transcription factor-1

PDB: Protein Data Bank

DOCK: docking moléculaire

MA: Maladie d'Alzheimer

3D : Trois dimensions

RMN : résonance magnétique nucléaire

MGL : Molecular Graphics Laboratory

ADT : AutoDockTools

RMSD: Root Mean Square Deviation

APP: Amyloid Protein Precursor

AA : Acide Aminé

Å : Angstrom

Ala : alanine

Arg : arginine

Asn: asparagine

Asp : acide aspartique

Cys : cystéine

Glu : acide glutamique

Gln : glutamine

Gly: glycine

His: histidine

Iso :isoleucine

Leu : leucine

Lys : lysine

Met : méthionine

Phe : phénylalanine

Pro: proline

Sér: sérine

The: thréonine

Trp: tryptophane

Tyr: tyrosine

Val : valine

Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative progressive et irréversible.

Il est difficile d'attribuer l'initiation de l'amyloïdogénèse à la seule présence des peptides A β 40 et A β 42, alors que ce sont des constituants normaux du fluide cérébrospinal et que les porteurs de la maladie d'Alzheimer familiale, qui surexpriment A β 42 dès la naissance, ne présentent pas de dépôts amyloïdes dans leur enfance.

Il est donc raisonnable d'évoquer, en plus de la surproduction d'A β (liée à des causes génétiques ou à l'âge), d'autres facteurs permettant l'initiation des dépôts amyloïdes avec l'âge. Il a été proposé que les ions métalliques participent à ce phénomène (**Atwood et al., 1999**). Leur homéostasie est perturbée lors de la maladie d'Alzheimer.

Les ions métalliques sont retrouvés à des concentrations très élevées dans le cerveau des malades d'Alzheimer, à proximité ou au sein des plaques amyloïdes (**Atwood et al., 1999; Lovell et al., 1998**). Bien que les ions du Hg(II) soient connus pour affecter l'agrégation et le mauvais repliement des protéines en général (**Arnhold F, Guhrs K.H et al. 2015**), les interactions moléculaires observées dans plusieurs études soutiennent l'implication potentielle des ions Hg(II) dans les processus d'agrégation amyloïde A β associés à la pathologie de la MA.

Les protéines de liaison aux métaux jouent un rôle vital dans l'équilibre de l'homéostasie des métaux dans le cerveau, dont les métallothionéines-3 (MT3) sont les plus notables. Il s'agit d'une protéine de faible poids moléculaire, riche en cystéine, à haute teneur en métal (Zn(II), Cu(I)) et principalement exprimée dans le SNC.

Jusqu'à présent, certaines études *in vitro* ont démontré ses multiples fonctions liées à la MA. La fonction principale fait référence à (i) détoxification des métaux non essentiels tels que le cadmium et le mercure ; (ii) détoxification de l'excès de métaux essentiels tels que le cuivre et le zinc ; (iii) séquestration des radicaux et des espèces réactives de l'oxygène ; (iv) transfert et transport des métaux lourds. La surexpression de MT3 empêche la mort des cellules neuronales dans cerveau modèle MA (**Sengupta U, Nilson A N, Kayed R. 2016**) et son réduction pourrait contribuer à l'accumulation d'A β extracellulaire (**Wang Z, Wei X, Yang J, Suo J, et al. 2016**).

L'idée d'utiliser des chélateurs des ions de mercure pour empêcher leurs effets pathogènes dans la maladie d'Alzheimer est une stratégie vise à appauvrir l'organisme en mercure non le séquestrant et en l'éliminant par excrétion. Le but aussi est d'entrer en compétition avec le peptide pour ces ions métalliques et de perturber les interactions métal-protéine délétères afin de redistribuer ce métal et de le réexporter dans la circulation sanguine générale.

Donc chélater le mercure et solubiliser l'A β 42 agrégé constitue un enjeu majeur pour les laboratoires de recherches de l'industrie pharmaceutique.

Les enquêteurs ont montré un grand intérêt pour l'ex- exploration des plantes médicinales utilisées traditionnellement, de leurs dérivés et même leurs combinaisons pour la recherche sur les médicaments

contre la MA (**Butler, 2004**). Diverses plantes médicinales et produits naturels offrent atténuation significative de toxicité induite expérimentalement par le mercure dans des modèles animaux.

Le docking moléculaire est une technique de criblage *in silico* de drug-design facile à mettre en œuvre, offre un complément aux méthodes expérimentales et qui fait gagner du temps et de l'argent pour la découverte de nouveaux médicaments. Dans ce contexte, s'articule notre travail qui consiste à proposer de nouvelles séries de produits à base de plantes qui seront testés *in silico* vis-à-vis des cibles du mercure et de la MA.

Notre travail est organisé en deux parties, initié par une revue de la littérature rapportée dans quatre chapitres. Le premier chapitre porte sur le mercure et son implication dans la maladie d'Alzheimer.

Par ailleurs, dans le deuxième chapitre, nous abordons des généralités sur la métallothionéine et son activité anti-MA et antagoniste des effets neurotoxiques des peptides A β et du mercure. Suivi par le chapitre trois qui met la lumière sur la thérapie par chélation et les produits naturels ayant un potentiel de réduire la toxicité du mercure dans le cerveau.

Enfin le dernier chapitre décrit l'état de l'art de la modélisation et le docking moléculaire et leur place dans le domaine de la recherche et développement de nouveaux médicaments.

Dans la deuxième partie (partie pratique), nous précisons le matériel utilisé pour l'obtention des structures des cibles étudiées (Protein Data Bank) et celles des ligands (ChemSketch) nécessaires au processus du docking moléculaire effectué par le logiciel AutoDockVina tout en détaillant le protocole de docking ainsi que les résultats obtenus et la discussion. Enfin une conclusion et des perspectives clôturent cette partie.

Revue
Bibliographique

Chapitre 1

Véritable fléau sanitaire dans le monde, la maladie d'Alzheimer est en passe de devenir une pandémie mondiale. La flambée de cette épidémie ne peut s'expliquer uniquement par le vieillissement de la population.

Si les causes de cette pathologie restent encore largement méconnues, des études épidémiologiques démontrent l'importance de facteurs environnementaux, dont les effets sont modulés par la présence de gènes de susceptibilité à la maladie. **(Marie Grosman et André Picot .2010)**

Parmi tous les facteurs biologiques en relation avec la maladie d'Alzheimer, les métaux tiennent une place essentielle. A ce stade disons simplement qu'ils sont impliqués dans de nombreuses autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie de Creutzfeldt-Jacob, la maladie de Wilson, la sclérose latérale amyotrophique ou la maladie du prion. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, de nombreuses études ont montré que le métabolisme des ions métalliques est altéré. Les concentrations de cuivre, de zinc et de fer sont plus élevées que la normale, et plus particulièrement dans les lésions caractéristiques de la maladie (plaques amyloïdes) et à proximité de celles-ci. **(Atwood et al., 1999; Lovell et al., 1998)**. Les métaux jouent donc certainement un rôle non négligeable dans la Maladie d'Alzheimer. L'intérêt pour l'étude des ions métalliques en relation avec la pathologie est donc croissant.

Il est difficile d'attribuer l'initiation de l'amyloïdogenèse à la seule présence des peptides A β 40 et A β 42, alors que ce sont des constituants normaux du fluide érébrospinal et que les porteurs de la maladie d'Alzheimer familiale, qui surexpriment A β 42 dès la naissance, ne présentent pas de dépôts amyloïdes dans leur enfance. D'autre part, il est difficile d'expliquer que les dépôts formés soient localisés à des endroits bien précis (au niveau des synapses par exemple) et que leur distribution ne soit pas uniforme puisque l'A β est exprimé de façon ubiquitaire. Il est donc raisonnable d'évoquer, en plus de la surproduction d'A β (liée à des causes génétiques ou à l'âge), d'autres facteurs permettant l'initiation des dépôts amyloïdes avec l'âge.

Il a été proposé que les ions métalliques participent à ce phénomène **(Atwood et al., 1999)**. Leur homéostasie est perturbée lors de la maladie d'Alzheimer. Les ions métalliques sont retrouvés à des concentrations très élevées dans le cerveau des malades d'Alzheimer, à proximité ou au sein des plaques amyloïdes **(Atwood et al., 1999; Lovell et al., 1998)**.

De nombreuses publications mettent notamment en évidence l'implication du mercure. En effet, des expérimentations mettent en évidence que le mercure inorganique induit dans le cerveau des perturbations comparables à celles observées chez les malades d'Alzheimer. Plusieurs mécanismes expliquant ces perturbations sont désormais clairement identifiés : déstructuration du cytosquelette neuronal, induction d'une agression oxydante, inhibition de l'activité d'enzymes jouant un rôle vital dans le fonctionnement cérébral, action sur le métabolisme d'un neuromédiateur, le glutamate, etc.

La recherche doit par conséquent s'orienter davantage vers l'étiologie de cette maladie, et non seulement vers la mise au point de thérapies médicamenteuses ou vaccinales. Ce n'est qu'en appliquant rapidement le principe de précaution qu'on pourra réduire l'exposition de la population au mercure et aux autres substances neurotoxiques, et ainsi retarder le vieillissement cérébral.

1. Le mercure est-il impliqué dans la maladie d'Alzheimer ?

La neurotoxicité des différentes formes de mercure (mercure élémentaire Hg^0 , mercure inorganique : cation mercurieux Hg^+ et cation mercurique Hg^{2+} , et mercure organique : cation méthylmercure $CH_3 Hg^+$ par exemple) est connue depuis longtemps. Elle a laissé l'expression "travailler du chapeau", évoquant la folie des chapeliers qui s'intoxiquaient avec le nitrate mercurique utilisé dans le procédé de feutrage. L'intoxication au mercure sous forme élémentaire ou inorganique, l'hydrargyrisme, inscrite dès 1919 au tableau des maladies professionnelles, recouvre plusieurs maladies ou symptômes neurologiques : encéphalopathie aiguë, tremblement intentionnel et ataxie cérébelleuse.

Ces vingt dernières années, l'étude de l'éventuelle relation entre une exposition au mercure élémentaire ou inorganique et la MA a donné lieu à de nombreuses publications.

Donc le mercure présente un probable déterminant majeur impliqué dans la maladie d'Alzheimer à cause des perturbations cérébrales résultant d'une exposition à de faibles doses de ce métal.

2. Le cerveau, principale cible des vapeurs de mercure

Le mercure élémentaire (Hg^0) est en grande majorité inhalé, puis transféré à 80% des alvéoles pulmonaires vers le sang. Le mercure présent dans la cavité nasale peut aussi traverser l'épithélium nasal et être transporté jusqu'au cerveau par la voie olfactive (transport rétrograde). Dans les deux cas, il traverse rapidement la barrière hémato-encéphalique (BHE) grâce à sa lipophilie partielle. Il est alors oxydé et transformé en final en cations mercuriques, incapables de retraverser la BHE. Du fait de la très grande affinité du mercure pour les groupements thiols (-SH), les cations mercuriques sont alors bloqués sous forme de complexes insolubles avec les composés biologiques soufrés (peptides ou protéines), et s'accumulent alors peu à peu dans le cerveau pour des années voire des décennies (**Weiner JA, Nylander M.1993**). Le mercure est donc un toxique bioaccumulable, tout comme le sont des éléments proches : plomb, bismuth, cadmium,... regroupés sous le terme de métaux traces toxiques. Ce sont les cations mercuriques accumulés dans le cerveau qui sont responsables des effets toxiques consécutifs à l'inhalation de vapeurs de mercure : cette forme constitue le toxique ultime (le mercure élémentaire est quant à lui qualifié de protoxique).

L'imprégnation mercurielle du cerveau est corrélée au nombre d'amalgames (**Weiner JA, Nylander M.1993**).

Une équipe italienne a montré que les porteurs de plus de 12 surfaces d'amalgames ont plus de 10 fois plus de mercure dans leur hypophyse et leur cortex cérébral que les porteurs de 3 surfaces ou moins d'amalgames (**Guzzi G, Grandi M, Cattaneo C, Calza S.2006**).

Le mercure des amalgames dentaires représente la principale source d'exposition mercurielle dans les pays développés (**WHO/IPCS.1991**). Pour ces populations, il contribue approximativement pour deux tiers à l'imprégnation mercurielle du corps humain, particulièrement du cerveau (**Lorscheider FL, Vimy MJ, Summers AO ;1995**).

3. Imprégnation mercurielle des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer

Le cerveau des malades d'Alzheimer (M.A) possède des concentrations mercurielles plus élevées que celui des témoins (**Björkman L, Lundekvam BF, Lægreid T,et al .2007**), notamment dans le noyau basal de Meynert, région du cerveau où la dégénérescence neuronale est la plus marquée dans cette pathologie (**Wenstrup D, Ehmann WD, Markesbery WR .1990**). Les M.A ont aussi une concentration de mercure sanguin plus élevée que des témoins (**Hock C, Drasch G,et al .1998; Lars Gerhardsson, Thomas Lundh, et al .2008**) ; cette concentration est en moyenne 3 fois plus élevée chez les M.A en début de maladie que chez les personnes indemnes, et cette élévation peut être associée à de hauts niveaux de peptides β -amyloïdes dans le liquide céphalorachidien (**Hock C, Drasch G,et al.1998**).

4. Les caractéristiques biochimiques de la maladie d'Alzheimer

Le développement de la MA correspond à un processus inflammatoire et de dégénérescence cérébrale. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau, suivie de la dégénérescence neurofibrillaire (lésions intracellulaires), et l'accumulation des peptides β -amyloïdes formant les plaques séniles (lésions extracellulaires) constituent les 3 principaux marqueurs de la MA.

5. L'exposition au mercure entraîne l'apparition des perturbations caractéristiques de la MA

On a vu que dans des neurones exposés à de petites quantités de mercure se formaient les amas de neurofibrilles, un des marqueurs de la MA (**Leong CC, Syed NI, Lorscheider FL.2001**). On observe l'apparition des deux autres marqueurs de la maladie, l'hyperphosphorylation des protéines Tau et l'augmentation de la sécrétion de peptides β -amyloïdes dans une culture de neuroblastomes soumise à de faibles doses de mercure inorganique (**Olivieri G, Brack C, Muller-Spahn F et al .2000**). Le cuivre et le zinc, deux métaux indispensables à la vie neuronale entrant dans la composition des amalgames dentaires seraient eux aussi impliqués dans la formation des plaques amyloïdes, en relation avec des perturbations de leur homéostasie cellulaire (**Bush AI.2001**).

6. Principaux mécanismes impliqués dans l'agression oxydante due au mercure

L'agression oxydante : mécanisme important du processus toxique du mercure au niveau du système nerveux central (**Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. 2007 ; Klassen CD. 2001**)

Le tissu cérébral d'un M.A présente des niveaux d'agression oxydante bien plus élevés que ceux d'un cerveau non atteint par cette pathologie (**Su B, Wang X, Nunomura A et al.2008**). Or, de faibles quantités de mercure inorganique induisent de même un stress oxydant au niveau cérébral.

Dans le cerveau, le mercure issu de l'inhalation des vapeurs mercurielles se trouve sous trois formes principales : le mercure élémentaire (Hg^0) qui a traversé la BHE, le cation mercurieux (Hg^+) et le cation mercurique (Hg^{2+}) qui constitue la forme stable et réactive. Les deux entités ioniques (Hg^+ et Hg^{2+}) sont en général solubles dans l'eau et sont dotées d'activité toxique.

Elles sont en équilibre entre les formes réduites et les formes oxydées, lesquelles vont jouer un rôle fondamental dans les processus toxiques du mercure.

Dans les cellules gliales (cellules nourricières des neurones), des réactions enzymatiques impliquant un seul électron vont permettre la transformation du mercure élémentaire en cation mercurique en présence d'une peroxydase, la catalase, qui utilise comme réactif oxydant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En plus du pouvoir oxydant du cation mercurique qui va entraîner une dégradation oxydative de nombreux constituants biologiques (protéines, peptides, lipides insaturés, acides nucléiques ...), les deux couples oxydo-réducteurs vont provoquer la réduction du dioxygène en plusieurs espèces réactives oxygénées (ROS), et en final en radical hydroxyle ($H-O \cdot$).

Ce radical à très brève durée de vie (10⁻⁶ s) est de loin l'entité oxydante la plus réactive, capable de détruire immédiatement toute molécule organique biologique telle que l'ADN. L'agression oxydante des constituants cellulaires débute par une attaque des lipides insaturés ; cette peroxydation membranaire entraîne ultérieurement l'oxydation des protéines puis celle de l'ADN. Si cette agression oxydante n'est pas bien contrôlée par les systèmes antioxydants présents au niveau neuronal, une dégradation cellulaire va s'installer, qui entraînera une dégénérescence neuronale pouvant aboutir à des démences de type MA.

D'autres mécanismes toxiques peuvent aussi intervenir et perturber les processus de défense en particulier ceux impliquant les molécules soufrées réductrices, comme le glutathion (G SH), tripeptide indispensable à la protection cellulaire contre l'agression oxydante, qui est alors inactivé par formation d'un complexe mercurique insoluble. Ainsi, si on soumet à de faibles doses de cations mercuriques une culture de neuroblastomes, on observe une chute importante de la concentration de glutathion donc une augmentation de l'agression oxydante (**Olivieri G, Brack C, Muller-Spahn Fet al .2000**).

Au niveau cellulaire, le cation mercurique après stockage essentiellement dans les lysosomes, va interagir principalement avec les mitochondries, lieu privilégié de la formation des entités réduites du dioxygène, responsables du vieillissement cellulaire. Si la toxicité du cation mercurique est surtout liée à

sa très forte affinité pour les fonctions thiol des protéines (tubuline...) et des peptides (glutathion...), il est probable que l'agression oxydante peut jouer un rôle important selon l'organe cible touché (SNC, rein...). La figure 1 ci-dessous résume l'impact du cation mercurique sur les molécules biologiques des neurones et des cellules gliales.

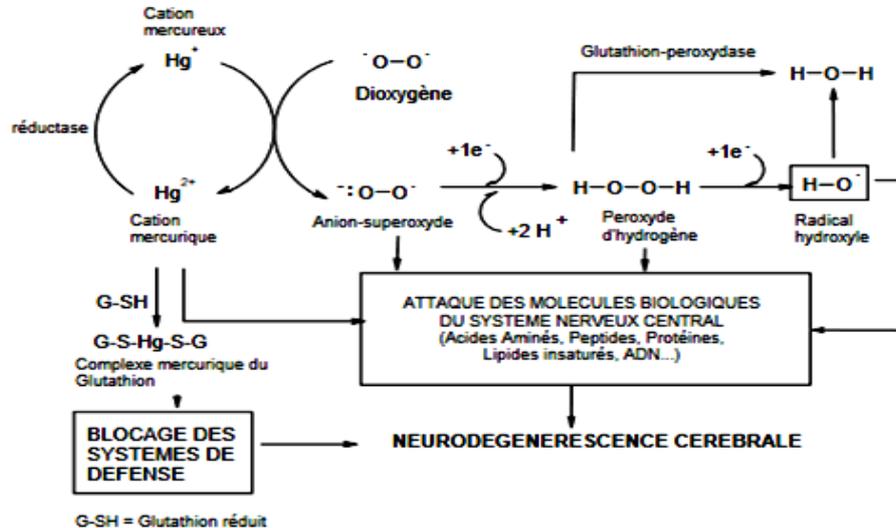


Figure 1 : Mécanismes de dégradation des molécules biologiques du système nerveux central par le cation mercurique et les entités réduites du dioxygène (ROS).

Il est possible que le rôle protecteur du sélénium dans les intoxications mercurielles soit lié à son intervention dans les systèmes de défense, comme celui de la glutathion-peroxydase, une enzyme contenant de la sélénométhionine, et dont le rôle est (avec la catalase) de neutraliser le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé durant la réduction du dioxygène. On peut rappeler que le poisson est riche en sélénium, et qu'une consommation de poisson contaminé est protectrice de la MA, malgré l'apport de méthylmercure.

7. Perturbations liées à la forte affinité du cation mercurique pour les groupements thiols des protéines

La très grande affinité des cations mercuriques (à l'instar de ceux du plomb) pour les fonctions thiols des peptides et protéines explique en grande part leur redoutable neurotoxicité.

Le cytosquelette des neurones assure entre autres le transport axoplasmique de nombreuses molécules, processus essentiel à la survie neuronale. Il est constitué par l'assemblage de microtubules se formant par polymérisation d'une protéine : la tubuline, qui possède plusieurs cystéines portant des fonctions soufrées thiol, indispensables à cette polymérisation. Les cations mercuriques empêchent ce processus par blocage des groupements thiols : il se forme alors des amas de neurofibrilles toxiques pour le neurone qui entraînent sa nécrose. La tubuline constitue ainsi une cible extrêmement vulnérable au mercure, comme

l'ont démontré de nombreuses expérimentations. De très faibles doses de mercure inorganique inhibent la phosphorylation de la tubuline par la guanosine-tri-phosphate (GTP) chez des cellules nerveuses humaines (**Duhr EF, Pendergrass JC et al .1993**). Le même mécanisme a été observé chez le rat. Ces perturbations moléculaires cérébrales sont identiques à celles observées post mortem dans les cerveaux de 80% des M.A, et l'importance des lésions est corrélée à la concentration mercurielle du cerveau (**Pendergrass JC, Haley BE, Vimy MJ et al .1997**). Il a aussi été démontré que l'ADP-ribosylation de la tubuline et de l'actine est fortement inhibée, in vivo et in vitro chez le rat, par de très faibles quantités de mercure (**Palkiewicz P, Zwiers H, Lorscheider FL.1994**). Le blocage des fonctions de la tubuline peut aboutir à l'apoptose et à la formation de protéines chaperonnes du stress thermique (**Cedrola S, Guzzi G, Ferrari D, Gritti A, Vescovi AL, Pendergrass JC et al.2003**). Enfin, sur des cultures de neurones en croissance, l'ajout de très faibles quantités de mercure inorganique (10^{-7} Mol) provoque la dépolymérisation de la tubuline, entraînant la déstructuration du cytosquelette, la dégénérescence des axones puis la formation d'amas de neurofibrilles.

Cet effet n'est pas retrouvé avec d'autres métaux neurotoxiques (Al, Pb, Mn...), et les auteurs concluent que ces données d'ordre biochimique démontrent clairement l'implication du mercure comme un facteur étiologique potentiel de la neurodégénération. Des enzymes telles que la glutamine synthétase (voir infra) et la créatine kinase (CK), laquelle joue un rôle clé dans la régulation du niveau d'adénosine triphosphate des neurones, sont particulièrement vulnérables aux cations mercuriels du fait de leur grand nombre de fonctions thiols. Or l'activité de la CK est nettement réduite dans les régions cérébrales particulièrement touchées par la MA (**David S, Shoemaker M, Haley BE.1998**).

8. Le mercure perturbe le transport du glutamate et l'activité de la glutamine-synthétase (GS)

Le glutamate, neuromédiateur impliqué dans l'apprentissage et la mémoire, est indispensable à la synthèse de l'acide gamma-amino-butérique (GABA), un neurotransmetteur, et du glutathion (**Danbolt NC.2001**).

Chez les M.A, on observe une activité excessive du glutamate, neurotransmetteur excitateur qui devient neurotoxique s'il est en excès. Or, les cations mercuriels sont des perturbateurs du métabolisme du glutamate, même à dose micromolaire. Quand ce neuromédiateur est libéré dans la fente synaptique, ils se fixent sur les fonctions thiols de ses transporteurs protéiques et inhibent sa recapture par les astrocytes. (**Mutkus L, Aschner JL, Syversen T et al.2006**). Il en résulte une élévation du glutamate extracellulaire, entraînant la mort neuronale par nécrose.

On sait par ailleurs que le taux de GS est beaucoup plus élevé dans le fluide cérébrospinal des M.A, ce qui pourrait être utilisé comme un marqueur de la maladie (**Tumani H, Shen G, Peter JB, Bruck W.1999**).

Cette enzyme est indispensable à la production de glutamine (utilisée pour la synthèse des neurotransmetteurs) à partir du glutamate capturé par l'astrocyte. Or le cation mercurique inhibe dose-dépendante l'activité de la GS dans les astrocytes bien plus que ne le fait le cation méthylmercure, même à dose très faible : une concentration de 5 μM de mercure inorganique pendant 6 heures entraîne une chute de l'activité de la GS de 74% (**Allen JW, Mutkus LA, Aschner M.2001**).

L'exposition aux vapeurs de mercure émises par les amalgames peut donc provoquer l'inhibition de la GS cérébrale, entraînant une élévation du taux de glutamate excitotoxique, à l'origine de la nécrose des astrocytes et de la perturbation du fonctionnement des neurones glutaminergiques et GABAergiques. De faibles doses de mercure inorganique (Hg^{2+}) inhibent donc l'activité de 3 protéines, l'une de structure, la tubuline, et de deux enzymes indispensables au fonctionnement cérébral, la créatine-kinase et la glutamine-synthétase. Ces mêmes perturbations cellulaires sont observées dans la MA.

9. Allèles APOE, risque de MA et exposition au mercure

On connaît l'impact majeur de l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'apolipoprotéine E sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer, et l'effet protecteur de l'allèle $\epsilon 2$. Or, les apolipoprotéines E n'interviennent pas seulement dans l'excrétion hors du SNC des lipides dont le cholestérol. Ces protéines sont aussi capables de se lier aux cations mercuriques, grâce à leurs groupements thiols possédant une très grande affinité pour cet élément (ainsi que pour d'autres cations métalliques, tels que ceux du plomb) :

le mercure stocké dans le cerveau est ainsi véhiculé par ces protéines et peut alors traverser la BHE puis être éliminé par les reins (**Mutter J, Naumann J, Sadaghiani Cet al .2004; Godfrey ME, Wojcik DP, Krone CA. 2003**). Or, l'apolipoprotéine E2 possède deux cystéines, donc deux fonctions thiols ($-\text{SH}$), l'apolipoprotéine E3 en possède une seule tandis que l'apolipoprotéine E4 en est dépourvue. Les homozygotes APOE2 possèdent donc de grandes capacités d'excréter le mercure hors du cerveau, ce qui n'est pas le cas des homozygotes APOE4. Les autres catégories ont des possibilités de détoxification intermédiaires entre ces deux probabilités extrêmes (**Mutter J, Naumann J, Sadaghiani Cet al .2004**). Des chercheurs émettent donc l'hypothèse que ce mécanisme explique la susceptibilité à la MA conférée par les gènes APOE4 : les porteurs d'un ou de deux gènes APOE4 auraient plus de risques de contracter la MA en raison de leur difficulté à éliminer le mercure. En l'absence d'exposition mercurielle (cas des Yoruba du Nigéria et des Japonais), les porteurs d'APOE4 ont donc peu de risques d'être atteints par la MA. En revanche, exposés à des quantités importantes de mercure (celui des amalgames), les migrants japonais augmenteraient leur risque de développer la maladie. La présence fréquente d'allèles $\epsilon 4$ confère

à la population afro-américaine (les "migrants historiques") un risque très élevé d'avoir la maladie, alors que le risque de MA des Yoruba, non exposés, est indépendant de l'haplotype APOE (**Hendrie HC, Murrell J, Gao S et al .2006**).

Il existe d'autres susceptibilités génétiques envers la MA, comme la plus ou moins grande capacité à synthétiser des métallothionéines en réponse à une exposition au mercure. Ces petites protéines soufrées, dont la principale fonction est le transport du zinc et du cuivre, sont capables de se lier fortement aux cations mercuriques présents dans le cerveau, permettant ainsi leur élimination. Cette variabilité génétique peut aussi expliquer l'inégalité devant une exposition mercurielle comparable (**Carrasco J, Adlard P, Cotman C et al .2006**). Un polymorphisme dit BDNF semble aussi jouer un rôle dans la vulnérabilité à une exposition mercurielle à long terme (**Echeverria D, Woods JS, Heyer NJ et al .2005**).

Par ailleurs, des scientifiques portent un intérêt croissant à la responsabilité du mercure dans des modifications de l'expression des gènes (processus épigénétiques), et particulièrement sur les effets à long terme d'une exposition mercurielle précoce et ses éventuelles conséquences transgénérationnelles.

Chapitre 2

1. Les Méthallothionéines (MTs)

Les méthallothionéines (MTs) constituent une famille de polypeptides riches en cystéine avec de faibles poids moléculaires (4-8 kDa). Elles sont capables de chélater les ions métalliques tels que le Cd(II), le Zn(II) et le Cu(I). Elles sont composées de deux domaines (α et β), chacun présentant des clusters méthalthiolate. Plusieurs rôles leurs sont attribués : (i) détoxification des métaux non essentiels tels que le cadmium et le mercure ; (ii) détoxification de l'excès de métaux essentiels tels que le cuivre et le zinc ; (iii) séquestration des radicaux et des espèces réactives de l'oxygène ; (iv) transfert et transport des métaux lourds.

2. Classification et propriétés biochimiques de la MT

MT est une famille de protéines caractérisées par leur faible poids moléculaire, elles ont une seule chaîne peptidique contenant 61 à 68 acides aminés, 20 d'entre eux sont des cystéines réparties dans deux domaines α et β -clusters (**Miles, A.T.; Hawksworth, G.M.; Beattie, J.H.; Rodilla, V.I. 2000**), et ils sont liés au total 7 ions de métaux divalents.

La chaîne polypeptidique unique de MT a la structure cys-x-cys, cys-xy-cys et cys-cys où les x et y représentent des acides aminés non cystéine ; la forme stoechiométrique de la protéine montre 7 ions pour 20 cystéines (Figure 2) formant des complexes méthal-thiolate, permettant au MT de se lier à 7–10 g d'atomes de métal/mole de MT (**Tanji, K.; Irie, Y.; Uchida, Y.; Mori, F.; Satoh, K et al . 2003**).

La liaison de MT aux métaux se fait par le groupe thiol (SH) trouvé dans les résidus de cystéine ; la protéine sans métal appelée apo-méthallothionéine ou thionéine a une structure principalement désordonnée, ce qui la rend très vulnérable aux processus protéolytiques (**Sewell, A.K.; Jensen, L.T.; Erickson, J.C et al . 1995**). Normalement, la MT a une forte affinité pour les métaux essentiels divalents tels que Cu et Zn, bien qu'elle ait également montré une forte affinité pour les métaux toxiques comme le cadmium et le mercure, donnant lieu à des amas de thiolate de métal (**Atrian, S.; Capdevila, M. 2013**).

Jusqu'à présent, 4 isoformes de la protéine sont reconnues, qui sont structurellement homologues et suffisamment conservées au cours de l'évolution (**Coyle, P.; Philcox, J.C.; Carey, L.C.; Rofe, A.M.. 2002**).

L'existence de quatre gènes MT dans une région de 50 kb sur le chromosome 8 a été rapportée chez la souris, alors que chez l'homme, les gènes MT ont été trouvés sur le chromosome 16q13 qui sont codés par un groupe de multi-gènes étroitement apparentés ; la présence de sept gènes fonctionnels MT-I : A, B, C, D, E, F, G, H et X ont été décrits, qui représentent la microhétérogénéité de la protéine MT-I ainsi qu'un seul gène codant pour l'autre isoforme de MT-II (MT-IIA), MT-III et MT-IV (**Duncan, K.E.; Ngu, T.T.; Chan, J. et al . 2006**).

Les isoformes de MT-I et MT-II sont principalement exprimés dans divers tissus animaux; MT-III et MT-IV sont des isoformes qui sont exprimées dans des tissus plus spécifiques.

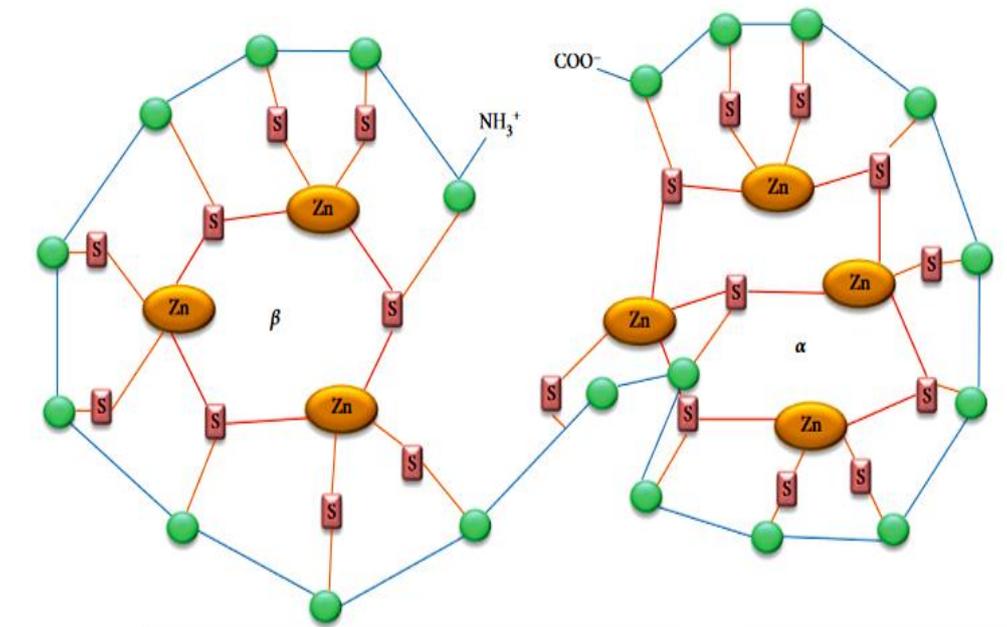


Figure 2 : Représentation schématique de la structure MT.

Les complexes métal-thiolate (avec domaine C-terminal de l' α - et N-terminal chaîne dans la chaîne β); les ovales verts représentent les 20 résidus cystéine liés au composé soufré (S) qui se lie divalent au zinc, trois liaisons au zinc de la chaîne β et quatre à la chaîne α en ajoutant sept liaisons divalentes.

3. Physiologie des MT

Plusieurs articles ont soutenu les fonctions cellulaires des MT, qui comprennent principalement l'homéostasie et le transport des métaux essentiels (Zn et Cu), la détoxification des métaux toxiques, l'apoptose, la modulation de l'équilibre redox intracellulaire, les processus anti-inflammatoires, le piégeage des radicaux libres et la protection des neurones contre les lésions neuronales (**Vašák, M.; Romero-Isart, N . 2005**). Comme mentionné ci-dessus, la MT a été initialement décrite comme une protéine responsable de l'accumulation de cadmium dans les reins des chevaux (**Hidalgo, J.; Aschner, M.; Zatta, P.; Vašák, M. 2001**). On sait maintenant que cette protéine est principalement impliquée dans la détoxification des métaux lourds tels que le cadmium et le mercure ; ces métaux se lient à la protéine en les séquestrant et en diminuant les effets aigus de ces métaux toxiques (**Faller, P.2010**).

L'induction de l'expression de MT par les métaux lourds et l'accumulation subséquente de métal dans la cellule a été utilisée comme biomarqueur dans le domaine de la toxicologie environnementale (**Atrian, S.; Capdevila, M ; 2013**).

La MT a pour fonction physiologique principale de maintenir l'homéostasie et le transport des métaux essentiels tels que le Zn et le Cu. Le zinc est un métal physiologiquement important qui fournit des fonctions structurelles et catalytiques à une variété de protéines.

La forme Apo-MT est un accepteur de Zn (qui se lie avec une haute affinité), augmentant les concentrations intracellulaires de Zn ; lorsque ces taux de Zn sont insuffisants pour stabiliser la protéine, la MT est rapidement protéolysée, de sorte que le Zn est libéré par la dégradation de la MT, ce qui fait que le Zn intracellulaire reste à une concentration équilibrée (**Duncan, K.E.; Ngu, T.T.; Chan, J et al . 2006**). Traditionnellement, MT a été considérée comme une protéine intracellulaire, est localisée dans le cytoplasme, et par translocation peut également être retrouvée dans le noyau ; cependant, des rapports plus récents suggèrent que la MT peut être localisée dans une variété d'espaces extracellulaires (**Vašák, M.; Meloni, G. 2011**).

La MT est une protéine vitale dans le système antioxydant de la défense cellulaire, et son rôle protecteur contre les dommages des ROS dans les systèmes biologiques a été largement rapporté. Différentes études ont montré que les ligands thiolate dans les résidus cystéine confèrent l'activité redox de MT ; ces résidus peuvent être oxydés par des oxydants cellulaires, et au cours de ce processus, du Zn est libéré, entraînant une diminution des niveaux de peroxydation lipidique (**Bruinink, A.; Faller, P.; Sidler, C. et al . 1998**). On sait que, lorsqu'il y a une augmentation des niveaux de stress oxydatif, la MT est capable de piéger une variété de ROS, y compris les radicaux hydroxyle et l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, les radicaux d'espèces azotées réactives et les radicaux d'oxyde nitrique (**Miles, A.T.; Hawksworth, G.M et al . 2000**) (**Hasler, D.W.; Faller, P.; Vašák, M. 1998**). Par rapport à d'autres antioxydants tels que la super oxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase, la MT peut être considérée comme un antioxydant plus efficace (**Oz, G.; Zangger, K.; Armitage, I.M. 2001**).

En outre, il existe des rapports suggérant un rôle anti-inflammatoire de la MT, qui comprend la protection du système nerveux (**Wang, H.; Zhang, Q.; Cai, B.; Li, H. et al . 2006**), dans les lésions pulmonaires et les lésions hépatiques aiguës (**Roschitzki, B.; Vašák, M. 2002**) ; il est proposé que cet effet puisse être dû à l'activation ou à l'inhibition de l'expression des interleukines pro- et anti-inflammatoires selon les conditions physiologiques présentes (**Meloni, G.; Faller, P.; Vasak, M. 2007**).

4. MT dans le système nerveux central

Le cerveau est très sensible au stress oxydatif en raison des niveaux élevés de consommation d'oxygène, de sorte que le rôle de la MT en tant que protéine qui protège contre ces processus est très important. important; comme mentionné ci-dessus, le maintien de l'homéostasie intracellulaire du Zn est l'une des principales fonctions de cette protéine et le cerveau contient des niveaux élevés de ce métal, ce qui montre l'importance de la MT dans le système nerveux central. MT-I et MT-II sont réglementés de

manière coordonnée ; leur biosynthèse peut être induite par une grande variété de stimuli tels que les conditions de stress, les niveaux de glucocorticoïdes, les cytokines, les ROS et les ions métalliques, qui se produisent dans diverses régions du système nerveux central (cortex, tronc cérébral, moelle épinière, thalamus, hippocampe, basal cerveau antérieur, néocortex, noyaux des nerfs crâniens, bulbe olfactif et cervelet) (**Bogumil, R.; Faller, P.; Pountney, D.L.; Vašák, M. 1996**).

Les MT sont des protéines principalement exprimées dans le cytoplasme cellulaire, les mitochondries et les lysosomes, dans les astrocytes, les cellules, les cellules méningées, les cellules épendymaires, la choroïde, l'arachnoïde et la pie-mère (**Roschitzki, B.; Vašák, M. 2003**). Il a été récemment rapporté que MT-I et MT-II sont également distribués de manière intra- et extracellulaire, de sorte que les neurones peuvent incorporer ces protéines dans leur cytoplasme via une famille de récepteurs de lipoprotéines de basse densité (mégaline) (**Foster, A.W.; Osman, D.; Robinson, N.J. 2014**). Bien que les cellules de la microglie, des oligodendrocytes et des neurones ne montrent généralement pas l'expression de MT-I ou MT-II, il a été observé qu'en réponse à des lésions cérébrales, la protéine peut être exprimée (**Meloni, G. et al. 2007**).

La MT-III a été isolée et rapportée pour la première fois en 1991 par Uchida et al. (**Dudev, T.; Lim, C. 2008**) chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et a été identifié comme un facteur inhibiteur de croissance (GIF) ou facteur inhibiteur de la croissance neuronale. Des études *in vitro* et *in vivo* ultérieures ont révélé que la MT-III isolée de cerveaux humains et bovins est principalement exprimée dans les neurones et contient 4 ions métalliques divalents de Cu et 3 ou 4 métaux Zn divalents, différents des métaux Zn divalents que l'on trouve normalement dans les MT-I et MT-II (**Atrian, S.; Capdevila, M. 2013**).

Une autre différence par rapport à MT-I et MT-II est que MT-III ne semble pas être régulé par des métaux ou des glucocorticoïdes, il n'est donc pas considéré comme inductible et sa distribution atomique neuronale est bien liée aux zones à fortes concentrations de Zn. (**Wang, B.; Wood, I.S.; Trayhurn, P. 2008**). Dans le cerveau normal, l'expression de MT-III est plus restreinte ; il a été rapporté que l'ARNm est lié aux cellules neuronales, alors qu'une régulation positive de MT-III peut être observée dans les cellules gliales après une lésion cérébrale (**Calvo, J.; Jung, H.; Meloni, G. 2017**).

Bien qu'il existe des rapports contradictoires sur l'expression de MT-III, il est généralement admis que la localisation cellulaire de MT-III se situe principalement dans les neurones, en particulier ceux avec de fortes concentrations de Zn, suggérant une fonction spécifique ; aucune des autres isoformes de MT n'a d'activité inhibitrice de croissance suggérant qu'il s'agit d'une caractéristique fonctionnelle spécifique de MT-III (**Meloni, G.; Faller, P.; Vasak, M. 2007**).

Le processus de neuroinflammation contribue indépendamment au dysfonctionnement neuronal ainsi qu'au processus de mort cellulaire et est un facteur important dans le développement de maladies

neurodégénératives puisque l'augmentation de la formation de ROS et de RNS peut générer un risque accru ; lorsque le tissu cérébral est endommagé suite à une lésion aiguë ou chronique, il y a une augmentation de la réponse au stress neuro-inflammatoire et oxydatif provoquant l'activation du système immunitaire avec la présence d'astrocytes réactifs, de parenchyme cérébral, de cellules macrophages et microgliales (**Faller, P.; Hureau, C.; La Penna, G. 2014**).

La MT régule l'expression des facteurs inflammatoires principalement les cytokines IL-6, IL-3 et TNF- α et les interférons présents dans les astrocytes (**Irie, Y.; Keung, W.M 2001**) ; L'IL-6 est l'une des cytokines importantes régulées à la hausse lors de lésions cérébrales, car elle augmente la phagocytose et la libération de médiateurs inflammatoires qui à leur tour induisent le site de MT en tant que protéines de neuroprotection (**Faller, P.; Hureau, C.; La Penna, G. 2014**).

Le stress oxydatif, une condition qui survient en raison d'un déséquilibre entre le statut oxydant et antioxydant, augmente avec l'âge et peut donc être considéré comme un facteur causal majeur dans les maladies neurodégénératives (**Meloni, G.; Sonois, V.; Delaine, T.; Guilloureau, L. et al .2008**). Plusieurs études ont montré des preuves suffisantes que les dommages oxydatifs jouent un rôle vital dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives.

(maladie d'Alzheimer et maladie de Parkinson) et d'autres troubles cérébraux tels que l'ischémie cérébrale et l'épilepsie (**Pedersen, J.T.; Hureau, C.; Hemmingsen, L.; Heegaard, N.H. 2012**). L'augmentation du stress oxydatif dans les troubles cérébraux est souvent associée à des mécanismes de défense antioxydants, y compris MT-I et MT-II ; la MT est capable de réduire les dommages oxydatifs en atténuant les dommages causés par le stress oxydatif, suggérant que les fonctions de cette famille de protéines sont plus complexes et variées qu'initialement envisagées (**Hussain, I.; Powell, D.; Howlett, D.R et al. 1999**).

5. MT et la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause la plus fréquente de démence, une maladie neurodégénérative liée à l'âge, caractérisée cliniquement par une détérioration progressive des fonctions mentales et les fonctions cognitives, entraînant une démence sévère (**Sinha, S.; Anderson, J.P et al .1999**). La neuropathologie est caractérisée par l'accumulation de deux types de matériel fibreux dans le cerveau : le peptide extracellulaire A β -amyloïde déposé dans les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires intraneuronales (NFT) composées principalement de fibres anormales et hyperphosphorylées. formes de la protéine tau liée aux microtubules, en plus de la présence d'un grand nombre d'astrocytes réactifs, de signes de neuroinflammation, de dyshoméostasie des métaux et d'oxydation stress (**Andreasson, U.; Portelius, E et al . 2007**).

La formation de NTF et la dégénérescence qui en résulte apparaissent d'abord dans l'hippocampe, en particulier les neurones pyramidaux de CA1 et la couche II du cortex entorhinal et du néocortex (**Mori, H.; Takio, K.; Ogawara, M.; Selkoe, D.J. 1992**). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la physiopathologie de la MA, notamment la cascade amyloïde avec accumulation d'A β , l'hypothèse des ions métalliques qui propose que la cause sous-jacente de la MA est l'homéostasie du métal détérioré, en particulier Zn, Cu et Fe qui entraîne un déséquilibre amyloïde, un stress oxydatif entraînant un dysfonctionnement mitochondrial, une dyshoméostasie des ions métalliques, une inflammation, une apoptose améliorée et un déséquilibre A β (**Moore, B.D.; Chakrabarty, P.; Levites, Y. et al . 2012**).

Il est communément admis que les ROS jouent un rôle important dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer avec un faible taux de régénération cérébrale et un potentiel antioxydant insuffisant (**Mital, M.; Wezynfeld, N.E.; Fraczyk, T et al . 2015**) ; la le cerveau favorise le stress oxydatif, en raison de l'activation de la microglie par des lésions neuronales qui génèrent un excès de radicaux superoxydes (**Andreasson, U.; Portelius, E.; Andersson, M.E et al . 2007**). Différents rapports ont suggéré que le stress oxydatif favorise la production d'A β -amyloïde et induit une altération des enzymes antioxydantes en augmentant les niveaux de stress oxydatif générant une augmentation du dépôt d'A β (**Wezynfeld, N.E.; Stefaniak, E.; Stachucy, K.; Drozd, A.; Plonka, D et al . 2016**).

Le peptide A β -amyloïde présent dans les astrocytes constituant les plaques séniles observées dans la maladie d'Alzheimer est considéré comme une source de radicaux libres ; des preuves ont montré que l'A β -amyloïde pénètre dans les mitochondries et induit la génération de radicaux libres qui favorisent la réticulation des protéines, par la formation de fibrilles amyloïdes, et l'A β lui-même peut former des peptides de radicaux libres qui peuvent entraîner des dommages oxydatifs dans neurones in vivo et in vitro (**Barritt, J.D.; Viles, J.H. 2015**). De même, des études expérimentales ont montré que A β affecte l'ADN mitochondrial et les protéines, ce qui entraîne des déficiences dans la chaîne de transport électronique (ETC) et, enfin, un dysfonctionnement mitochondrial (**Gunn, A.P.; Masters, C.L.; Cherny, R.A. 2010**), contribuant ainsi à la neurodégénérescence.

Les astrocytes réactifs présents chez les patients atteints de MA montrent des niveaux élevés significatifs d'expression de MT suggérant que les niveaux de MT peuvent servir de marqueur de la MA (**Naslund, J.; Schierhorn, A.; Hellman, U et al . 1994**). La surinduction de MT-I et MT-II dans la MA stimulée principalement par la présence de radicaux libres, d'ions métalliques et de cytokines peut être une réponse cellulaire de défense contre les signaux inflammatoires soutenant un effet neuroprotecteur de la MT (**Andreasson, U.; Portelius, E et al, . 2007**).

De même, des études expérimentales sur des animaux transgéniques ont également montré que les astrocytes et les microglies/macrophages entourant les plaques amyloïdes ont des niveaux élevés d'expression de MT-I et MT-II dans les régions du cortex et de l'hippocampe (**Durand, J.; Meloni, G. et**

al . 2010). En revanche, Valko et al. (**Pedersen, J.T.; Hureau, C et al . 2012**) ont démontré que la MT-I majoritairement régulée positivement dans les astrocytes réactifs a un effet neuroprotecteur induit par des mécanismes doubles dans la MA, atténuation directe de la neurotoxicité de l'A β et indirectement due à l'inhibition par MT-I de l'activation microgliale induite par l'A β et de la neurotoxicité subséquente.

Une autre caractéristique neuropathologique de la MA est l'altération du métabolisme du Zn et l'accumulation du métal à l'intérieur des plaques amyloïdes. Des études in vitro ont montré que Zn est capable d'induire la formation d'amyloïde A β , tandis que Cu et Fe ne produisent qu'une agrégation partielle (**Paik, S.R.; Shin, H.J.; Lee, J.H . 2000**). Deibel et al. (**Drew, S.C.; Leong, S.L.; Pham, C.L et al 2008,**) ont rapporté une diminution significative de Cu et des augmentations significatives des niveaux de Zn et Fe dans l'hippocampe et l'amygdale qui sont des zones qui présentent des altérations histopathologiques sévères chez les patients atteints de MA ; en raison de son rôle dans le maintien homéostatique du Zn et du Cu, le MT est considéré comme un facteur important dans les mécanismes physiopathologiques de la maladie. Il a également été rapporté dans des études in vitro que MT-2A a été capable d'empêcher les agrégations d'A β 40 et d'A β 42 qui sont contrecarrées en empêchant la neurotoxicité (**Bogumil, R.; Faller, P et al . 1996**).

L'expression de MT-III a été observée dans différentes maladies neurologiques ; cependant, les mécanismes moléculaires de la régulation négative de MT-III dans les maladies neurodégénératives ne sont pas encore connus, et malheureusement, il existe plusieurs rapports avec des résultats contradictoires sur la fonction de MT-III dans la MA. La MT-III est exprimée en abondance dans les cerveaux normaux mais largement réduite dans les cerveaux AD ; dans des études in vitro, une inhibition de la formation des neurites et de la survie des neurones corticaux a été rapportée (**Dudev, T.; Lim, C. 2008**)

La MT-III et les altérations de l'homéostasie du Zn ont été corrélées à la perte neuronale ou à la durée de la maladie, ce qui implique une sensibilité accrue au stress oxydatif et neurotoxicité induite par les métaux (**Dickson, D.W.. 1997**). MT-III peut lier plus d'ions métalliques, son rôle de tampon Zn et de capteur/signalisation, et a également une réponse périodique à l'insulte neuronale, tandis que d'autres isoformes sont uniformément protectrices (**Andreasson, U.; Portelius, E. et al 2007**). Contrairement à MT-I, l'expression de l'ARNm de MT-III n'a été significativement altérée dans aucun des modèles de MA étudiés, probablement parce que MT-III est insensible à l'inflammation (**Durand, J.; Meloni, G et al . 2010**). La MT-III a une activité anti-A β et antagonise les effets neurotoxiques des peptides A β principalement en supprimant la formation d'agrégats toxiques de Peptides A β (**Prusiner, S.B. 1991**). La diminution de l'expression de MT-III chez les patients atteints de MA suggère un possible effet protecteur réduit dans le cerveau de la MA (**Aguzzi, A.; Heikenwalder, M.2006**).

6. La MT et le mercure

Des protéines telles que la MT-3 sont capables de prendre le mercure fixé à l'A β . Leur effet protecteur contre la production de HO \bullet a été mis en évidence. Or il a été montré que cette protéine était déficiente chez les patients de la MA où son taux est 10 fois moins élevé que chez le sujet sain. La recherche de protéines, n'assurant plus leur rôle dans le cas de la MA, pourrait, peut être, permettre d'expliquer l'accumulation des métaux au niveau des plaques amyloïdes.

MT forme des complexes plus stables avec le Hg que ceux de Zn et du Cd (**A. Muñoz, AR Rodríguez, 1995**). Compte tenu de certaines similitudes dans les propriétés du Cd(II) et de l'Hg (II), il est raisonnable de proposer que ce site puisse être responsable de la liaison de l'Hg (**Muñoz et Rodríguez, 1995**). Des études sur les caractéristiques structurales de l'interaction entre l'Hg et les MT réalisées par (**Henkel et Krebs (2004) et Lu et al. (1993)**), suggèrent qu'une molécule de MT lie jusqu'à 18 ions d'Hg.

La géométrie de tels complexes est supposée être pseudo-tétraédrique avec des ponts métal-ion entre les molécules de protéines. Hg₄-a-MT et Hg₇-MT sont caractérisés par une géométrie tétraédrique, alors que Hg₁₁-MT est supposé avoir une géométrie trigonale. La liaison au mercure entraîne la formation de régions MS₂₋₄ isolées et d'amas Hg-thiolate (RS)₁₋₃MSRM(SR)₁₋₃, où jusqu'à quatre atomes S de résidus Cys se lient aux ions métalliques à la fois en position terminale et en position de pont (**W. Goumakos, J.-P. Laussac, B. 1991**).

Les souris dépourvues de MT étaient caractérisées par une plus grande susceptibilité à la neurotoxicité du Hg⁰ en raison d'une accumulation accrue d'Hg dans le cerveau (**M. Yoshida, C. Watanabe et al. 2005**). Des données intéressantes ont été obtenues à partir de souris dépourvues de MT, démontrant qu'un manque de MT chez les souris exposées à la vapeur d'Hg (Hg⁰) entraîne un changement dans la liaison entre l'Hg et les protéines de haut poids moléculaire (**M. Yoshida, M. Satoh, et al. 2002**).

Ces résultats cadrent bien avec l'hypothèse générale selon laquelle les MT servent de protéines détoxifiantes pour le Cd et l'Hg.

Chapitre 3

Il a été montré que les ions métalliques aident à la structuration des peptides amyloïdes et à leur agrégation en plaques insolubles, ainsi qu'à la production de stress oxydant. La mise en évidence d'un niveau élevé d'ions métalliques à activité redox au niveau des zones du cerveau touchées par la maladie d'Alzheimer est à l'origine de l'idée d'utiliser des chélateurs de ces ions métalliques pour empêcher leurs effets pathogènes (**Bush, 2002; Cuajungco et al., 2005**).

1. Définition et spécificité de la thérapie par chélation

La thérapie par chélation a été proposée comme traitement approprié pour réduire les anomalies d'accumulation de métaux essentiels, tels que Fe, Cu et Zn, et des métaux lourds toxiques ou non essentiels comme le plomb (Pb), le mercure (Hg), le cadmium (Cd) et l'aluminium (Al) (**Kalia K, Flora SJ.2005–Yokel RA, Ackrill P, Burgess E et al .1996**).

Typiquement, les chélateurs se lient aux ions métalliques améliorant leur excrétion urinaire et fécale et provoquant une diminution de leurs concentrations corporelles. La thérapie par chélation est devenue un traitement alternatif populaire, malgré ses résultats cliniques encore controversés (**Carter JP.1989, Knudtson ML, Wyse DG, Galbraith PD et al .2002**).

Les traitements efficaces par chélation de l'empoisonnement aux métaux nécessitent une compréhension précise de la pharmacodynamie et de la pharmacocinétique du chélateur administré qui, à son tour, dépend des caractéristiques physiques et chimiques des métaux (**Andersen O.2004**).

Les chélateurs hydrophiles favorisent l'excrétion rénale, mais leur localisation majoritairement extracellulaire à activité limitée uniquement sur les pools de métaux extracellulaires. Inversement, les chélateurs lipophiles pourraient diminuer les réserves intracellulaires, mais peuvent également redistribuer des métaux toxiques vers des organes plus vulnérables, par exemple, le cerveau.

La sélectivité métallique des chélateurs est très importante, en raison de risque de l'épuisement d'un métal essentiel. De plus, dans les maladies chroniques induites par les métaux, nécessitant une chélation de longue durée, la toxicité et les effets secondaires du chélateur peuvent limiter considérablement la durée du traitement. Ainsi, le développement de nouveaux chélateurs plus sûrs adaptés à une administration orale pour éliminer les métaux à long terme reste un défi de recherche important.

De plus, un effet tératogène a potentiel important été démontré pour la plupart des chélateurs en raison de carences induites en oligo-éléments (**Domingo JL.1995**), et donc une supplémentation minérale pendant le traitement est recommandée.

La conception d'améliorer d'un chélateur doit viser à améliorer la sélectivité, l'affinité, la stabilité, la clairance rénale et l'activité orale, tout en conservant une faible toxicité et également un faible coût. Enfin, il faut se rappeler que l'adaptation de la thérapie de chélation aux conditions neurodégénératives est une tâche très complexe.

2. Les chélateurs pour traiter la maladie d'Alzheimer

Les chercheurs ont postulé que la chélation des métaux pourrait favoriser des résultats bénéfiques sur les patients MA en inhibant le dépôt de ces métaux dans le cerveau et/ou en les empêchant de catalyser la formation de radicaux hydroxyles toxiques (Smith MA, Nunomura A, Zhu X et al .2000– House E, Collingwood J, Khan A et al.2004). Quelques études de cas et animaux des expérimentations ont été rapportées dans ce domaine (Scarpini E, Scheltens P, Feldman H.2003– Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A et al.2003) ; cependant, aucune preuve clinique n'a été fournies jusqu'à présent pour soutenir l'utilisation d'agents chélateurs comme traitement d'appoint de la MA ou d'autres troubles neurodégénératifs d'étiologie similaire. Chélation

3. Les chélateurs du mercure

Différents agents de chélation, comme la pénicillamine, le dimercaprol, le 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate (DMPS), et méso-2,3-dimercaptosuccinique acide (DMSA), ont été administrés pour la chélation du mercure (Carvalho *et al.*, 2007) . Le DMSA, acide dimercaptosuccinique est un agent important, administré oralement, qui a été utilisé comme antidote dans les empoisonnements aux métaux lourds toxiques. Depuis les années 50, de vastes études cliniques chinoises, japonaises et russes ont démontré que le DMSA accélère l'élimination du mercure du cerveau et qu'il l'élimine efficacement du sang, du foie et des reins. En l'état actuel de nos connaissances, le DMSA semble être l'agent pharmaceutique favori pour la détoxification systémique du mercure. (Klaassen *et al.*, 1980 ; Aposhia *et al.*, 1983).

Cependant, les résultats bénéfiques désirés ne sont généralement pas atteints. En fait, même si l'excrétion urinaire du mercure pourrait être considérablement améliorée au cours de la thérapie de chélation, son efficacité sur la disparition des dépôts de ces métaux dans les tissus semble être négligeable. Les données existantes concernant l'utilisation de la thérapie de chélation dans l'empoisonnement au mercure indique que ces chélateurs chimiques peuvent retirer ces métaux du corps, mais ne peuvent pas réparer les dommages causés au système nerveux central (Clarkson *et al.*, 2003).

Le danger auquel ces produits chélateurs exposent le patient est, dans la majorité des cas, plus important que l'intoxication mercurielle elle-même. En effet, les agents de chélation ne sont pas sélectifs, c'est-à-dire qu'ils piègent aussi bien des métaux rares présents en traces que des métaux lourds en excès.

Les oligo-éléments nécessaires aux processus enzymatiques (présents dans les métallo-enzymes) sont donc éliminés en même temps que les métaux lourds excédentaires. Il est impossible de recomposer pour un patient donné une complémentation alimentaire en oligo-éléments car on ne connaît pas aujourd'hui la liste complète des métaux utilisés par l'organisme dans la gestion de son équilibre biologique. Nous

considérons donc que l'utilisation d'agents de chélation chimique dans l'élimination du mercure et de l'aluminium est une technique périlleuse pour le devenir de la qualité de vie du patient.

Par ailleurs, de nouvelles méthodes thérapeutiques sont au stade expérimental, qui utilise la combinaison de chélateurs à des nanoparticules ; ces nouveaux médicaments ont la capacité de traverser aisément la barrière hémato-encéphalique et reviennent tout aussi facilement dans la circulation sanguine, éventuellement chargés de métaux présents dans le cerveau en trop grande quantité (Cui *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2006).

4. Les composés naturels comme chélateurs du mercure

La littérature révèle qu'au cours des 12 dernières années, la recherche de plantes médicinales et leurs constituants, c'est-à-dire les composés phytochimiques qui pourraient atténuer la toxicité du mercure chez les animaux de laboratoire se sont intensifiés.

Diverses plantes médicinales et produits naturels offrent une atténuation significative de la toxicité du mercure induite expérimentalement dans des modèles animaux.

Ce chapitre résume les résultats de la recherche préclinique dans ce domaine.

Une enquête sur la littérature associée à Internet a été réalisée en utilisant la base de données Google, Scholar Google, Scopus et Pub-Med. Seuls les articles de revues scientifiques publiés sur Internet au cours des deux dernières décennies (1998-2018) ont été considérés ici.

Les études expérimentales précliniques sur les plantes médicinales (brutes, semi-pures ou extraits enrichis) et les constituants issus de plantes (y compris les huiles fixes et essentielles) ont été choisies.

Vingt-sept (27) plantes médicinales ont été signalées posséder un effet améliorant sur la toxicité du mercure dans des modèles expérimentaux de toxicité du mercure.

Les détails sont résumés dans le tableau 1. Ceux-ci comprennent certaines plantes putatives reconnues en Ayurveda, le système traditionnel de la médecine indienne et mondiale, à savoir *Zingiber officinale*, *Bacopa monnari*, *Tribulus terrestris*, *Allium sativum*, *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera*, *Ocimum sanctum* et *Curcuma longa*. Et les principales plantes alimentaires, comprennent *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera*, *Zanthoxylum piperitum*, *Triticum aestivum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale* et *Allium sativum*.

Les extraits bruts de matières végétales séchées à l'aide de solvants comme l'éthanol sont utilisés pour ces études. En cas de *Camellia sinensis* (feuille de thé), *Rheum palmatum* (rhubarbe), *Zanthoxylum piperitum* (poivre japonais/coréen) et *Vitis vinifera* (pépins de raisin) un constituant chimique spécifique ou des extraits enrichis en principes actifs ont été utilisés et trouvés pour avoir des effets bénéfiques dans l'amélioration de multiples toxicités organiques chez les rongeurs.

Tableau 1 : quelque plantes médicinales ayant un potentiel de réduire la toxicité du mercure dans le cerveau.

N°	Nom botanique	Partie de plante/ Extraits utilisés	Toxique utilisé	Modèle expérimental	Référence(s)
1	<i>Dendropanax morbifera</i>	Feuille	(CH ₃) ₂ Hg	Rat	Kim et al., 2015
2	<i>Bacopa monnieri</i>	Parties aériennes	CH ₃ Hg	Rat	Sumathi et al., 2012; Ayyathan et al., 2015
3	<i>Allium sativum</i>	Ampoule	CH ₃ Hg	Rat	Bellé et al., 2009
4	<i>Vitis vinifère</i>	Proanthocyanidi ne de graines extrait	CH ₃ Hg	Rat	Yang et al., 2012
5	<i>Artemisia absinthium</i>	Parties aériennes	HgCl ₂	Rat	Hallal et al., 2016
6	<i>Launaea taraxacifolia</i>	Feuille	HgCl ₂	Rat	Owoeye et Arinola, 2017.

Vingt-sept (27) produits naturels d'origine végétale ont démontré des effets atténuants de la toxicité induite par le mercure, principalement chez les rongeurs.

Les détails sont donnés dans le tableau 2. Parmi eux deux sont des vitamines, à savoir l'acide ascorbique (vitamine C) et α -tocophérol (vitamine E) et un est une pro-vitamine A (β -carotène). Deux sont des huiles fixes, à savoir l'huile de grenade, huile de moringa; et deux sont des huiles essentielles à savoir l'huile d'argan et l'huile de *Selinum vaginatum*.

L'Acide ascorbique, α -tocophérol et la quercétine sont également utilisés comme composés de référence. La co-administration du β -carotène et d' α -tocophérol a montré une amélioration importante en récupérant le stress oxydatif, indiquant la probabilité de cette combinaison pour le régime clinique.

Tableau 2 : quelque produits naturels ayant un potentiel de réduire la toxicité du mercure dans le cerveau.

N°	Nom	Toxique utilisé	Modèle expérimental	Organe(s)/Système/ Lignée cellulaire impliquée	Référence(s)
1	β -carotène + α -tocophérol	CH ₃ HgCl	Souris	Foie, Cerveau, Rein	Andersen et Andersen, 1993
2	α -tocophérol	HgCl ₂	Rat	Foie, rein, cerveau	Agarwal et al., 2010a
	Curcumine	HgCl ₂	Rat	Foie, rein, cerveau	Agarwal et al., 2010b ; Tamer et Saad, 2013 ;

3				testicules	García-Niño & Pedraza-Chaverri, 2014 ; Joshi et al., 2017b, Liu et al., 2017
4	Fiséline	CH ₃ Hg	Rat	Cerveau de fœtus	Jacob et Thangarajan, 2017
5	Myricétine	CH ₃ Hg	Souris	Cerveau	Franco et al., 2010
6	Vitamine K	CH ₃ Hg	Rat	Cerveau	Sakaue et al., 2011
7	Berbérine	HgCl ₂	Rat	Cerveau, Foie, Rein	Othman et al., 2014 ; Moneim.2015
8	Sulfure de diallyle	HgCl ₂	Rat	Cerveau	Ansar, 2015
9	Huile de <i>Selinum vaginatum</i>	CH ₃ Hg	Rat	Cerveau	Thiagarajan et al., 2018

Il apparaît que les médicaments à base de plantes ont joué un rôle important dans l'atténuation de la toxicité induite par le mercure expérimentalement chez les animaux. Les extraits végétaux bruts ou semi-purs en général, présentent activités antioxydantes et montrent ainsi un potentiel de réduction de l'oxydation induite par le mercure. Par ailleurs, la modulation de l'apoptose dans les organes intoxiqués.

A ce jour aucune étude clinique n'a été trouvée dans la littérature scientifique où les médicaments à base de plantes ou des produits phytochimiques ont supprimé tout type de toxicité induite par mercure chez l'homme.

Ces composés phytochimiques dignes d'intérêt des études préclinique et cliniques. Ils peuvent être utilisés seuls, ou en combinaison d'une façon concomitante avec des agents chélateurs traditionnels ou plus récents.

Cependant il existe un besoin urgent de développer des thérapies contre les intoxications mercurielles. Il existe une forte demande pour développer de nouveaux médicaments sans effets secondaires. Il semble donc important d'investir au niveau de la recherche, pour trouver rapidement de médicaments efficaces contre la maladie d'Alzheimer et qui peuvent chélater le mercure et les autres métaux toxiques et cela constitue un enjeu majeur pour les laboratoires de recherches de l'industrie pharmaceutique.

Sachant qu'actuellement le développement des outils informatiques a considérablement révolutionné le domaine médico-pharmaceutique. Ceci a permis de mettre en place des programmes performants accessibles à la communauté scientifique constituant un grand support pour le processus de recherche et développement en donnant lieu à des méthodes de conception des médicaments ou « drug-design » dites in silico. C'est dans ce but que des techniques de modélisation moléculaires, regroupées sous le nom de "amarrage" ou "docking" moléculaire ont été développées. Le docking moléculaire est une technique de criblage in silico de drug-design « structure-based » (basée sur la structure), facile à mettre en œuvre, offre un complément aux méthodes expérimentales et qui fait gagner du temps et de l'argent pour la découverte de nouveaux médicaments. Il vise à prédire la structure d'un complexe formé à partir de petites molécules isolées appelées ligands qui interagissent avec une cible biologique généralement protéique. Dans ce contexte, s'articule notre travail qui consiste à proposer de nouvelles séries de produits qui seront testés in silico vis-à-vis des cibles du mercure et de la MA.

Chapitre 4

1. Définition du docking moléculaire

Le docking moléculaire est l'étude *in silico* des différents mécanismes et interactions qui interviennent. L'objectif étant de déterminer comment ces molécules s'agencent l'une par rapport à l'autre (Khadidja M et Ikram L.2019).

Les 3 étapes d'un criblage virtuel

Tout criblage virtuel se décompose en trois étapes d'égale importance:

- (1) la mise au point de la chimiothèque de départ,
- (2) le criblage proprement dit,
- (3) la sélection d'une liste de touches virtuelles.

Il est à noter que toute erreur à chacune de ces trois étapes aura des conséquences importantes se traduisant généralement par une augmentation du taux de faux positifs et de faux négatifs. Il convient donc d'être très attentif à chacune d'entre elles. (Rognan n.d.)

2. Intérêt du docking

Le docking permet de prédire l'effet biologique d'un grand nombre de molécules dans un laps de temps raisonnable et de proposer ensuite un plus petit nombre de molécules à synthétiser ou à tester sur une certaine cible (Khadidja M et Ikram L.2019).

Sa fonction principale est d'étudier et de prédire les interactions potentielles entre le ligand et les acides aminés qui composent la structure de la cible. Elle permet également de prédire la forme la plus favorable du ligand au sein de son récepteur (figure 3).



Figure 3 : Intérêt du docking (Khadidja M et Ikram L.2019).

3. Applications du docking moléculaire

L'application la plus ancienne est la prédiction du mode d'interaction, tandis que la plus récente est l'optimisation de molécules ayant déjà interagi avec le récepteur.

L'interaction d'une petite molécule avec une protéine enzymatique peut provoquer l'activation ou l'inhibition de l'enzyme. Si la protéine est un récepteur, l'interaction du ligand avec elle peut avoir un effet agoniste ou antagoniste. Le terme « amarrage » est le plus couramment utilisé dans le contexte du développement de médicaments.

4. Différents types de docking moléculaire

Il existe deux types de classification du docking moléculaire. Le docking peut avoir lieu entre : protéine-protéine, ligand-protéine et protéine-nucléotide.

Le docking peut être classé également en docking rigide, flexible et semi-flexible (voir figure 4)

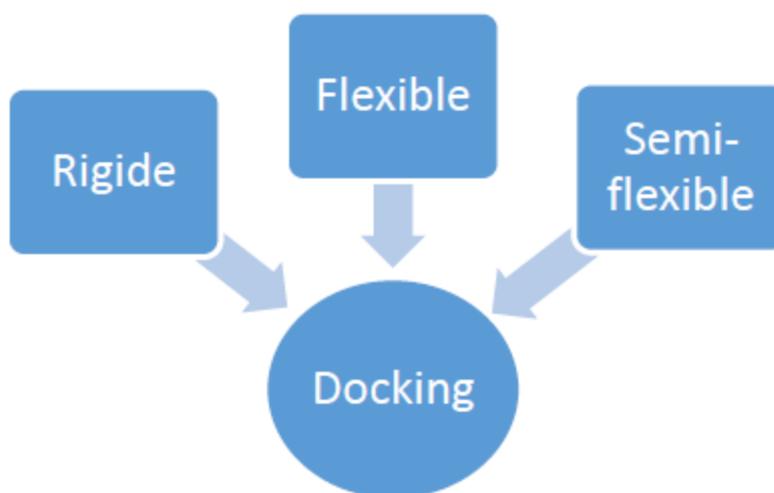


Figure 4: Types de docking (Chevrollier N.2019).

4.1 Docking rigide

Le ligand et le récepteur sont des entités rigides, nous cherchons la pose optimale par positionnement en énumérant toutes les rotations et les translations possibles pour le ligand à l'intérieur du site d'interaction. Ensuite nous éliminons les poses incompatibles avec le site actif. Enfin, nous attribuons aux poses sélectionnées un score et nous optimisons les meilleures. Seuls les degrés de liberté translationnels et rotationnels du ligand relativement à la protéine sont explorés. Il est généralement employé pour l'amarrage entre deux macromolécules pour lesquelles les degrés de liberté sont très importants pour

réaliser un échantillonnage conformationnel efficace dans des temps de calcul raisonnables. C'est le plus simple et demeure encore souvent employé pour l'amarrage protéine-protéine (**Chevrollier N.2019**).

4.2 Docking flexible

Dans le docking flexible, le ligand et la protéine sont flexibles (la flexibilité du récepteur concerne les chaînes latérales des résidus du site actif). Les degrés de liberté conformationnels du récepteur peuvent être limités à certaines chaînes latérales ou bien considérer également des mouvements plus larges impliquant par exemple les différents arrangements possibles entre domaines d'une protéine. Ce type de docking représente une approche plus réaliste en considérant des modèles de liaison du ligand au récepteur de type ajustement induit et/ou la sélection conformationnelle.

C'est l'approche la plus utilisée dans la plupart des logiciels de docking car elle permet une évaluation rapide de bases de milliers de molécules.

En revanche, elle est approximative et l'exploration de l'ensemble des degrés de liberté du ligand et du récepteur implique des difficultés importantes liées au temps de calculs nécessaires pour exploiter le docking flexible efficacement (**Chevrollier N.2019**).

4.3 Docking semi-flexible

Dans le docking semi-flexible, le ligand est flexible et la protéine est rigide, l'échantillonnage des degrés de liberté du ligand s'ajoute aux explorations translationnelles et rotationnelles. Ce type de docking repose sur l'hypothèse que la conformation du récepteur utilisée est apte à reconnaître le ligand. Il est "asymétrique" et généralement utilisé pour l'amarrage protéine-ligand. Les approches de docking semi-flexible ou flexible sont plus généralement appliquées à la modélisation d'interaction entre protéines et ligand (**Chevrollier N.2019**).

5. Etapes de docking moléculaire

Une simulation de docking comprend deux étapes principales : le docking proprement dit et l'étape de scoring.

5.1 Docking proprement dit

C'est l'étape de sélection, qui consiste à placer le ligand dans le site actif de la protéine à la recherche des conformations du ligand apte à établir des interactions idéales avec le récepteur.

5.2 Scoring

C'est l'étape de classement, elle permet d'évaluer les conformations obtenues lors de la première étape par le calcul de l'énergie libre qui résulte du passage du ligand et de la protéine de la forme libre vers la formation d'un complexe. Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur, c'est uniquement une estimation de l'affinité entre le ligand et la protéine et non pas de l'activité.

Une fonction de score doit être efficace et sélective, elle doit diriger la recherche en fournissant un gradient d'énergie, et identifier le mode d'interaction correct parmi un ensemble de leurres (Saoussene ML .2016).

6. Les outils du docking moléculaires

6.1 Le récepteur

La première grande voie d'étude et de conception de molécules bioactives par modélisation moléculaire est celle qui se fonde sur la structure des récepteurs. Cette approche est basée sur l'exploitation de la structure moléculaire tridimensionnelle de la protéine cible. Trois méthodes expérimentales permettent aujourd'hui de déterminer la structure des protéines : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X. Cette dernière technique est responsable de la majorité des structures issues d'une base de données de structures appelée la Protéine Data Bank (PDB).

6.2 Le ligand

En docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules.

Pour un docking moléculaire, le ligand doit être également sous forme 3D. A présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné : La première souvent d'aspect commercial, est constituée de bases de données de structures chimiques appelés chimiothèques ou espaces chimique.

Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que chemDraw, Arguslab, Titan ou Sybyl...etc.

7. Un programme de docking moléculaire

Le docking moléculaire s'accomplit en deux étapes complémentaires. La première consiste à rechercher les conformations du ligand aptes à établir des interactions idéales avec le récepteur. La

deuxième est une fonction de score qui permet d'évaluer ces conformations par un calcul rapide de leur énergie d'interaction avec ce récepteur (**Bensegueni A.2007**).

7.1 Autodock

L'étape de docking moléculaire est réalisée grâce au sous-programme AutoDock. Est une suite d'outils de docking automatisés. Il est conçu pour prédire comment de petites molécules, telles que des substrats ou des médicaments candidats, se lient à un récepteur de structure 3D connue. On a utilisé deux logiciels d'autodock :

7.2 Autodock vina

AutoDock Vina est une nouvelle génération de logiciel d'accueil du MGL (Molecular Graphics Laboratory). Il réalise des améliorations significatives de la précision moyenne des prédictions de mode de liaison, AutoDock Vina ne nécessite pas de choisir les types d'atomes et de pré-calculer les cartes de grille pour eux. Au lieu de cela, il calcule les grilles en interne, pour les types d'atomes nécessaires, et il le fait pratiquement instantanément.

7.3 Autodock tools

AutoDockTools, (ADT), permet entre autres de définir quelles liaisons seront traitées comme rotatives dans le ligand et d'analyser les ancrages (http://autodock.scripps.edu/index_html/?searchterm=autodock).

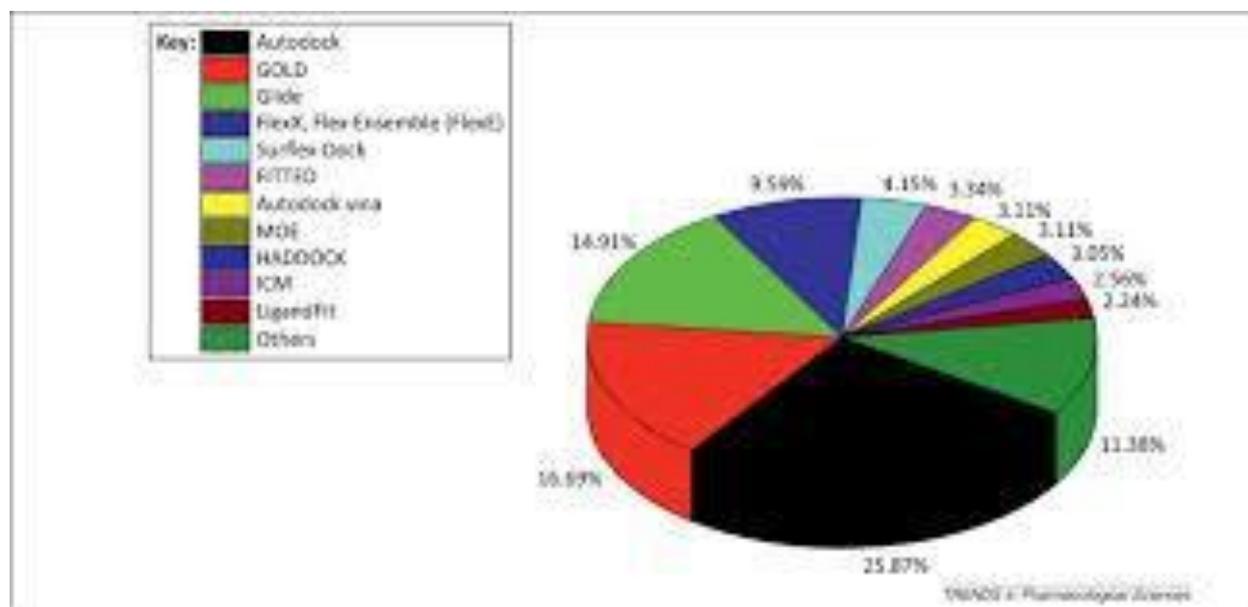


Figure 5 Schéma représente que l'AutoDock est la plus utilisé (<https://www.google.com/search?q=autodock>).

7.4 PubChem

PubChem est la plus grande collection au monde d'informations chimiques librement accessibles.

Recherchez des produits chimiques par nom, formule moléculaire, structure et autres identifiants. Trouvez des propriétés chimiques et physiques, des activités biologiques, des informations sur la sécurité et la toxicité, des brevets, des citations de la littérature et plus encore.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

7.5 PDB :(protein-data-bank)

La Protein Data Bank (PDB est un répertoire mondial de dépôt d'informations sur la structure tridimensionnelle des protéines et des acides nucléiques. Ces molécules proviennent de l'ensemble des règnes biologiques. La PDB est gratuitement accessible par Internet (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Elle contient plusieurs de milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie aux rayons X, soit par RMN (**Fortuné A.2006**). Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la banque, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée (**Krid A.2008**).

8. Fonction de score

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe (**Arrault A. 2007**).

9. Le Redocking

Le processus par lequel un ligand est pris de la structure d'un complexe de celui-ci avec un récepteur, et ancré à la forme "induite-fit" du récepteur. Ceci est souvent effectué pour vérifier que les paramètres du docking spécifiés dans le fichier d'entrée pour la méthode du docking sont raisonnables et capables de récupérer la structure et les interactions d'un complexe connu (<http://autodock.scripps.edu/faqs-help/glossary/redocking>).

La technique de simulation du docking moléculaire est validée en utilisant les paramètres suivants :

- **Énergie de liaison:** La méthode de simulation du docking moléculaire est initialement validée sur la base de l'énergie de liaison obtenue. La plage prédéfinie d'énergie de liaison doit être comprise entre -5 et -15 kcal / mol.
- **Méthodes de superposition ou similarité des acides aminés:** Une validation supplémentaire de la méthode du docking moléculaire est effectuée par la méthode de superposition. La conformation ancrée du ligand lié doit être impeccablement superposée en référence à la conformation bioactive du ligand présent dans la structure cristalline de la protéine téléchargée.

- **RMSD** : La déviation quadratique moyenne si le ligand ancré affiche $<2.0\text{\AA}$ ° Valeur RMSD (root-mean-square derivation) avec le ligand cristallographique, il est considéré comme un amarrage réussi.

10. Les interactions Protéine- ligand (complexe protéine-ligand)

La reconnaissance moléculaire est un critère essentiel impliquant une complémentarité spatiale entre le ligand et Son récepteur. Cette complémentarité est importante car elle permet de laisser entrer le ligand mais elle ne suffit pas pour qu'il reste au sein de la protéine. Dans ce contexte, une complémentarité chimique Protéine-ligand est indispensable faisant intervenir le plus souvent des **interactions non covalentes** telles que : la liaison hydrogène, ionique, hydrophobes...etc.

Les liaisons non covalentes sont des qui ont lieu pour des distances plus élevées que les liaisons covalentes. Bien que ce type d'interactions soit énergétiquement beaucoup plus faible par rapport à une liaison covalente (C-C ou C-N par exemple), leur portée est bien plus grande car assurant l'évolution des biomolécules, et notamment les changements conformationnels. En effet, les liaisons non covalentes peuvent être créées et rompues plus facilement

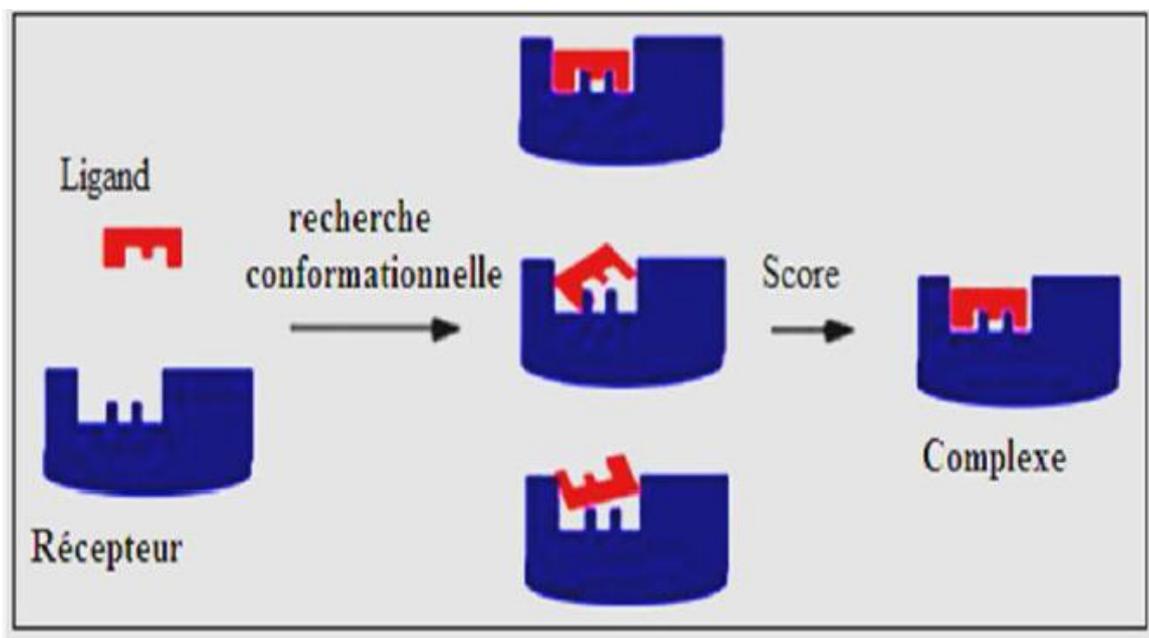


Figure 6 : Représentation des étapes du docking

10.1 Les liaisons hydrogènes

La liaison hydrogène est une interaction stabilisante entre deux atomes, elle est de très faible énergie et agit à très faible distance.

Elle se forme entre l'atome d'hydrogène d'une molécule polaire (accepteur) et un atome très électronégatif portant un doublet non liant (donneur) essentiellement l'azote, l'oxygène, le fluor et le chlore (voir figure7) (Martin T et Derewenda Z.1999).

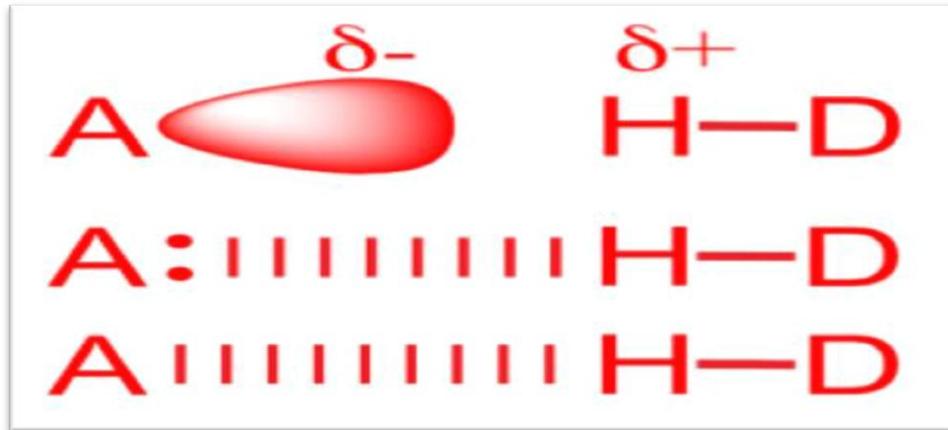


Figure 7 : Liaisons hydrogènes (<https://ressources.unisciel.fr/>).

10.2 Les interactions de Van Der Walls

Ce sont des interactions de faible intensité entre dipôles électriques et donnent un dipôle instantané qui se forme grâce à la différence des électronégativités, ce qui donne des pôles positifs et négatifs (voir figure 8) (Salahi D.2014).

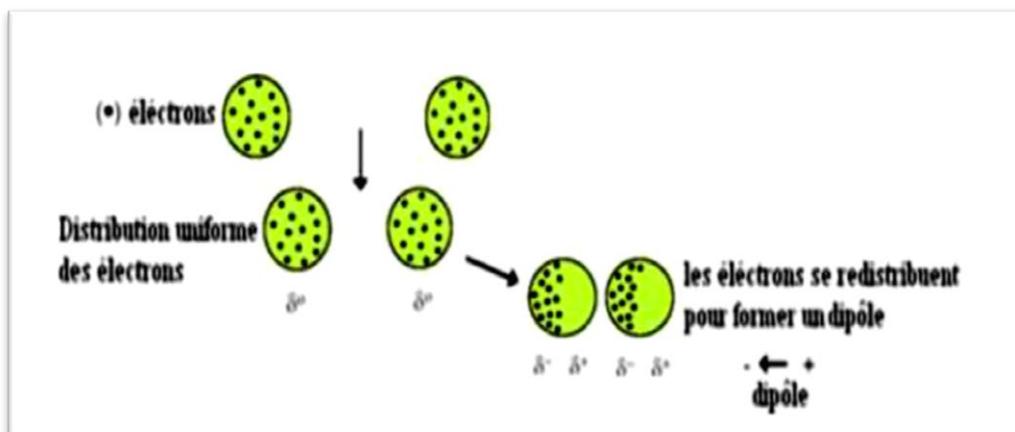


Figure 8: Interaction de van der Waal (Khadidja M et Ikram L.2019).

10.3 Les interactions hydrophobes

Une protéine se forme d'un assemblage de nombreux acides aminés. Ces derniers possèdent un radical apolaire et hydrophobe (comme mentionné sur la figure 9), c'est la zone hydrophobe de la protéine (ils ne forment aucune liaison hydrogène avec les molécules d'eau) (Martin T et Derewenda Z.1999).

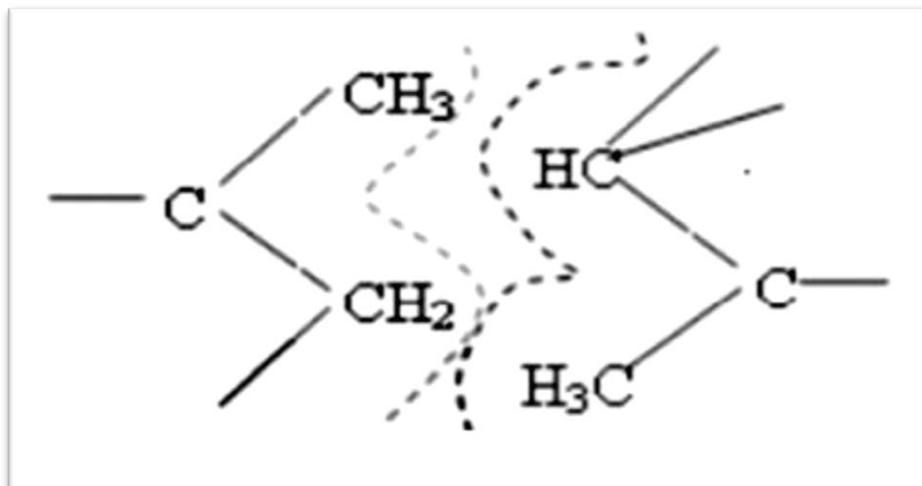


Figure 9 : liaison hydrophobe (Khadidja M et Ikram L.2019).

10.4 Les interactions électrostatiques

Les groupements fonctionnels chargés des acides aminés agissent à longue distance pour donner naissance à des interactions électrostatiques (voir figure10) (<https://ressources.unisciel.fr/>).

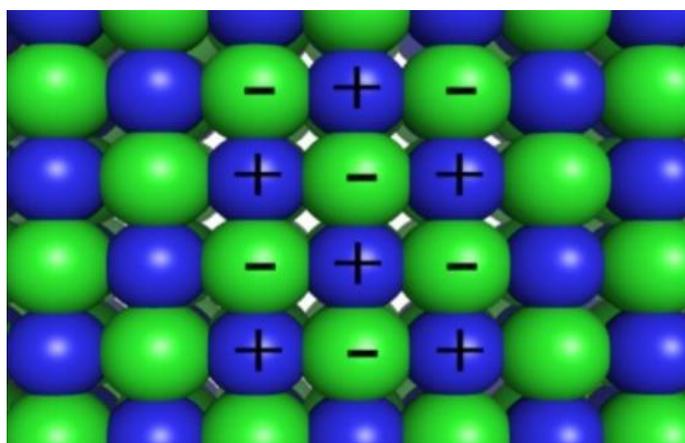


Figure 10: Interaction électrostatique (<https://ressources.unisciel.fr/>).

Partie
pratique

Matériels

Et

Méthodes

Matériels et méthodes

1. Spécifications de matérielles

Les calculs pour les amarrages moléculaires ont été effectués sur un système d'exploitation Lenovo Intel (R) Pentium (R) CPU 2020M à 2,40 GHz, RAM : 4,00 Go et Windows 7.

2. Spécifications de logiciels

La structure de la protéine (récepteur ou cible) a été obtenue à partir du site <https://www.rcsb.org>. Pour les études d'amarrage moléculaire, l'outil Auto Dock Vina a été utilisé (<https://vina.scripps.edu/>). Pour la vérification de l'amarrage, Discovery Studio Visualizer a été téléchargé à partir du site : <https://www.3dsbiovia.com>.

3. Préparation de récepteur

La Protéine Data Bank (<http://www.rcsb.org>) a été utilisée pour obtenir la structure tridimensionnelle publiée de la Métallothionéine 3 (PDB ID : **2FJ5**) (Burley et al .2017). À l'aide du programme AutodockTools 1.5.6. Toutes les structures cristallines ont été générées en supprimant les ligands et les molécules d'eau existants et en ajoutant des atomes d'hydrogène manquants (**Scripps Research Institut, La Jolla, CA**). Finalement on récupère la structure protéique préparé pour le docking moléculaire. Seule la chaîne A est retenue. Cette structure est complexée avec un ligand le cadmium (Cd^{+2}).

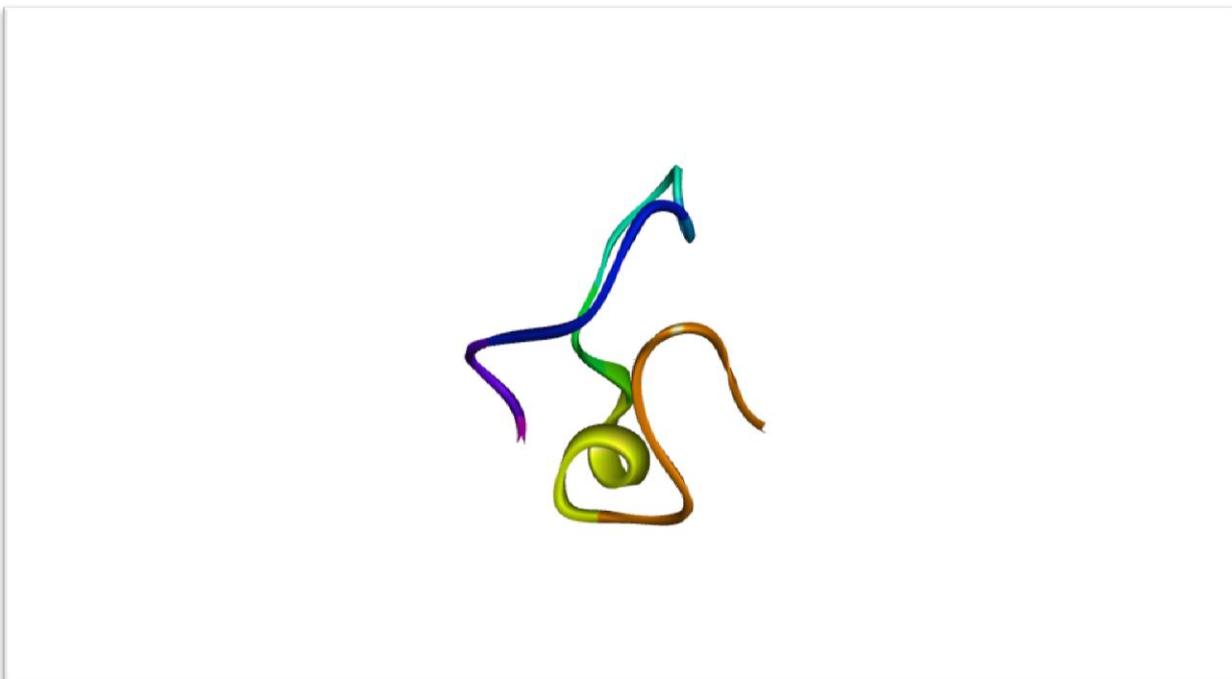


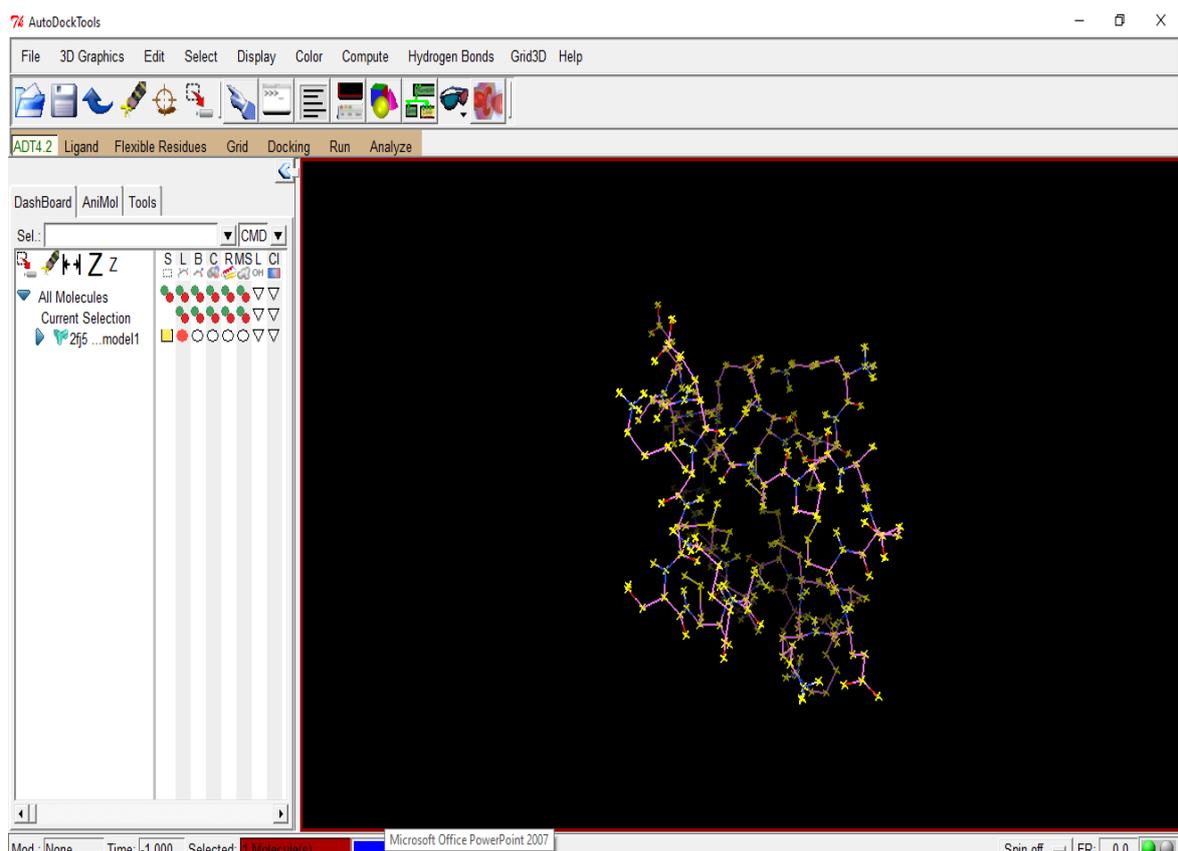
Figure 11: Chaîne A de la Metallothionein-3 (PDB ID : **2FJ5**).

Tableau 3. Caractéristiques du Métallothionéines-3 (PDB ID : 2FJ5).

Molécule	Chaîne	la longueur de Séquence	Organisme	Détails	Code PDB
Métallothionéine-3	A	37	<u>Homo sapiens</u>	Mutation(s): 0 Gene Names: <u>MT3</u>	2FJ5

Tableau 4. Le ligand naturel de la Métallothionéines-3 (PDB ID : 2FJ5).

Ligand	Chaîne	Nom / Formule	Diagramme 2D
CD	B-C-D-E	CADMIUM ION Cd	CD+2

**Figure 12:** structures de Métallothionéine-3 préparées par l'utilisation d'un programme Auto Dock Tools-1.5.6.

4. Préparation des ligands

La procédure de préparation du ligand comprenait plusieurs phases des conversions, des corrections, des variations structurelles, d'élimination et d'optimisation.

Les structures des ligands ont été dessinées à l'aide de logiciel ChemSketch, puis convertie en format 3D Mol par le logiciel Chem3D Ultra8.0 (Mendelsohn, 2004). Puis on réalise la conversion des structures format PDB à partir du format 3D Mol en utilisant le logiciel Auto Dock Tools-1.5.6.

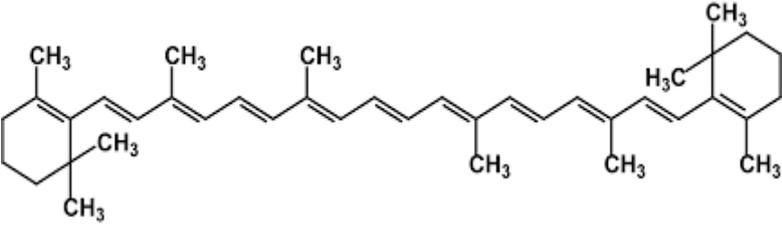
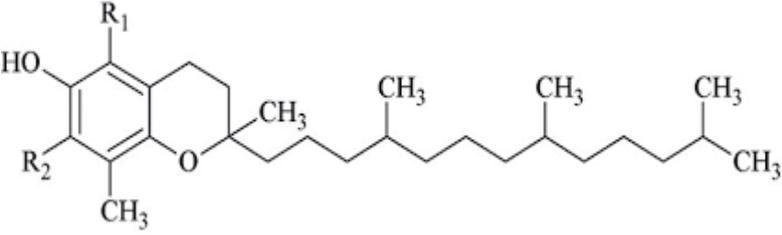
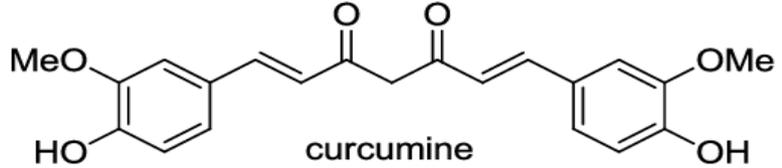
Les étapes suivantes ont été effectuées lors de la préparation de ligand :

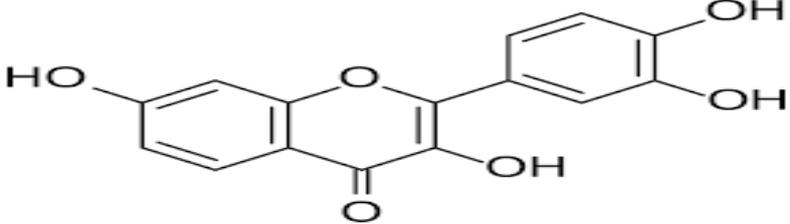
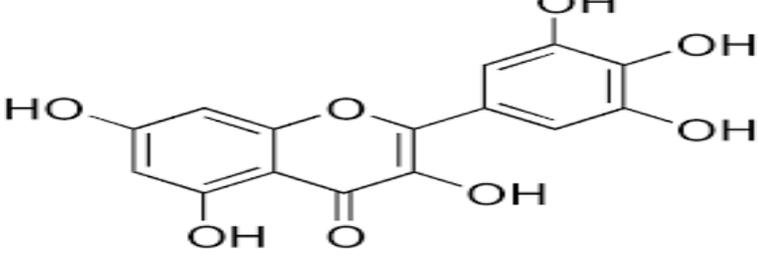
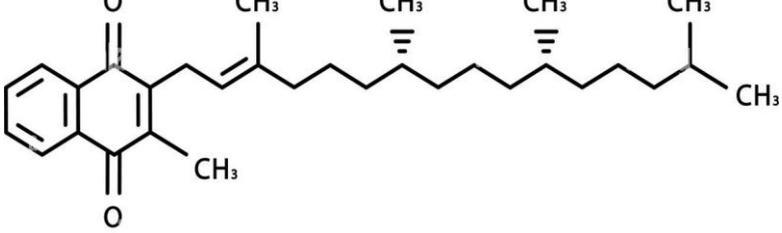
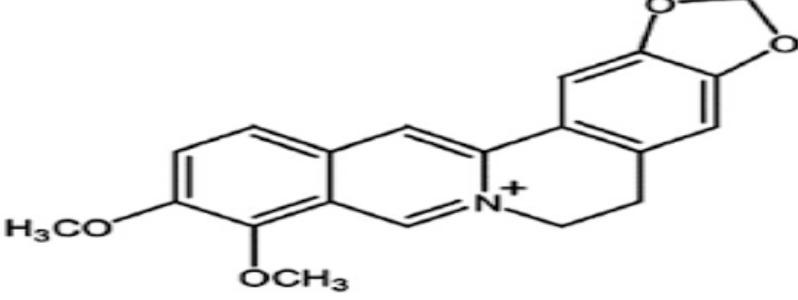
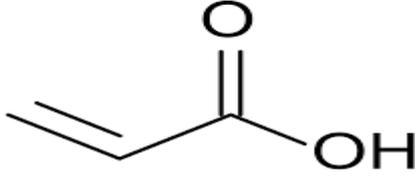
- l'ajout d'atomes d'hydrogène, l'élimination des hétéroatomes, la neutralisation des groupes chargés, la génération d'états d'ionisation et de tautomères, la filtration, les chiralités alternatives, l'optimisation des géométries et les conformateurs d'anneaux à basse énergie (Usha et al. 2013).

- Les structures des ligands format PDB ont suite été converties a un format dockable (PDBQT) en utilisant l'outil AutoDockTools-1.5.6 (Suri et Naik, 2012).

Les études d'amarrage moléculaire permettent de filtrer et de cribler implicitement une base de données de composées chimiques et de prédire les liants les plus forts en fonction d'un score.

Tableau 5 : Les structures des ligands utilisés pour l'amarrage moléculaire dans notre étude

N°	Nom	Structure
1.	β -carotène	
2.	α -tocophérol Vitamin E	
3.	Curcumine	

4.	Fiséatine	
5.	Myricétine	
6.	Vitamine K	
7.	Berbérine	
8.	Sulfure de diallyle	
9.	Huile de Selinum vaginatum 2-Propenoic acid (20.12%)	

5. L'amarrage moléculaire

L'amarrage moléculaire est le processus d'assemblage de deux molécules dans un espace tridimensionnel; c'est un outil important en biologie structural et en conception de médicaments assistée par ordinateur (Palleti et coll., 2011; Ladokun et coll., 2018).

Un dock standard stable a été utilisé comme option par défaut afin d'obtenir un dock précis. Les meilleurs ligands de posture ont été sélectionnés pour leur plus faible énergie libre de conformation de liaison (Kandeel et Kitade, 2013).

AutoDockVina dans a été utilisé pour filtrer les surfaces de liaison du MT 3 et déterminer les affinités de liaison des ligands à la protéine (Trott et Olson, 2010).

Discovery Studio Visualizer été utilisé pour visualiser les interactions moléculaires.

6. Grid Box du MT3

Afin d'effectuer une recherche conformationnelle du ligand au sein du site actif d'une structure protéique, les codes de docking moléculaires doivent définir cet espace. C'est ce qu'on appelle le GRID BOX.

A partir du ligand de référence, cette boite est définie avec un volume de 14 Å où le centre est déterminé par les coordonnées X =60, Y = 60 et Z =60. La boîte est centrée sur le ligand de référence.

Ces informations sont ainsi sauvegardées dans un fichier texte qui est nécessaire et obligatoire pour effectuer le calcul de docking.

La figure13 suivante montre bien la boite où s'effectue l'amarrage (docking) moléculaire.

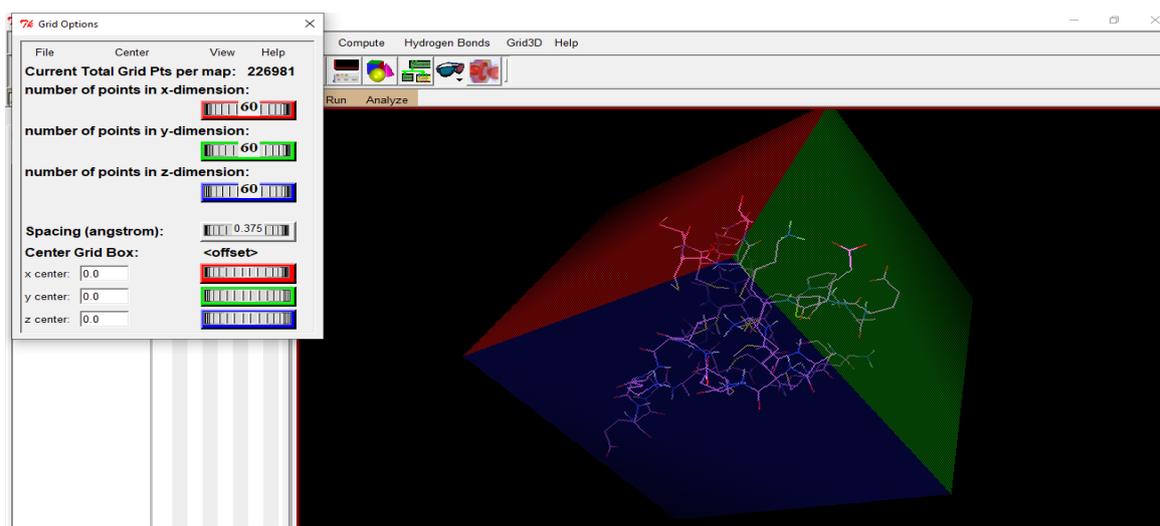


Figure 13 : Positionnement de la Grid Box dans le site actif du Métallothioneine-3.

L'étape suivante c'est l'exécution des instructions pour calculer l'affinité entre les différents types d'atomes de la protéine et les ligands.

```
#####  
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #  
# #  
# O. Trott, A. J. Olson, #  
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #  
# with a new scoring function, efficient optimization and #  
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #  
# 455-461 #  
# #  
# DOI 10.1002/jcc.21334 #  
# #  
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #  
#####  
  
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)  
Output will be Ligand Prepared_out.pdbqt  
Detected 2 CPUs  
Reading input ... done.  
Setting up the scoring function ... done.  
Analyzing the binding site ... done.  
Using random seed: 2013  
Performing search ... done.  
Refining results ... done.  
  
mode | affinity | dist from best mode  
| (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.  
-----+-----+-----+-----  
1 | -6.6 | 0.000 | 0.000  
2 | -6.6 | 1.427 | 2.157  
3 | -6.4 | 1.689 | 2.317  
4 | -5.6 | 12.733 | 14.519  
5 | -5.6 | 16.751 | 21.017  
6 | -5.4 | 17.808 | 21.732  
7 | -5.4 | 16.366 | 22.155  
8 | -5.2 | 15.667 | 19.982  
9 | -5.2 | 19.095 | 22.586
```

Figure 14 : l'exécution des calculs de docking moléculaire

Dans la dernière étape, nous visualisons les interactions moléculaires par Discovery Studio Visualizer.

Résultats

Et

Discussion

Analyse de docking moléculaire

Dans ce travail nous avons fait le docking de 9 molécules naturelles issues de plantes médicinales avec le récepteur métallothionéine 3 (MT3) humain, ou leurs énergies de liaison ont été calculées.

Lorsque l'énergie de liaison étant la plus faible l'affinité du ligand pour cette cible étant plus élevée. Le tableau ci-dessous résume les valeurs des énergies des molécules par l'AutoDock Vina : Le docking moléculaire de chacun de ces produits naturels avec la Métallothionéine 3 nous a donné des valeurs de ΔG entre **-7.6** et **-2.2** (kcal/mol) qui sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : affinité de liaison des composés anti-Alzheimer avec le récepteur MT3 (2FJ5)

N	Nom	Affinité ΔG (kcal/mole)
1	β -carotène	-7.6
2	Fisétine	-6.1
3	Berbérine	-5.6
4	Myricétine	-5.5
5	Curcumine	-5.4
6	Vitamine K	-4.8
7	α -tocophérol Vitamine E	-3.7
8	2-Propenoic acid	-2.7
9	Sulfure de diallyle	-2.2

Parmi les 09 produits naturels proposés, le β -carotène a présenté le meilleur score avec une affinité $\Delta G = -7.6$ kcal/mol.

1. β -carotène

L'analyse visuelle de son mode de liaison au sein du site actif de la métallothionéine 3 montre que la **β -carotène** forme trois liaisons de types alkyl hydrophobique, dont les deux premières entre le ligand et le résidu proline 39 avec des distances de 4.99Å et 4.02Å respectivement, et la troisième liaison avec la cystéine 42 avec une distance de 4.54Å (voir Figure 15).

Tableau 7 : Les caractéristiques de complexe MT₃ _ β-carotène et le nombre de liaisons formé.

Résidu	Distance	catégorie	Type
PRO39	4.9922	Hydrophobe	Alkyl
PRO39	4.02776	Hydrophobe	Alkyl
CYS42	4.54558	Hydrophobe	Alkyl

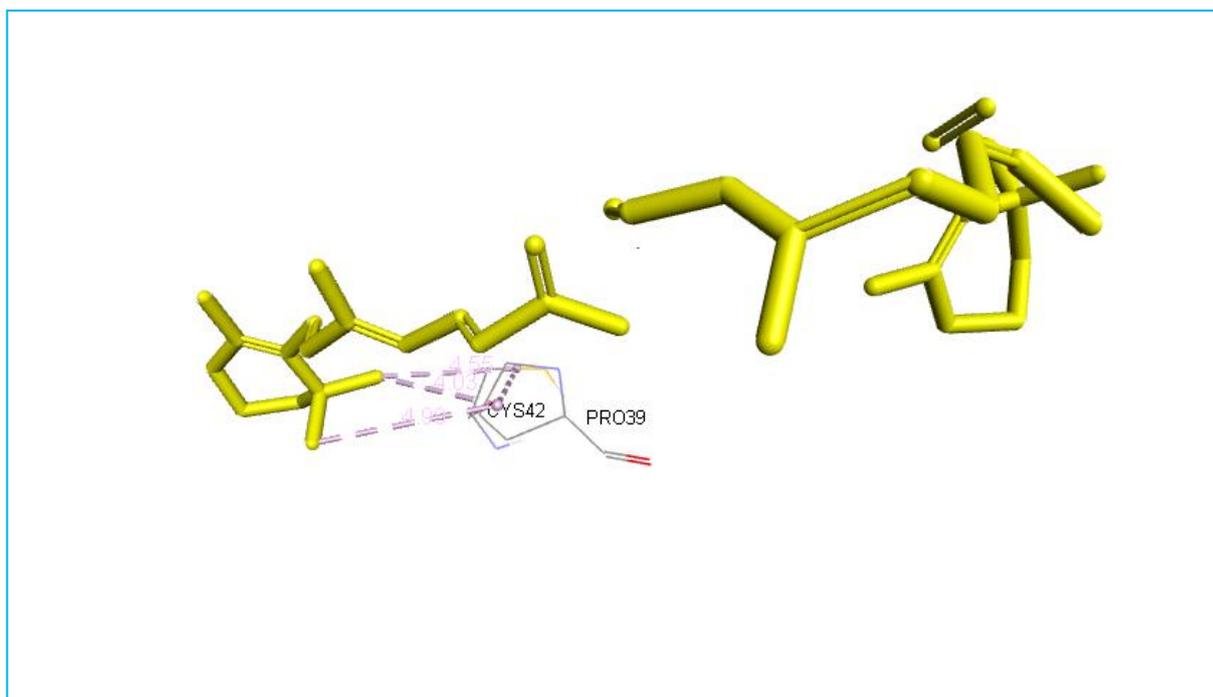


Figure 15 : les liaisons alkyl hydrophobique la β-carotène au sien du site actif de la Métallothionéine 3 : la β-carotène (jaune) établit trois liaisons alkyl hydrophobique (rose).

2. Fisétine

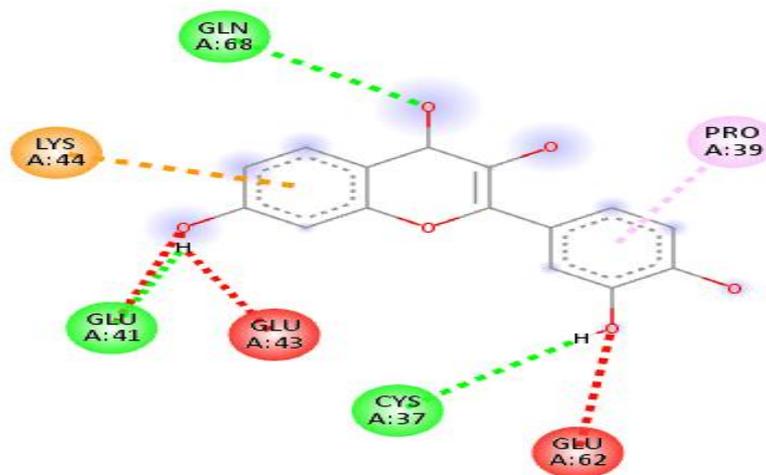
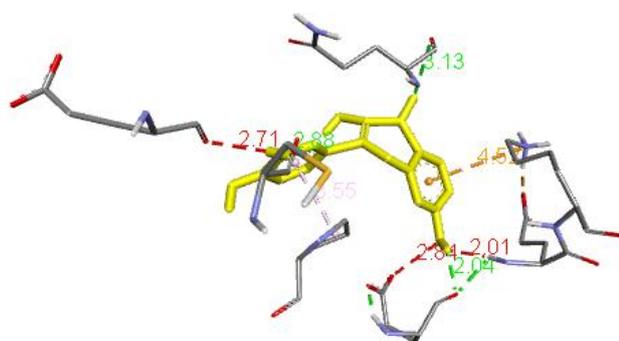
Le Fisétine a un score de $\Delta G = -6.1\text{kcal/mol}$.

L'analyse visuelle de son mode de liaison au sein du site actif de la métallothionéine 3 montre que la fisétine forme trois liaisons hydrogène dont le premières entre le ligand et le résidu glutamine 68 avec une distance de 3.13 Å, la deuxième liaison avec l'acide glutamique 41 avec une distance de 2,04 Å et la troisième liaison avec la cystéine 37 avec une distance de 2,88 Å.

La Fisétine forme une liaison de type Pi-Cation électrostatique avec le résidu lysine 44 avec une distance de 4,52Å et une liaison de type Pi-Alkyl hydrophobique par un résidu proline39 avec une distance de 3,54Å.

Tableau 8 : Les caractéristiques de complexe MT₃ _ Fisétine et le nombre de liaisons formé.

Résidu	Distance	catégorie	Type
GLN68	3.13375	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène conventionnelle
GLU41	2.04388	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène conventionnelle
CYS37	2.88159	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène conventionnelle
LYS44	4.52468	Électrostatique	Pi-Cation
PRO39	3.54608	Hydrophobe	Pi-Alkyl



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Unfavorable Donor-Donor
- Unfavorable Acceptor-Acceptor
- Pi-Cation
- Pi-Alkyl

Figure 16 : Les interactions entre le site actif de la Métallothionéine 3 et le Fisétine.

3. Berbérine

Le Berbérine a un score $\Delta G = -5.6$ kcal/mol.

Avec le logiciel Discovery Studio la figure montre que le Berbérine pénètre bien dans le site actif de la protéine cible MT3 formant différentes interactions classées comme suit :

1- Liaisons Hydrogènes : Concernant ces interactions qui jouent le rôle le plus important en biologie et le domaine du vivant, elles sont classées comme suit : trois liaisons Hydrogènes dont la première entre le ligand et le résidu acide glutamique 43 avec une distance de 2.86 Å et une deuxième liaison de type carbone hydrogène, formée avec le résidu cystéine42 (distance 3.55Å).

2- Liaisons Hydrophobique : deux liaisons de type Alkyl Hydrophobique sont formées avec un résidu proline 39 avec une distance de 4,21 Å et le résidu proline 39 avec une distance de 4,60 Å.

Deux autres liaisons type pi-Alkyl Hydrophobique lient les résidus lysine 63 et glycine 41 avec une distance 5,37Å et 3, 87Å respectivement.

3- Liaisons électrostatique : une liaison type pi-Anion lie le résidu acide glutamique 41 avec une distance de 4.89 Å.

Tableau 9 : Les caractéristiques de complexe MT₃ _ Berbérine et le nombre de liaisons formé.

Résidu	Distance	catégorie	Type
GLU43	2.86743	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène conventionnelle
CYS42	3.55503	Liaison hydrogène	Liaison Carbone Hydrogène
GLU41	4.89805	Électrostatique	Pi-Anion
A:PRO39	4.21737	Hydrophobe	Alkyl
PRO39	4.60189	Hydrophobe	Alkyl
Lys 63	5.37087	Hydrophobe	Pi-Alkyl
GLY 41	3.87118	Hydrophobe	Pi-Alkyl

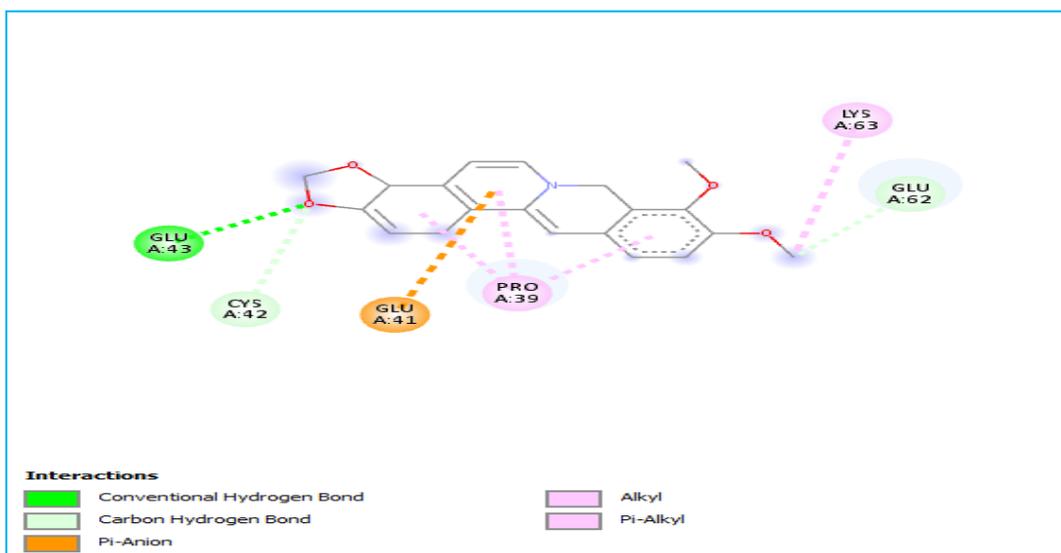
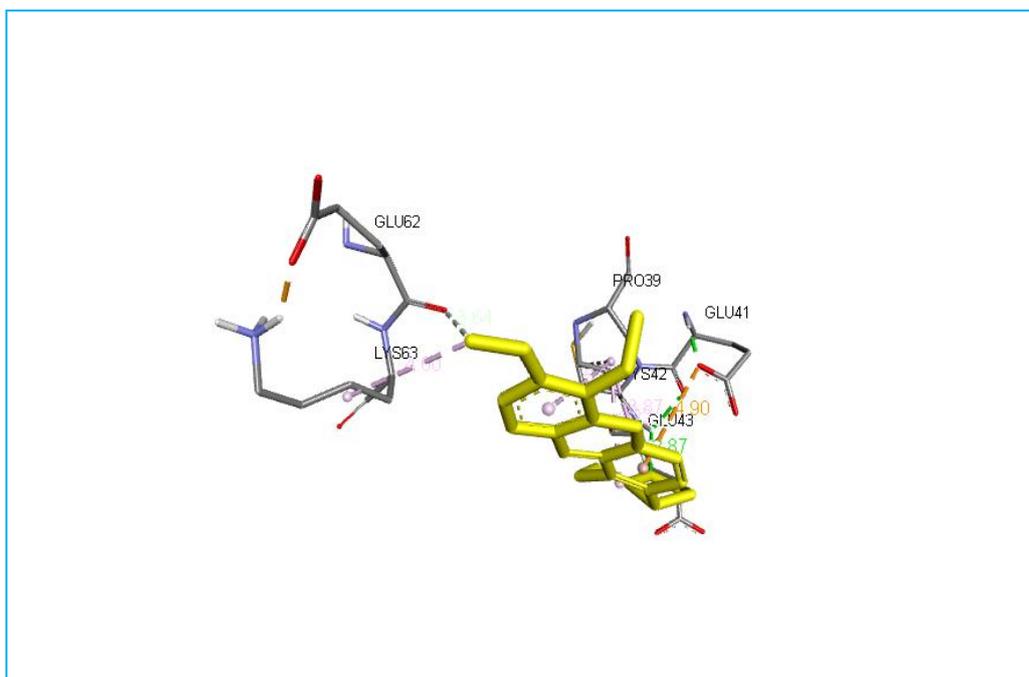


Figure 17 : Les interactions entre le site actif de la Métallothionéine 3 et le Berbérine.

4. Myricétine

Le Myricétine un score $\Delta G = -5.5\text{kcal/mol}$.

On observe qu'il y a 3 interactions Hydrogènes avec les résidus SER36, GLU62 et PRO39. Les interactions observées sont à des distances entre 2Å et 1 Å.

Le résidu PRO39 est lié avec le ligand par deux types de liaisons Hydrophobes : 1type pi-Sigma formée à une distance de 2,77Å, la deuxième est de type pi-Alkyl à une distance 3,71Å.

Tableau 10 : Les caractéristiques de complexe MT₃ _ Myricétine et le nombre de liaisons formé.

Résidu	Distance	catégorie	Type
A:SER36	2.58816	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène conventionnelle
A:GLU62	2.18106	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène conventionnelle
A:PRO39	2.77653	Liaison hydrogène	Liaison hydrogène conventionnelle
A:PRO39	3.71432	Hydrophobe	Pi-Sigma
PRO39	4.69229	Hydrophobe	Pi-Alkyl

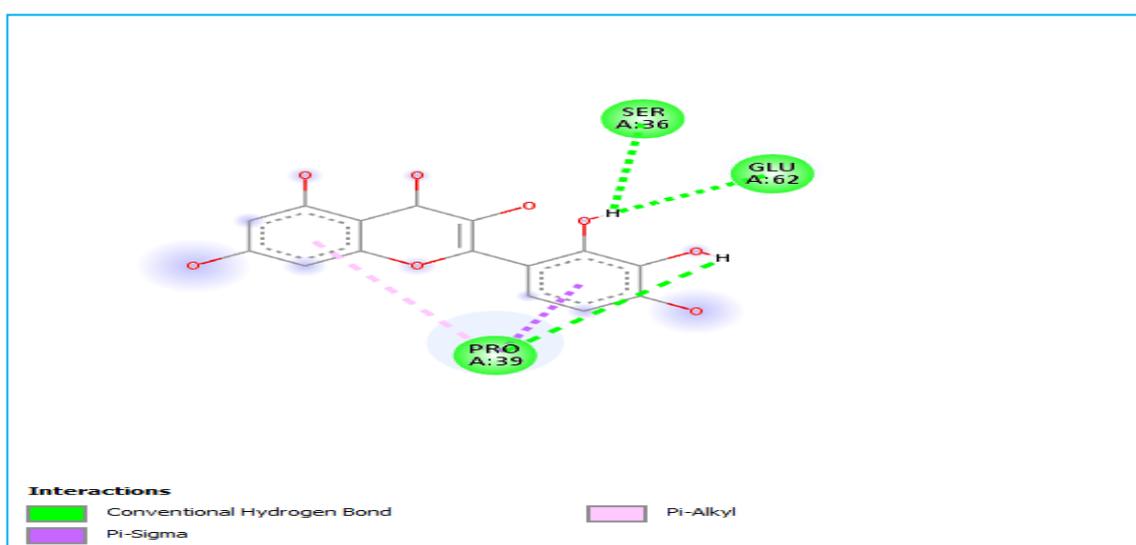
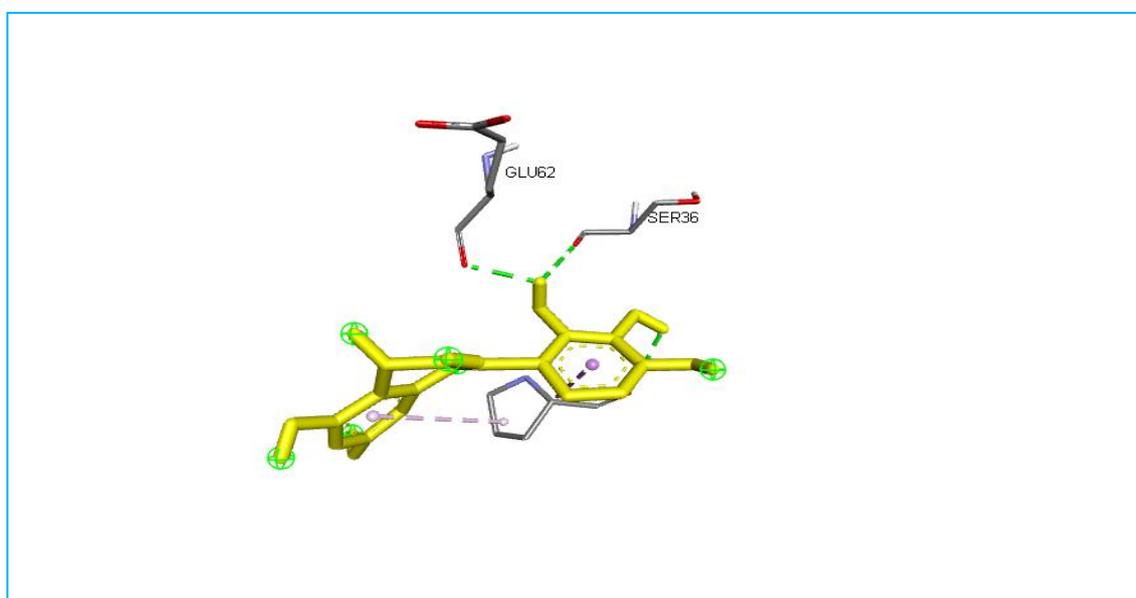


Figure 18 :Les interactions entre le site actif de la Métallothionéine 3 et le Myricétine

5. Curcumine

Le Curcumine a un score $\Delta G = -5.4 \text{ kcal/mol}$. On observe entre le curcumine et la MT3 les liaisons suivantes :

1- des liaisons Hydrogènes : trois liaisons Hydrogène sont formées avec les résidus :

-GLU43 avec une distance de 2.72A

-CYS42 avec une distance de 3.48 A

-GLU62avec une distance de3.58 A

2- Trois liaison Hydrophobes lient le résidu PRO39 avec les trois distances: 3.97, 4.40 et 5.03 respectivement. (Voire Figure 19)

Tableau 11 : Les caractéristiques de complexe MT₃ _ Curcumine et le nombre de liaisons formé.

Résidu	Distance	catégorie	Type
A:GLU43	2.72979	hydrogène	Liaison hydrogène
A:CYS42	3.4835	hydrogène	Liaison hydrogène
A:GLU62:	3.58979	hydrogène	Liaison hydrogène
A:PRO39	3.9705	Hydrophobe	Hydrophobe
A:PRO39	4.40633	Hydrophobe	Hydrophobe
A:PRO39	5.03821	Hydrophobe	Hydrophobe

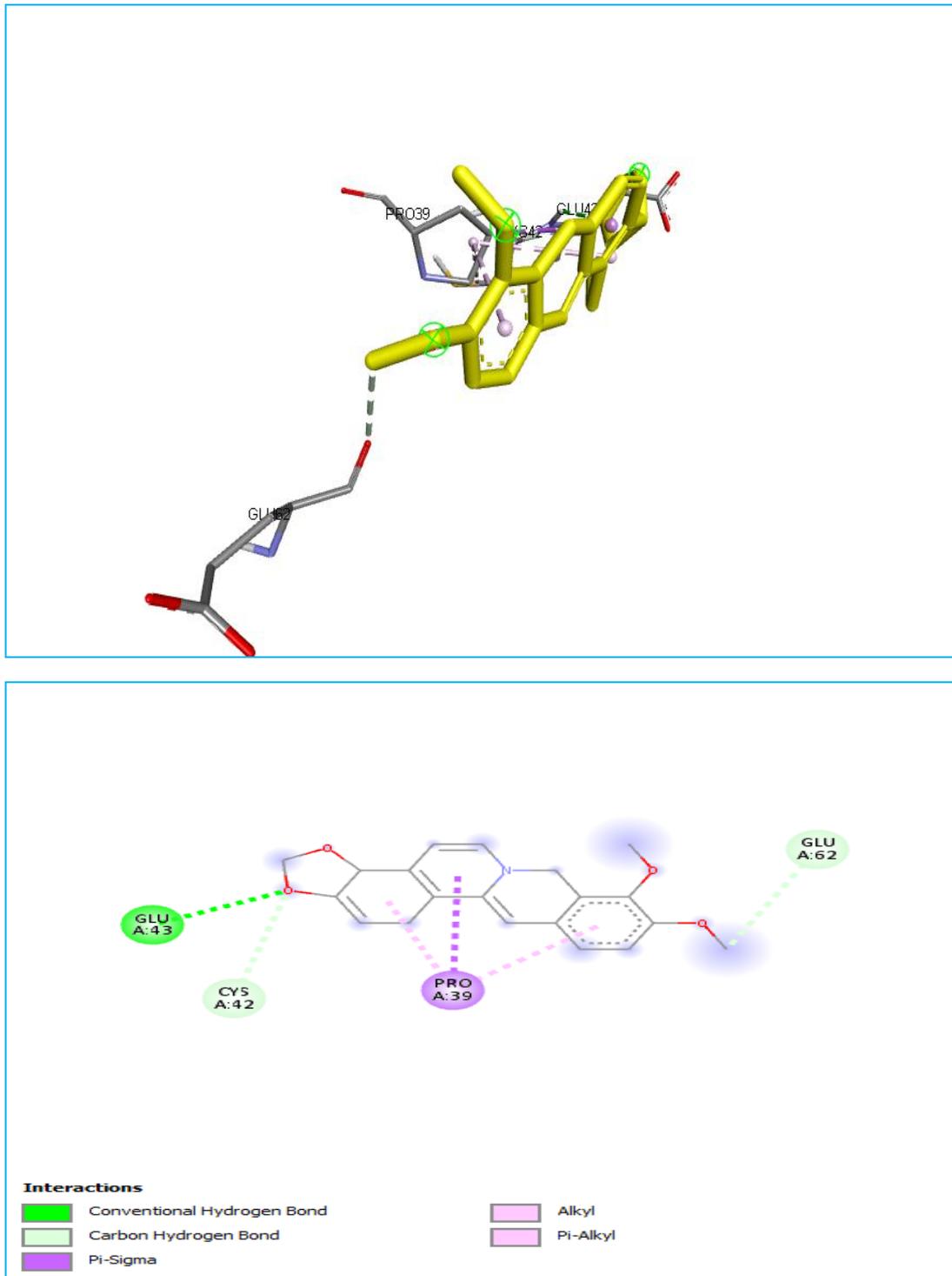


Figure 19 : Les interactions entre le site actif de la Métallothionéine 3 et le Curcumine

Conclusion

Et

Perspectives

L'exploration des composés naturels dans le domaine pharmaceutique en utilisant des méthodes de criblage virtuel (l'amarrage moléculaire) réduit les coûts et le temps dans la découverte de médicaments.

Dans notre étude, on a visé l'approche de la conception des médicaments assistée par ordinateur connue sous le nom « docking moléculaire in silico », afin de prédire les chélateurs naturels du mercure inespéré des métallothionéine, parmi les cibles impliquée dans la maladie d'Alzheimer.

A partir des résultats obtenus, on a conclu que le β -carotène présentent la meilleure affinité vis a vis de la protéine métallothionéine 3 (2FJ5) avec une énergie de liaison = [-7.6kcal/mol].

Ces simulations montrent bien que la plupart des interactions trouvées entre la cible et ce ligand sont de type liaisons hydrogène qui présentent les interactions les plus importantes dans les processus biologiques et des interactions hydrophobiques stabilisantes qui sont aussi d'une grande importance.

Ce composé criblé pourraient être une excellente source pour le développement de nouveaux médicaments contre l'agrégation induite par le mercure au niveau du cerveau et la MA, et peuvent être encore modifiés et optimisés pour présenter de meilleurs médicaments contre ces maladies.

Le composé issus de ce travail peuvent aussi être testé, et compléter leurs parcours par une étude expérimentale in vitro et/ou in vivo afin de valider nos résultats théoriques et vérifier l'efficacité de l'approche in silico.

En termes de perspectives il est important de cribler ce ligand sur la base des propriétés pharmacocinétiques car il réduira l'échec de la plupart des médicaments au stade clinique. Il est indispensable de compléter notre travail par la prédiction des propriétés pharmacocinétiques ADME et de la toxicité de ces molécules (inhibiteurs) in silico pour sélectionner le meilleur candidat et cela par l'application de la règle de Lipinski et celle du Veber, et par une étude comparative des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (la toxicité) des inhibiteurs résultants. Les diverses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des composés (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) peuvent être étudiées à l'aide du filtrage ADMET in silico.

Résumé

La métallothionéine 3 (MT3) présente une activité neuro-inhibitrice et est impliquée dans la réparation des dommages neuronaux. Un taux d'expression réduit de la MT3 suggère qu'il pourrait être un facteur important dans le dysfonctionnement neuronal de la maladie d'Alzheimer (MA). L'affinité du Hg pour les groupes thiol de la métallothionéine 3 est cruciale dans la neurotoxicité induit par le mercure (Hg) et peut également provoquer l'agrégation de l'A β ₄₂, principale protéine de la MA.

Actuellement, il existe un nombre limité de médicaments commercialisés qui régule l'expression de la MT3.

Dans notre étude, des composés naturels connus pour leur effet contre l'intoxication par le mercure ont été sélectionnés pour étudier leur affinité avec la MT3. L'amarrage moléculaire et les simulations des molécules les plus performantes ont été réalisés pour étudier la stabilité des complexes.

L'étude révèle le β -carotène comme une molécule la plus puissante qui interagissent et forment des liaisons hydrogène avec les acides aminés Pro39 et Cys42 de notre cible la métallothionéine 3.

En termes de perspectives il est important de cribler ce ligands sur la base des propriétés pharmacocinétiques car il réduira l'échec de la plupart des médicaments au stade clinique. Il est indispensable de compléter notre travail par la prédiction des propriétés pharmacocinétiques ADME et de la toxicité de ces molécules (inhibiteurs) *in silico* pour sélectionner le meilleur candidat.

Mots clés : la maladie d'Alzheimer (MA), La métallothionéine 3 (MT3), le mercure (Hg), plantes médicinales, composés naturels et l'amarrage moléculaire.

Abstract

Metallothionein 3 (MT3) displays neuro-inhibitory activity and is involved in the repair of neuronal damage. An altered expression level of MT3 suggests that it could be a mitigating factor in Alzheimer's disease (AD) neuronal dysfunction. Currently there are limited marketed drugs available against MT3.

The affinity of Hg for thiol groups of Metallothionein 3 is crucial in the neurotoxicity of Hg may also caused the aggregation of A β ₄₂ the main protein of AD.

In our present study, natural compounds, known for their effect against mercury poisoning were screened out for MT3. Molecular docking and simulations of top hit molecules were performed to study complex stability.

Study reveals β -carotene is the potent selective molecule that interacts and forms hydrogen bonds with amino acids proline 39 and cysteine 42 of our target MT3.

In terms of prospects it is important to screen these ligands on the basis of pharmacokinetic properties as it will reduce the failure of most drugs at the clinical stage.

It is essential to complete our work by predicting the ADME pharmacokinetic properties and the toxicity of these molecules in silico to select the best candidate.

Key words: Alzheimer's disease AD, Metallothionein 3 (MT3), mercury (Hg), medicinal plants, natural's compounds and molecular docking.

ملخص

يعتبر (Metallothionein 3 MT3) بروتينا يلعب دور في إيقاف نمو الخلايا العصبية ويشارك في إصلاح تلف الخلايا العصبية. ان انخفاض نسبة MT3 في الدماغ قد يكون عاملاً مهماً في الخلل الوظيفي العصبي و قد يؤدي إلى الإصابة بمرض الزهايمر (AD) . إن تفاعل شوارد الزئبق (Hg) مع مجموعات thiol لل metallothionein 3 له أهمية بالغة في السمية العصبية التي يسببها الزئبق (Hg) ويمكن له أن يسبب أيضاً تراكم A β 42 ، وهو البروتين الرئيسي المسبب لمرض الزهايمر (AD) . يوجد حالياً عدد محدود من الأدوية المسوقة التي تنظم مستوى MT3 في الجسم .

في دراستنا ، تم اختيار المركبات الطبيعية المعروفة بتأثيرها ضد التسمم بالزئبق لدراسة تقاربها مع MT3. تم إجراء عمليات الالتحام الجزيئي والمحاكاة لأفضل الجزيئات أداءً و لدراسة استقرار المجمعات.

كشفت الدراسة أن β -carotene يعتبر الجزيء الأكثر تفاعلاً مع MT3 حيث يشكل روابط هيدروجينية مع الأحماض الأمينية التالية : Pro39 و Cys42 .

من حيث التوقعات ، من المهم فحص هذه الروابط على أساس الخصائص الحركية الدوائية لأنها ستقلل من فشل معظم الأدوية في المرحلة السريرية و من الضروري إكمال عملنا من خلال التنبؤ بخصائص الحركة الدوائية لـ ADME وسمية هذه الجزيئات *in silico* لاختيار أفضل مرشح.

الكلمات المفتاحية: مرض الزهايمر (AD) ، الميتالوثيونين 3 (MT3) ، الزئبق (Hg) ، النباتات الطبية ، المركبات الطبيعية و الالتحام الجزيئي.

Références Bibliographiques

1. **Agarwal R, Goel SK, Behari JR. (2010b)** Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *J Appl Toxicol* **30**: 457–68.
2. **Agarwal R, Goel SK, Chandra R, Behari JR. (2010a)** Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. *Environ Toxicol Pharmacol* **29**: 70–78.
3. **Aguzzi A, Heikenwalder M. (2006)** Pathogenesis of prion diseases: Current status and future outlook. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 765–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. **Allen JW, Mutkus LA, Aschner M. (2001)** Mercuric chloride, but not methylmercury, inhibits glutamine synthetase activity in primary cultures of cortical astrocytes. *Brain Res.* Feb 9;891(1-2):148-57.
5. **Andersen HR, Andersen O. (1993)** Effects of dietary alpha-tocopherol and beta-carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacol Toxicol* **73**: 192–201
6. **Andersen O. (2004)** Chemical and biological considerations in the treatment of metal intoxications by chelating agents. *Mini Rev Med Chem.* **4**:11–21. [[PubMed](#): 14754439]
7. **Andreasson U, Portelius E, Andersson ME, Blennow K, Zetterberg H. (2007)** Aspects of β -amyloid as a biomarker for Alzheimer's disease. *Biomark. Med.* **1**, 59–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. **Ansar S. (2015)** Pretreatment with diallylsulphide modulates mercury-induced neurotoxicity in male rats. *Acta Biochimica Polonica* **62**: 599–603
9. **Aposhian HV. (1983)** DMSA and DMPS – Water Soluble Antidotes for Heavy Metal Poisoning. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 193-215.
10. **Arnhold F, Guhrs K H, von Mikecz A. (2015)** Amyloid domains in the cell nucleus controlled by nucleoskeletal protein lamin B1 reveal a new pathway of mercury neurotoxicity. *PeerJ*, **3** e754. [[CrossRef](#)]
11. **Arrault A. (2007)** Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat d'université : Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. Orléans : Université d'Orléans. France. 176p.
12. **Atrian S, Capdevila M. (2013)** Metallothionein-protein interactions. *Biomol. Concepts*, **4**, 143–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. **Atwood CS, Huang X, Moir RD, Tanzi RE, and Bush AI. (1999)** Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Met. Ions Biol. Syst.* **36**: 309-364.
14. **Ayyathan DM, Chandrasekaran R, Thiagarajan K. (2015)** Neuroprotective effect of Brahmi, an ayurvedic drug against oxidative stress induced by methyl mercury toxicity in rat brain mitochondrial-enriched fractions. *Nat Prod Res* **29**: 1046–1051.
15. **Barritt JD, Viles JH. (2015)** Truncated Amyloid- β (11–40/42) from Alzheimer Disease Binds Cu^{2+} with a Femtomolar Affinity and Influences Fiber Assembly. *J. Biol. Chem.* **290**, 27791–27802. [[Pub Med](#)]
16. **Bellé LP, De Bona KS, Abdalla FH, Pimentel VC, Pigatto AS, Moretto MB. (2009)** Comparative evaluation of adenosine deaminase activity in cerebral cortex and hippocampus of young and adult rats: effect of garlic extract (*Allium sativum* L.) on their susceptibility to heavy metal exposure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **104**: 408–413.
17. **Bensegueni A. (2007)** Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Thèse de doctorat d'université :Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri de Constantine. Algérie.76p.
18. **Björkman L, Lundekvam BF, Lægreid T, Bertelsen BI, Morild I, Lilleng P et al. (2007)** Mercury in human brain, blood, muscle and toenails in relation to exposure: an autopsy study. *Environ Health.* Oct 11;6:30.

19. **Bogumil R, Faller P, Binz PA, Vašák M, Charnock JM, Garner CD. (1998)** Structural characterization of Cu(I) and Zn(II) sites in neuronal-growth-inhibitory factor by extended X-ray absorption fine structure (EXAFS). *Eur. J. Biochem.* 255, 172–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. **Bogumil R, Faller P, Pountney DL, Vašák M. (1996)** Evidence for Cu(I) clusters and Zn(II) clusters in neuronal growth-inhibitory factor isolated from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 238, 698–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. **Bruinink A, Faller P, Sidler C, Bogumil R, Vašák M. (1998)** Growth inhibitory factor and zinc affect neural cell cultures in a tissue specific manner. *Chem. Biol. Interact.* 115, 167–174. [[CrossRef](#)]
22. **Bush AI. (2002)** Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **23**: 1031-1038.
23. **Butler M S. 2004** The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.*
24. **Calvo J, Jung H, Meloni G. (2017)** Copper metallothioneins. *IUBMB Life* 69, 236–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. **Carrasco J, Adlard P, Cotman C, Quintana A, Penkowa M, Xu F et al. (2006)** Metallothionein-I and -III expression in animal models of Alzheimer disease. *Neuroscience*. Dec 28;143(4):911-22.
26. **Carter JP. (1989)** If chelation therapy is so good, why is it not more widely accepted? *J Advancement Med.* 21:213–226.
27. **Carvalho MC, Franco JL, Ghizoni H, Kobus K, Nazari EM, Rocha JB, Nogueira CW, Dafre AL, Muller YM, Farina M. (2007)** Effects of 2, 3-dimercapto-1- propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. *Toxicology* 239, 195–203.
28. **Cedrola S, Guzzi G, Ferrari D, Gritti A, Vescovi AL, Pendergrass JC et al. (2003)** Inorganic mercury changes the fate of murine CNS stem cells. *FASEB J.* May;17(8):869-71.
29. **Chevrollier N. (2019)** Développement et application d'une approche de docking par fragments pour modéliser les interactions entre protéines et ARN simple-brin. Phdthesis, Université Paris-Saclay [En ligne];. [Consulté le 1 mars 2021]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02436914>
30. **Clarkson Thomas W Ph D, Laszlo Magos MD, and Gary J, Myers MD. (2003)** The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *N Engl J Med.* 349:1731-7.
31. **Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. (2002)** Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 627–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. **Cuajungco MP, Frederickson CJ, and Bush AI. (2005)** Amyloid-β metal interaction and metal chelation. *Sub-Cellular Biochem.* **38**: 235-254
33. **David S, Shoemaker M, Haley BE. (1998)** Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Brain Res Mol Brain Res.* Mar 1; 54(2):276-87.
34. **Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D. (2007)** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Paris: Editions Tec & Doc Lavoisier.
35. **Domingo JL. (1995)** Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. *Reprod Toxicol.* 9:105–113. [[PubMed: 7795320](#)]
36. **Drew SC, Leong SL, Pham CL, Tew DJ, Masters CL, Miles LA, Cappai R, Barnham KJ. (2008)** Cu²⁺ binding modes of recombinant α -synuclein—insights from EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 7766–7773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. **Dudev T, Lim C. (2008)** Metal binding affinity and selectivity in metalloproteins: Insights from computational studies. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 97–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. **Duhr EF, Pendergrass JC, Slevin JT, Haley BE. (1993)** HgEDTA complex inhibits GTP interactions with the E-site of brain beta-tubulin. *Toxicol Appl Pharmacol.* Oct;122(2):273-80.
39. **Duncan KE, Ngu TT, Chan J, Salgado MT, Merrifield ME, Stillman MJ. (2006)** Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. *Exp. Biol. Med.* 231, 1488–1499. [[CrossRef](#)]
40. **Duncan KE, Ngu TT, Chan J, Salgado MT, Merrifield ME, Stillman MJ. (2006)** Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. *Exp. Biol. Med.* 231, 1488–1499. [[CrossRef](#)]
41. **Echeverria D, Woods JS, Heyer NJ, Rohlman DS, Farin FM, Bittner AC Jr et al. (2005)** Chronic low-level mercury exposure, BDNF polymorphism, and associations with cognitive and motor function. *Neurotoxicol Teratol.* Nov-Dec;27(6):781-96.
42. **Faller P. (2010)** Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): Reactivity and structure of metal-thiolate clusters. *FEBS J.* 277, 2921–2930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. **Faller P, Hureau C, La Penna G. (2014)** Metal ions and intrinsically disordered proteins and peptides: From Cu/Zn amyloid- β to general principles. *Acc. Chem. Res.* 47, 2252–2259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. **Fortuné A. (2006)** Techniques de Modélisation Moléculaire Appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance. Thèse de doctorat d'université : Sciences du médicament. Grenoble : Université Joseph Fourier - Grenoble I. France.168p
45. **Foster AW, Osman D, Robinson NJ. (2014)** Metal preferences and metallation. *J. Biol. Chem.* 289, 28095–28103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. **Franco JL, Posser T, Missau F, Pizzolatti MG, Dos Santos AR, Souza DO, Aschner M, Rocha JB, Dafre AL, Farina M. (2010)** Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol* **30**: 272–278.
47. **Gaba M, Punam G, Sarbjot S. (2010)** An overview on Molecular Docking. *Int. J. Drug Dev. Res.* Fév 2010.vol. 2, p. 219- 231 .
48. **García-Niño WR, Pedraza-Chaverri J. (2014)** Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem Toxicol* **69**: 182- 201.
49. **Godfrey ME, Wojcik DP, Krone CA. (2003)** Apolipoprotein E genotyping as a potential biomarker for mercury neurotoxicity. *J Alzheimers Dis.* Jun;5(3):189-95
50. **Goumakos w, Laussac J-P, Sarkar B, Biochem. (1991)** *Cell Biol.* 69 809–820.
51. **Gunn AP, Masters CL, Cherny RA. (2010)** Pyroglutamate-A β : Role in the natural history of Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1915–1918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. **Guzzi G, Grandi M, Cattaneo C, Calza S. (2006)** Dental amalgam and mercury levels in autopsy tissues: food for thought. *Am J Forensic Med Pathol.* Mar;27(1):42-5.
53. **Hallal N, Kharoubi O, Benyettou I, Tair K, Ozaslan M, Aoues AEK. (2016)** *In vivo* amelioration of oxidative stress by *Artemisia absinthium* L. administration on mercuric chloride toxicity in brain regions. *J Biol Sci* **16**: 167–177.
54. **Hasler DW, Faller P, Vařák M. (1998)** Metal-thiolate clusters in the C-terminal domain of human neuronal growth inhibitory factor (GIF). *Biochemistry*, 37, 14966–14973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. **Hendrie HC, Murrell J, Gao S, Unverzagt FW, Ogunniyi A, Hall KS. (2006)** International studies in dementia with particular emphasis on populations of African origin. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* Jul-Sep;20(3 Suppl 2):S42-6.
56. **Henkel B. G. (2004)** *Krebs, Chem. Rev.* 104 801–824.
57. **Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vařák M. (2001)** Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res. Bull.*, 55, 133–145. [[CrossRef](#)]

58. **Hock C, Drasch G, Golombowski S, Müller-Spahn F Willershausen-Zönnchen B, Schwarz P et al. (1998)** Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 105(1):59-68
59. **House E, Collingwood J, Khan A, Korchazkina O, Berthon G, Exley C. (2004)** Aluminium, iron, zinc and copper influence the *in vitro* formation of amyloid fibrils of Abeta42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*6:291–301. [PubMed: 15201484]
60. <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/glossary/redocking>.
61. http://autodock.scripps.edu/index_html/?searchterm=autodock
62. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
63. <https://www.google.com/search?q=autodock>
64. **Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, et al. (1999)** Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as γ -secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 419–427. [CrossRef] [PubMed]
65. **Irie Y, Keung WM. (2001)** Metallothionein-III antagonizes the neurotoxic and neurotrophic effects of amyloid beta peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 416–420. [CrossRef] [PubMed]
66. **Jacob S, Thangarajan S. (2017)** Effect of gestational intake of fisetin (3,3',4',7-Tetrahydroxyflavone) on developmental methyl mercury neurotoxicity in F1 generation rats. *Biol Trace Elem Res* **177**: 297–315.
67. **Joshi D, Mittal DK, Shukla S, Srivastav SK, Dixit VA. (2017b)** *Curcuma longa* Linn. extract and curcumin protect CYP 2E1 enzymatic activity against mercuric chloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress: A protective approach. *Exp Toxicol Pathol* **69**: 373–382.
68. **Kalia K, Flora SJ. (2005)** Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *J Occup Health.*47:1–21. [PubMed: 15703449]
69. **Kandeel M, Kitade Y. (2013)** Computational analysis of siRNA recognition by the Ago2 PAZ domain and identification of the determinants of RNA-induced gene silencing. *PLoS ONE* 8, 2.
70. **Khadidja M, Ikram L. (2019)** Conception in silico de nouveaux composés anticancéreux. *Chimie. Jui.* [Consulté le 1 mars 2021]. [En ligne]. Disponible sur : <http://archives.univ-biskra.dz:80/handle/123456789/13761>.
71. **Kim W, Kim DW, Yoo DY, Jung HY, Kim JW, Kim DW, Choi JH, Moon SM, Yoon YS, Hwang IK. (2015)** Antioxidant effects of *Dendropanax morbifera* Léveille extract in the hippocampus of mercury-exposed rats. *BMC Complement Altern Med* **15**: 247.
72. **Klaassen CD. (1980)** Heavy Metals and Heavy-Metal Antagonists; in Goodman and Gilman's .The Pharmacological Basis of Therapeutics (6th Ed.) Chapter 69; pp. 1615-1637
73. **Klassen CD. (2001)** Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: Casarett & Doull's, McGraw-Hill Professional; 6 edition.
74. **Knudtson ML, Wyse DG, Galbraith PD, Brant R, Hildebrand K, Paterson D, Richardson D, Burkart C, Burgess E.(2002)** Chelation therapy for ischemic heart disease: a randomized, controlled trial. *JAMA.* 287:481–486. [PubMed: 11798370]
75. **Krid A. (2008)** Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant. Thèse de magister d'université : chimie theorique. Constantine: Université Mentouri de Constantine. Algérie. 75p
76. **Ladokun OA, Abiola A, Okikiola D, Ayodeji F, (2018)** GC-MS and molecular docking studies of *Hunteria umbellata* methanolic extract as a potent anti-diabetic Informatics in Medicine Unlocked. 13, 1–8.
77. **Lars Gerhardsson, Thomas Lundh, Lennart Minthon, Elisabet Londos. (2008)** Metal concentration in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*;25:508-515.

78. **Leong CC, Syed NI, Lorscheider FL. (2001)** Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury. *Neuroreport*. Mar 26; 12(4):733-7.
79. Les interactions électrostatiques [Drug Design]. Disponible sur : https://ressources.unisciel.fr/_reste_a_valider/drug_design/co/paragraphe2.html [consulté le mai 26, 2021].
80. **Liu G, Garrett MR, Men P, Zhu X, Perry G, Smith A. (2005)** « Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease. » *Biochim. Biophys. Acta* Sep. 25; 1741 (3): 246-252
81. **Liu J, Yu H, Ning X. (2006)** Effect of quercetin on chronic enhancement of spatial learning and memory of mice. *Sci China C Life Sci* 49:583–590.
82. **Liu W, Xu Z, Li H, Guo M, Yang T, Feng S, Xu B, Deng Yu. (2017)** Protective effects of curcumin against mercury-induced hepatic injuries in rats, involvement of oxidative stress antagonism, and Nrf2-ARE pathway activation. *Hum Exp Toxicol* **36**: 949–966,.
83. **Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, and Markesbery WR. (1998)** Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* **158**: 47-52.
84. **Lu W, Zelazowski AJ, Stillman MJ. (1993)** *Inorg. Chem.* 32 919–926.
85. **Lu W, Stillman MJ, Am J. (1993)** *Chem. Soc.* 115 3291–3299.
86. **Martin T, Derewenda Z. (1999)** The name is bond — H bond. *Nat. Struct. Biol.* Jui. vol. 6, p. 403– 6.
87. **Meloni G, Faller P, Vasak M. (2007)** Redox silencing of copper in metal-linked neurodegenerative disorders: Reaction of Zn7metallothionein-3 with Cu2+ ions. *J. Biol. Chem.* 282, 16068–16078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. **Meloni G, Sonois V, Delaine T, Guilloreau L, Gillet A, Teissie J, Faller P, Vařák M. (2008)** Metal swap between Zn7-metallothionein-3 and amyloid-₁₋₄₀-Cu protects against amyloid-₁₋₄₀ toxicity. *Nat. Chem. Biol.* 4, 366–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. **Mendelsohn LD. (2004)** ChemDraw 8 ultra windows and macintosh versions. *J. Chem. Inf. Model.* 44, 2225–2226.
90. **Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. (2000)** Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 35–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. **Mital M, Wezynfeld NE, Fraczyk T, Wiloch MZ, Wawrzyniak UE, Bonna A, Tumpach C, Barnham KJ, Haigh CL, Bal W, et al. (2015)** A Functional Role for Aβ in Metal Homeostasis? N-Truncation and High-Affinity Copper Binding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 10460–10464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. **Moneim AEA. (2015)** The neuroprotective effect of berberine in mercury-induced neurotoxicity in rats. *Metab Brain Dis* **30**: 935–42
93. **Moore BD, Chakrabarty P, Levites Y, Kukar TL, Baine AM, Moroni T, Ladd TB, Das P, Dickson DW, Golde TE. (2012)** Overlapping profiles of Aβ peptides in the Alzheimer's disease and pathological aging brains. *Alzheimers Res. Ther.* 4, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. **Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ. (1992)** Mass spectrometry of purified amyloid ₁₋₄₀ protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 267, 17082–17086. [[PubMed](#)]
95. **Muñoz A, Rodríguez AR. (1995)** *Electroanalysis* 7 674–680.
96. **Mutkus L, Aschner JL, Syversen T, Shanker G, Sonnewald U, Aschner M. (2006)** Mercuric chloride inhibits the in vitro uptake of glutamate in GLAST- and GLT-1-transfected mutant CHO-K1 cells. *Biol Trace Elem Res.* Mar;109(3):267-80.
97. **Mutter J, Naumann J, Sadaghiani C, Schneider R, Walach H. (2004)** Alzheimer disease: mercury as pathogenetic factor and apolipoprotein E as a moderator. *Neuro Endocrinol Lett.* Oct;25(5):331-9.

98. Naslund, J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J, Gandy SE, Winblad B, Greengard P, et al. (1994) Relative abundance of Alzheimer A_β amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8378–8382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Olivieri G, Brack C, Muller-Spahn F, Stahelin HB, Herrmann M, Renard P et al. (2000) Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem*. Jan; 74(1):231-6.
100. Othman MS, Safwat G, Aboulkhair M, Abdel Moneim AE. (2014) The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food Chem Toxicol* 69: 175–181.
101. Owoeye O, Arinola GO. (2017) A vegetable, *Launaea taraxacifolia*, mitigated mercuric chloride alteration of the microanatomy of rat brain. *J Diet Suppl* 14: 613–625.
102. Oz G, Zangger K, Armitage IM. (2001) Three-dimensional structure and dynamics of a brain specific growth inhibitory factor: Metallothionein-3. *Biochemistry*, 40, 11433–11441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Paik SR, Shin HJ, Lee JH. (2000) Metal-catalyzed oxidation of α -synuclein in the presence of Copper(II) and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 269–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Palkiewicz P, Zwiers H, Lorscheider FL. (1994) ADP-ribosylation of brain neuronal proteins is altered by in vitro and in vivo exposure to inorganic mercury. *J Neurochem*. May;62(5):2049-52.
105. Palleti JD, Jyothsna P, Muppalaneni NB, Chitti S. (2011) Virtual screening and molecular docking analysis of Zap-70 kinase inhibitors. *Int. J. Chem. Anal. Sci.* 2, 1208–1211.
106. Pedersen JT, Hureau C, Hemmingsen L, Heegaard NH, Ostergaard J, Vašák M, Faller P. (2012) Rapid exchange of metal between Zn²⁺-metallothionein-3 and amyloid- β peptide promotes amyloid-related structural changes. *Biochemistry* 51, 1697–1706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Pendergrass JC, Haley BE, Vimy MJ, Winfield SA, Lorscheider FL. (1997) Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: similarity to a molecular lesion in Alzheimer diseased brain. *Neurotoxicology*. 18(2):315-24.
108. Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, Kiers L, Cherny R, Li QX, Tammer A, Carrington D, Mavros C, Volitakis I, Xilinas M, Ames D, Davis S, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL. (2003) Metal-protein attenuation with iodochlorohydroxyquin (clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol*. 60:1685–1691. [[PubMed](#): 14676042]
109. Rognan Didier N.d. Criblage virtuel par docking moléculaire: 11.
110. Roschitzki B, Vašák M. (2002) A distinct Cu²⁺-thiolate cluster of human metallothionein-3 is located in the N-terminal domain. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 7, 611–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Roschitzki B, Vašák M. (2003) Redox labile site in a Zn²⁺ cluster of Cu²⁺, Zn²⁺-metallothionein-3. *Biochemistry*, 42, 9822–9828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Sakaue M, Mori N, Okazaki M, Kadowaki E, Kaneko T, Hemmi N, Sekiguchi H, Maki T, Ozawa A, Hara S, Arishima K, Yamamoto M. (2011) Vitamin K has the potential to protect neurons from methylmercury-induced cell death *in vitro*. *J Neurosci Res* 89: 1052–1058.
113. Salahi D. 2014 Modélisation de la structure d'une protéine impliquée dans le cancer et de ses interactions avec quelques ligands. [Thèse]. Tizi ouzou : Université Mouloud Mammeri, Faculté des sciences Département chimie.

114. **Saoussene ML. (2016)** Etude docking et synthèse de dérivés de xanthone : voie d'accès à de nouveaux inhibiteurs de l' α -glucosidase. [Thèse de doctorat].
115. **Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. (2003)** Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* 2:539–547. [PubMed: 12941576]
116. **Sengupta U, Nilson A N, Kayed R. (2016)** The Role of Amyloid-beta Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* 6, 42–49. [CrossRef] [PubMed]
117. **Sewell AK, Jensen LT, Erickson JC, Palmiter RD, Winge DR. (1995)** Bioactivity of metallothionein-3 correlates with its novel beta domain sequence rather than metal binding properties. *Biochemistry*, 34, 4740–4747. [CrossRef] [PubMed]
118. **Shah et al.** 'Molecular Docking and In Silico Cogitation Validate Mefenamic Acid Prodrugs as Human Cyclooxygenase-2 Inhibitor'.
119. **Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, et al. (1999)** Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 402, 537–540. [CrossRef] [PubMed]
120. **Smith MA, Nunomura A, Zhu X, Takeda A, Perry G. (2000)** Metabolic, metallic, and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease. *Antioxid Redox Signal.* 2:413–420. [PubMed: 11229355]
121. **Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G et al. (2008)** Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* Dec; 5(6):525-32.
122. **Sumathi T, Shobana C, Christinal J, Anusha C. (2012)** Protective effect of *Bacopa monniera* on methyl mercury-induced oxidative stress in cerebellum of rats. *Cell Mol Neurobiol* 32: 979–87
123. **Suri C, Naik PK. (2012)** Elucidating the precise interaction of reduced and oxidized states of neuroglobin with Ubc12 and Cop9 using molecular mechanics studies. *Int. J. Fundam. Appl. Sci.* 1,
124. **Tanji K, Irie Y, Uchida Y, Mori F, Satoh K, Mizushima Y, Wakabayashi K. (2003)** Expression of metallothionein-III induced by hypoxia attenuates hypoxia-induced cell death in vitro. *Brain Res.*, 976, 125–129. [CrossRef]
125. **Teniou S, Bensegueni A. (2012)** Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Constantine [Thèse de magistère]. Université Mentouri Constantine.
126. **Thiagarajan K, Gamit N, Mandal S, Ayyathan DM, Chandrasekaran R. (2018)** Amelioration of methylmercury induced neural damage by essential oil of *Selinum vaginatum* (Edgew) C. B. Clarke. *Pak J Pharm Sci* 31: 399–404.
127. **Trott O, Olson AJ. (2010)** AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461.
128. **Tumani H, Shen G, Peter JB, Bruck W. (1999)** Glutamine synthetase in cerebrospinal fluid, serum, and brain: a diagnostic marker for Alzheimer disease? *Arch Neurol.* Oct;56(10):1241-6.
129. **Usha T, Tripathi P, Pande V, Middha SK. (2013)** Molecular docking and quantum mechanical studies on pelargonidin-3-glucoside as renoprotective ACE inhibitor. *ISRN Comput. Biol.*, 1–4
130. **Vašák M, Romero-Isart N. (2005)** Metallothioneins. In *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2nd ed.; King, R.B., Ed.; J. Wiley & Sons Ltd.: New York, NY, USA, pp. 3208–3221.
131. **Vašák M, Meloni G. (2011)** Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 1067–1078. [CrossRef] [PubMed]
132. **Wang H, Zhang Q, Cai B, Li H, Sze KH, Huang ZX, Wu HM, Sun H. (2006)** Solution structure and dynamics of human metallothionein-3 (MT-3). *FEBS Lett.* 580, 795–800. [CrossRef] [PubMed]
133. **Wang Z, Wei X, Yang J, Suo J, Chen J, Liu X, Zhao X. (2016)** Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neurosci. Lett.* 610, 200–206. [CrossRef]

134. **Wang B, Wood IS, Trayhurn P. (2008)** PCR arrays identify metallothionein-3 as a highly hypoxia-inducible gene in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 88–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. **Weiner JA, Nylander M.(1993)** The relationship between mercury concentration in human organs and different predictor variables. . *Sci Total Environ.* Sep 30;138(1-3):101-15
136. **Wenstrup D, Ehmann WD, Markesbery WR. (1990)** Trace element imbalances in isolated subcellular fractions of Alzheimer's disease brains. *Brain Res.* Nov 12;533(1):125-31.
137. **Wezynfeld NE, Stefaniak E, Stachucy K, Drozd A, Plonka D, Drew SC, Krezel A, Bal W. (2016)** Resistance of Cu(A₄–16) to Copper Capture by Metallothionein-3 Supports a Function for the A₄–42 Peptide as a Synaptic Cu(II) Scavenger. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55, 8235–8238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. **WHO/IPCS. (1991)** Inorganic mercury, Environmental Health Criteria 118. Geneva: WHO.
Lorscheider FL, Vimy MJ, Summers AO. (1995) Mercury exposure from "silver" tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. *FASEB J.* Apr;9(7):504-8.
139. **Yang H, Xu Z, Liu W, Wei Y, Deng Y, Xu B. (2012)** Effect of grape seed proanthocyanidin extracts on methylmercury-induced neurotoxicity in rats. *Biol Trace Elem Res* **147**: 156–164.
140. **Yokel RA, Ackrill P, Burgess E, Day JP, Domingo JL, Flaten TP, Savory J. (1996)** Prevention and treatment of aluminum toxicity including chelation therapy: status and research needs. *J Toxicol Environ Health.*48:667–683. [[PubMed](#): 8772805]
141. **Yoshida M , Satoh M, Shimada A, Yamamoto E , Yasutake A , Tohyama C . (2002)** *Toxicology* 175 215–222.
142. **Yoshida M, Watanabe C , Horie K , Satoh M , Sawada M , Shimada A . (2005)** *Toxicol. Lett.* 155 361–368.