

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

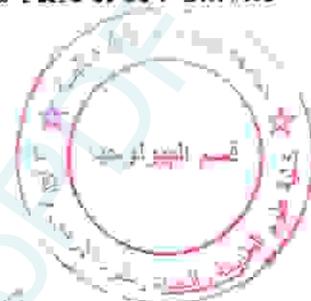
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



M/540.754

17/1568

Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaire

Spécialité/Option : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

Département : Biologie

Thème

Etude *in silico* de l'effet inhibiteur potentiel d'un groupe des flavonoïdes contre la PKC comme cible de la thérapie anticancéreuse.

Présenté par :

MAHDJOUB Wedjdane

BOUSSAHA Imene

FARHI Sarra

Devant la commission composée de :

Président : M^{me} SOUIKI L.
Examineur : Mr MEZROUAA L.
Encadreur : Mr BAALI S.
Membre : Mr MERZOUG A.
Membre : Mr BOUDALIA S.
Membre : Mr GUEROUI Y.

Université de Guelma
Université de Guelma

Juin 2017

Remerciements

Tout d'abord louange à « ALLAH » qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et qui nous a inspiré les bons pas et nous a donné le courage et la patience pour pouvoir élaborer ce modeste travail de fin d'études de master en biologie.

Nous somme honorées et reconnaissantes a notre encadreur :

Mr. BAALI S. qui nous a fait preuve d'une grande patience et qui a été d'un grand aide dans la réalisation de ce travail, ses conseils, ses encouragements, ses orientations ainsi que son soutien moral et scientifique. IL nous permis de mener à bien la rédaction de ce travail.

Nos vifs et sincères remerciements s'adressent aux honorables membres de jury :

M^{me} SOUIKI L. Professeur en biologie, qui nous a fait l'honneur de présider la commission pour juger ce mémoire de fin d'études.

Mr. MEZROUAA E. Maître assistant en biologie, de nous avoir fait le grand honneur d'accepter d'examiner la commission pour juger notre modeste travail.

Nous tenons à remercier également tous les autres membres de la commission de soutenance : Mr MERZOUG A ; Mr GEROUY Y et Mr BOUDALIA S, qui nous a fait

L'honneur de participer à notre jury de mémoire.

Nous tenons à remercier, tout le corps enseignant du Département de Biologie de l'Université 08 mai 1945 de Guelma pour la qualité de leur enseignement.

Sans oublier ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

Nous remercions toute notre famille pour sa patience durant toutes ces années d'études. Que toutes celles et tous ceux qui ont bien voulu nous aider d'une manière ou d'une autre dans la réalisation de ce travail acceptent le témoignage de notre profonde gratitude.

Dédicace,

Premièrement, je remercie Allah, le bon Dieu, qui m'a donné l'ambitieux, le défi, la santé et le courage pour terminer cette mémoire.

Je tiens à remercier profondément mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien et leurs encouragements. Je remercie mes beaux parents et tous les membres de la grande famille «ferhi», surtout mon frère « Nedjmeddine », Qui m'a fait toujours confiance et qui m'a beaucoup encouragé et mes belles sœurs « Selma, Mouna et Rima » pour y arriver, je lui dis « Merci beaucoup ma chère famille ».

Sans oublier un grand merci du fond du cœur à deux mes collègues de travail « Boussaha imane » et « Mahdjoub widjdane » qui sont toujours à mes côtés, qui m'a aidé que Dieu les protèges.

Table des matières

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Introduction.....	1

Partie théorique

Chapitre 01 : Généralités

1. Cancer	4
1. Définition.....	4
2. Epidémiologie.....	4
3. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse.....	5
4. Etapes de la cancérogenèse.....	6
4.1. L'initiation.....	6
4.2. La promotion.....	6
4.3. La progression.....	7
5. Les Causes du cancer.....	8
6. Classification des cancers.....	8
7. Traitement du cancer.....	9
7.1. Chirurgie : souvent le premier traitement.....	9
7.2. Radiothérapie : l'exposition à des rayons.....	9
7.3. Chimiothérapie : agir avec des médicaments.....	10
7.4. Hormonothérapie : une action indirecte.....	10

TABLE DES MATIERES

7.5. L'immunothérapie.....	11
7.6. les traitements de confort dits aussi soins de support.....	11
II. Protéines kinase C.....	12
1. Généralités.....	12
2. Structure des PKC.....	12
2.1. Le site pseudo-substrat.....	13
2.2. Le domaine C1, Site de liaison du PMA.....	13
2.3. Le domaine C2.....	14
2.4. La région V3.....	14
2.5. Le domaine catalytique et la région V5.....	14
3. Distribution des PKC dans l'organisme.....	16
4. Vers de nouvelles cibles thérapeutiques: la voie de signalisation de la protéine Kinase C.....	17
4.1.La voie de signalisation intracellulaire de la PKC.....	18
4.2.Activation des PKC et leur régulation.....	18
4.2.1. Activation par phosphorylation.....	18
4.2.2. Activation par DAG.....	18
4.2.3. Activation par d'autres lipides.....	19
4.3.Les différentes voies métaboliques de la pkc.....	21
4.4.La protéine Kinase C (PKC) et l'apoptose.....	21
Chapitre 02 : Les flavonoïdes	
1. Les flavonoïdes.....	23

TABLE DES MATIERES

1.1.Définition.....	23
1.2.Structure des flavonoïdes.....	23
1.3.Biosynthèse des flavonoïdes.....	24
1.4.Classification des flavonoïdes.....	24
1.5.Propriétés des flavonoïdes.....	25
1.5.1. Propriétés anticancéreuses des flavonoïdes.....	25
1.5.2. Mécanisme d'action anticancéreuse des flavonoïdes.....	26
Chapitre 03 : Docking moléculaire	
1. Docking moléculaire.....	29
1.1.Définition.....	29
1.2.Les différents types de docking moléculaire.....	29
1.3.Les outils du docking moléculaire.....	30
1.3.1. Le récepteur.....	30
1.3.2. Le(s) ligand(s).....	30
1.4.Principes de fonctionnement de docking.....	30
1.5.Algorithme de recherche.....	31
2. Programme de GOLD.....	32
2.1.Algorithme de Gold.....	32
2.2.Le mécanisme du placement du ligand dans le site actif.....	33
2.3.La fonction de score.....	33

Partie Pratique

Chapitre 04 : Matériel et méthodes

I. Matériel	34
1. Microordinateur	34
2. Programme	34
2.1.PyMOL	34
2.2.GOLD	35
2.2.1. Hermes	35
3. Les banques de données	36
3.1.La banque des données protéiques	36
3.2.Pubchem	36
4. Structure des protéines kinase C utilisées.....	37
II. Méthodes	38
1. Les étapes de docking	38
1.1. Préparation des molécules à l'arrimage	38
1.2. Préparation des ligands	38
2. Les différentes étapes de docking	41
2.1.Addition des hydrogènes	42
2.2.Suppression des molécules d'eau	42
2.3.Suppression des ligands	42
2.4.Définition de site de liaison.....	42

TABLE DES MATIERES

2.5.La sélection du Ligand	42
2.6.La fonction de score.....	42
2.7.Run GOLD	42
2. Filtrage selon la règle de 5 de lipinski « 1997 »	43
Chapitre 05 : Résultats et discussion	
I. Résultats.....	44
1. Fiabilité de programme utilisé.....	44
1.1.Le test RMSD.....	44
1.2. L'analyse visuelle.....	45
2. Le docking des diverses molécules sur le récepteur <u>3TXO</u> par GOLD.....	47
2.1. Le complexe PKC η -inhibiteur (Naphthyridine).....	47
2.2. Le docking des différents flavonoïdes sur le récepteur <u>3TXO</u>	50
2.2.1. Etude des interactions du Gallocatéchine gallate avec la PKC η	52
2.2.2. Etude des interactions du Lépicatéchine gallate avec la PKC η	53
2.2.3. Etude des interactions du l'Epigallocatechine gallate avec la PKC η	55
2.2.4. Etude des interactions du Curcumine avec la PKC η	56
3. Application de la règle 5 du Lipinski.....	58
II. La discussion	59
Conclusion.....	61
Références bibliographiques.....	62
Résumé	

Liste des tableaux

N° : Tableau	Titres	pages
1	Présente quelques classes distinctes des flavonoïdes.	24
2	La relation entre la consommation de flavonoïdes et le cancer.	26
3	Les structures des Protéines kinase utilisées.	38
4	Représentation des structures 2D et les formules des flavonoïdes.	39
5	Valeurs de RMSD des quatre complexes PKC-ligand étudiés.	44
6	Les interactions hydrogènes entre la PKC η et le Naphthyridine.	49
7	Résultats de docking avec le programme GOLD.	51
8	Représentation des interactions formées par Gallocatéchine gallate.	52
9	Les ponts hydrogènes entre la PKC η et la Lépicatéchine gallate.	53
10	Les ponts hydrogènes entre la PKC η et Epigallocatechine gallate.	55
11	Les ponts hydrogènes entre la PKC η et la Curcumine.	56
12	Propriété pharmacocinétique des flavonoïdes (La Gallocatéchine gallate, la Lépicatéchine gallate, la Curcumine et le Epigallocatechine gallate).	58

Liste des figures

N° : Figure	Titres	Pages
1	Les cellules tumorales partagent des propriétés communes qui les différencient des cellules « normales ».	6
2	Étapes de la cancérogenèse.	7
3	Sous familles et structures des PKC.	12
4	structure du domaine catalytique du PKC beta en complexe avec l'inhibiteur BIM1 selon le model cartoon (image générée par <i>Pymol</i>)	15
5	Superposition des domaines catalytique des enzymes PKCalpha (en vert), PKCdelta (en rouge), PKCgamma (en jaune), PKCepsilon (en bleu) et PKCzeta (en orange)	16
6	Diagramme des différentes voies d'activation de la PKC. La voie PLC représentée par des flèches roses, les flèches bleues indiquent les activateurs de la PKC.	20
7	Diagramme des différentes voies d'activation de la PKC. La voie PLC représentée par des flèches roses, les flèches bleues indiquent les activateurs de la PKC.	21
8	Rôle de la PKCalpha, PKCdelta et PLC-DAG dans l'activation des voies ERK et PI3K_Akt	22
9	Structure de base des flavonoïdes.	23
10	Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogenèse.	27
11	Principe générale d'un programme de docking.	31
12	La fenêtre de visualisation.	34
13	L'interface graphique du GOLD.	35
14	L'interface graphique du site web de la base de données PDB.	36
15	L'interface graphique du site web de la base de données Pubchem.	37

16	Superposition des géométries de la NVP-AEB071 (l'inhibiteur de la PKC α) donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb : 3IW4. RMSD = 0,426Å). Image générée par GOLD.	45
17	Superposition des géométries de la Naphthyridine (l'inhibiteur de la PKC η) donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb : 3TXO. RMSD=0.434 Å). Image générée par GOLD.	46
18	Superposition des géométries de la NVP-XAA228 (inhibiteur de la PKC θ) donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb : 2JED. RMSD=0.634Å). Image générée par GOLD. Image générée par GOLD.	46
19	Superposition des géométries de la Bisindolylmaleimide (l'inhibiteur de la PKC β II) donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb: 2I0E. RMSD=0.786Å). Image générée par GOLD.	47
20	Diagramme d'interaction de l'inhibiteur Naphthyridine avec la PKC η (code pdb : 3TXO).	48
21	Emplacement de l'inhibiteur Naphthyridine dans le site actif de la PKC η (code PDB: 3TXO). Image générée par Pymol.	49
22	Mode de liaison de la Naphthyridine avec le site actif de la PKC η (code PDB: 3TXO). Image généré par GOLD.	50
23	Représentation de liaison hydrogène (en vert) formée par le Gallocatéchine gallate. Image générée par GOLD.	52
24	Emplacement de Gallocatéchine gallate dans le site actif de la PKC η . Image générée par Pymol.	53
25	Représentation de liaison hydrogène (en vert et en orange) formée par la Lépicatéchine gallate. Image générée par GOLD.	54
26	Emplacement de la Lépicatéchine gallate dans le site actif de la PKC η . Image générée par Pymol.	54

27	Représentation de liaison hydrogène (en vert et en orange) formée par l'Epigallocatechine gallate. Image générée par GOLD.	55
28	Emplacement de l'Epigallocatechine gallate dans le site actif de la PKC η . Image générée par Pymol.	56
29	Représentation de liaison hydrogène (en vert et en rouge) formée par la Curcumine. Image générée par GOLD.	57
30	Emplacement de la Curcumine dans le site actif de la PKC η . Image générée par Pymol.	57

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
%	Pour cent.
4CL	Coa-Ligase.
2D	Deux dimensions.
3D	Trois dimensions.
Å	Angström.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
AG	Algorithme génétique.
ASP	Astex statistical potential.
C4H	Enzyme cinnamate -4-hydroxylase.
CCDC	Cambridge crystallographic data centre.
CHEM PLP	Picewise linear potential.
CYCLE C	Cycle central.
DA	Dalton.
DAG	Diacylglycérol.
G	Gramme.
Go	Giga.
GOLD	Genetic Optimisation for Ligand Docking.
LIG-PREP	Ligand preparation.
LIP	Lambda PKC Interaction Protéine.
LOG P	Logarithme protéine.
LPA	Acide lyphosphatidique.
LysoPC	Lysophosphotylcholine.

LISTE DES ABREVIATIONS

NCBI	Centre National De Biotechnologie Information.
NIH	National Institutes Of Health.
OMS	Organisation Mondiale de Santé.
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie.
PAL	Phénylène Amonia Lyase.
PDB	Protéine Banc Data.
PKC	protéine kinase C.
PKCa	protéine kinase C Atypique.
PKCc	protéine kinase C classique.
PKCn	protéine kinase C nouvelle.
PKC η	protéine kinase C éta.
PKC θ	protéine kinase C Thêta.
PKC β II	protéine kinase C Beta 2.
PKC α	protéine kinase C Alpha.
PKC ϵ	protéine kinase C epsilon.
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acétate.
PS	Phosphatidylsérine.
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire.
RMSD	Root Mean Square Déviation.
UV	Ultra Violet.

Introduction

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Le cancer est une maladie grave qui se traduit par une perturbation de la communication cellulaire, associée à une absence de mort cellulaire, engendrant le développement d'amas de cellules cancéreuses (appelés tumeurs) qui échappent aux règles de fonctionnement du corps. La cellule cancéreuse est une cellule dérégulée qui se multiplie sans contrôle. En se multipliant de façon anarchique, les cellules cancéreuses donnent naissance à des tumeurs de plus en plus grosses qui se développent en envahissant puis détruisant les zones qui les entourent. Les cellules cancéreuses peuvent également essaimer à distance d'un organe pour former une nouvelle tumeur, ou circuler sous forme libre. En détruisant son environnement, le cancer peut devenir un réel danger pour la survie de l'être vivant (Estelle, 2006).

La signalisation cellulaire permet normalement une régulation fine des mécanismes cellulaires fondamentaux comme la différenciation et la prolifération cellulaire. L'intégration des signaux biochimiques par les cellules permet de maintenir un équilibre physiologique dans les différents ensembles tissulaires. La signalisation débute par la fixation d'un ligand sur son récepteur membranaire. Cette liaison provoque l'activation du récepteur puis le recrutement de seconds messagers et conduit à une cascade biochimique dont résulte l'activation de la cellule (apoptose, prolifération, migration, entrée en cycle...) (Lyno, 2009)

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle. La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques, toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles et s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments (Bouziane, 2014).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols des végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (Mahdjar, 2013).

Des flavonoïdes tels que la Quercétin, la Curcumine, la Silybinine, la Naringine et l'Epicatechine sont aujourd'hui de plus en plus commercialisés pour diverses applications

médicamenteuses, alimentaires et cosmétologiques ; et ce que les molécules soient à l'état pur ou sous forme d'extraits. Plusieurs études ont montré que les plantes médicinales sont très riches en molécules à activité biologique comme les flavonoïdes. Ces composés polyphénolique sont très répandus dans les aliments d'origine végétale et sont doués de plusieurs activités biologiques y compris les activités antioxydantes, anticancéreuses et chimio-préventives. (Akroum, 2011).

La recherche en biologie ne peut, actuellement, se passer des outils informatiques pour traiter le flux de données produites et optimiser ses avancées. L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus précisément l'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo-saxon "docking"). L'emploi initial du "docking" moléculaire a été de prédire et reproduire des complexes protéine-ligand. (Chikhi, 2007)

Les protéines ont un ou plusieurs sites actifs dans leur conformation native. Le médicament (ligand) doit être choisi pour que son interaction avec la cible, à des endroits spécifiques, modifie cette conformation tridimensionnelle native et, par conséquent, sa fonctionnalité. Le changement de conformation peut engendrer une inhibition irréversible (la protéine est chimiquement détruite) ou réversible (la protéine est simplement liée au médicament sans changement de conformation). L'opération d'arrimage du ligand dans le site actif de la protéine est appelée docking moléculaire (Bruno, 2007).

L'objectif de la présente étude consiste à évaluer les activités anticancéreuses d'un groupe de flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation et comprendre les mécanismes mis en jeu dans les interactions entre ces flavonoïdes et la protéine kinase c (PKC) considérées dans cette étude (PKC eta).

Il nous a paru alors important de développer cet aspect en vue d'évaluer l'énergie d'interaction de ces composés et aussi de visualiser les liaisons qu'ils impliquent avec le site actif de ces protéines.

Nous présentons ce travail selon cinq chapitres. Le premier chapitre sera consacré à l'étude bibliographique de l'enzyme PKC (structure, rôle, localisation, différents interactions avec d'autres structures ...), et son implication dans le cancer. Le deuxième chapitre sera consacré à l'étude bibliographique des flavonoïdes. Le troisième chapitre sera consacré à l'étude bibliographique de l'utilisation de l'outil du docking moléculaire, qui représente un moyen moderne pour détecter *in silico* des inhibiteurs de cibles d'intérêt thérapeutiques.

Nous présentons, dans le quatrième chapitre, les différents matériels et méthodes utilisés dans cette étude. Enfin le dernier chapitre expose l'essentiel de nos résultats et une discussion.

Produced with ScanTOPDF

Chapitre 01
Cancer et PKC

Produced with ScanTOPDF

I. Cancer

1. Définition

Le cancer est une maladie multifactorielle qui correspond à une multiplication anarchique et incontrôlée de certaines cellules normales de l'organisme. Ces cellules échappent aux mécanismes normaux de différenciation, de régulation de leur multiplication et résistent à la mort cellulaire programmée. Pour qu'un cancer se développe, la cellule doit accumuler plusieurs mutations dans son génome. Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors de la division cellulaire. Le cancer se développe à partir d'une seule cellule saine en un ensemble de cellules cancéreuses. (Tigrine, 2014)

Ces cellules cessent de jouer leur rôle spécifique et commencent à se multiplier de manière anarchique. Elles finissent par envahir les tissus à proximité et peuvent parfois migrer dans d'autres régions du corps. Le cancer est souvent perçu comme une maladie incurable et fatale. Mais aujourd'hui, principalement grâce au dépistage précoce et aux traitements, bon nombre de gens en guérissent. [1]

2. Epidémiologie

Le cancer constitue la première cause de mortalité dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé (L'OMS) estimait que le cancer ferait 84 millions de morts entre 2005 et 2015 si aucune mesure n'est prise. En effet, L'OMS estime que le nombre de décès liés au cancer pourrait dépasser les 11 millions annuellement en 2030 si la tendance se maintient. (Vaillancourt-Jean, 2012, Tigrine, 2014)

Le cancer est d'abord lié à l'âge. Il est exceptionnel avant 35 ans (il est cependant la 2ème cause de mortalité chez l'enfant et chez le jeune adulte après les morts violentes). Sa fréquence augmente régulièrement ensuite. Cette augmentation à partir de 35 ans fait apparemment du cancer une maladie du vieillissement alors qu'avant 35 ans les cancers sont de types « embryonnaires » ou proches des cancers expérimentaux en particulier de cause virale. Pour beaucoup de cancers au-delà de 35 ans, il y a comme une « usure » de tel ou tel organe exposé à une cause « d'irritation » pendant des années. C'est le cas pour les 2 principales causes connues par les statistiques : L'alcool et le tabac qui sont responsables d'environ 25 % des cancers observés (bronches, ORL, vessie). Par ailleurs, à ce sujet, il faut indiquer que la persistance de l'intoxication alcoolotabagique grève les résultats des traitements. (Baillet, 2003)

Il est à noter qu'en Algérie la situation est alarmante, les adolescents et les jeunes adultes âgés entre 15 et 39 ans sont de plus en plus affectés par le cancer dont la consanguinité, l'alimentation et l'environnement sont les facteurs les plus incriminés. Les localisations les plus importantes de ces cancers sont le nasopharynx, le sang, le côlon, le rectum et le sein chez la femme. (Tigrine, 2014)

3. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse

La cellule cancéreuse va au cours de son développement acquérir une série de capacités que ne possèdent pas les cellules normales. Toutes les modifications génétiques acquises aboutissent à donner des propriétés nouvelles des cellules malignes. Les propriétés essentielles des cellules cancéreuses sont (Cabarro, 2008., Teniou, 2012) :

- ☞ Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération : Normalement, les cellules ne se divisent que lorsqu'elles reçoivent un stimulus particulier mais dans les tumeurs, les cellules n'ont plus besoin de ce signal à cause de l'expression accrue et continue des gènes de la prolifération cellulaire.
- ☞ Insensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération cellulaire.
- ☞ Abolition de l'apoptose ou mort cellulaire programmée. En cas de stress ou d'anomalie ne pouvant pas être éliminée, une cellule normale se suicide en utilisant l'apoptose. Les cellules tumorales ont inactivé tous ces mécanismes pour mieux survivre.
- ☞ -Capacité proliférative illimitée : Le nombre usuel de divisions cellulaires pour une cellule humaine est de 50 à 60, après quoi elle cesse de pouvoir se diviser. Les cellules tumorales continuent de se diviser sans limite visible grâce à l'activité de la télomérase qui est fortement active dans toutes les cellules cancéreuses. Les cellules deviennent immortelles
- ☞ Capacité de susciter l'angiogenèse. Les cellules tumorales (et la tumeur) ont un besoin important en oxygène et en nutriments pour survivre. Elles vont donc stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'alimenter la tumeur.
- ☞ Acquisition d'un pouvoir invasif. Les cellules tumorales sont capables de passer à l'intérieur d'un vaisseau sanguin afin d'être transportées dans un autre organe où elles vont générer une seconde tumeur. (Teniou, 2012)

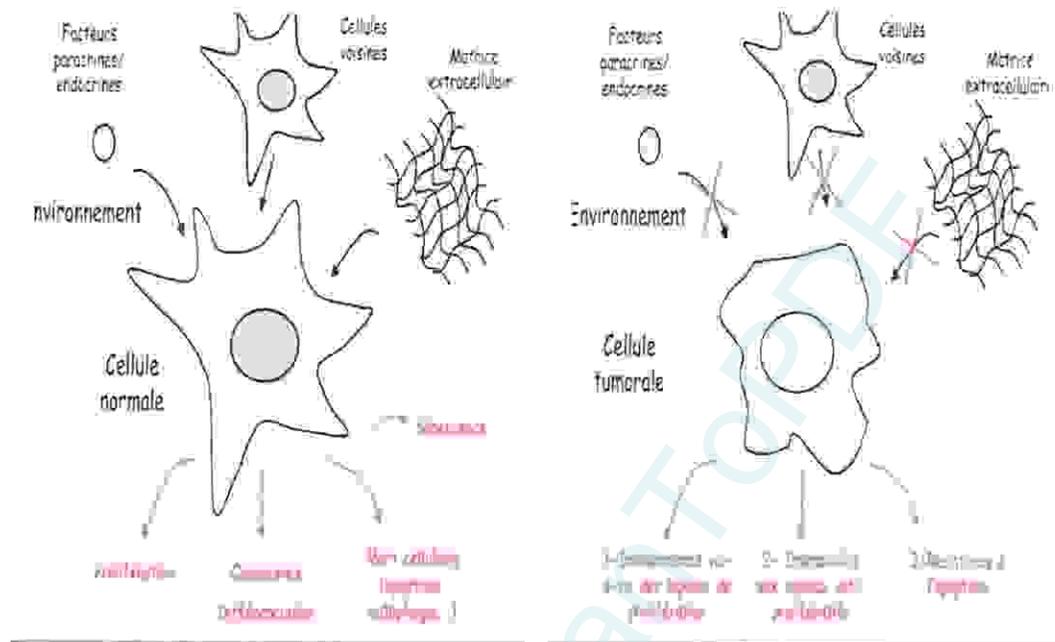


Figure 01 : Les cellules tumorales partagent des propriétés communes qui les différencient des cellules « normales ». (Teniou, 2012)

4. Etapes de la cancérogenèse

La cancérogenèse c'est ensemble de phénomènes pathologiques conduisant à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. (Nesslany, 2013)

La cancérogenèse est un processus composé d'étapes multiples:

4.1. L'initiation

L'initiation est une étape ponctuelle correspondant à l'altération du génome d'une cellule lui conférant la propriété d'échapper aux régulations cellulaires. Dans les cellules somatiques, des altérations de ADN d'origine endogène (erreurs au cours de la réplication de l'ADN ou de la mitose, effet des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire sur l'ADN, hypo-ou hyper-méthylation de l'ADN), ou induites par des facteurs environnementaux cancérogènes apparaissent fréquemment au cours de la vie. Une altération de l'ADN n'est transmise aux cellules dérivant de la cellule « initiée », que si elle n'est pas létale et n'est pas réparée. (Pierre-Henri *et al.*, 2011)

4.2. La promotion

La Promotion (stimulation de l'expansion de la tumorigenèse). Elle peut se prolonger pendant plusieurs années. La cellule se transforme en cellule pré-néoplasique avec maintien du caractère immortel. Au cours de laquelle la cellule initiée va proliférer et conduire progressivement au développement d'un clone de cellules mutées. La

multiplication cellulaire étant exponentielle, un nombre limité de divisions cellulaires suffit à engendrer un nombre considérable de cellules tumorales. Divers facteurs endogènes (facteurs de croissance et hormones) ou exogènes (toxiques chimiques, facteurs alimentaires, etc.), du fait de leur action répétitive, vont déréguler certains des mécanismes fins qui contrôlent la multiplication cellulaire. (Pierre-Henri et *al.*, 2011., Tabart, 2011)

4.3. La progression

La progression tumorale est une phase complexe qui consiste en l'accumulation de nouvelles anomalies du génome, la vascularisation de la tumeur (angiogenèse) et en l'acquisition de la capacité d'invasion conférant ainsi à la tumeur une plus grande malignité. (Pierre-Henri et *al.*, 2011)

La prolifération continue et les gènes suppresseurs de tumeurs perdent leur activité normale. Il y a une sur-activation de métalloprotéases permettant le remodelage de la matrice extracellulaire. Des nouveaux vaisseaux se forment afin d'alimenter la tumeur. L'invasion vers des sites secondaires est initiée pour en arriver à la formation de métastases. (Vézina, 2012)



Figure 02 : Étapes de la cancérogenèse. Des agents néfastes affectent une cellule normale et l'initient à la cancérogenèse. La cellule entre en phase de promotion tumorale. Elle subit des lésions au niveau de l'ADN et cela déclenche la prolifération incontrôlée. Des oncogènes sont activés et des gènes suppresseurs sont inactivés pour amener les cellules en phase de progression qui peut durer des années. Finalement, le cancer s'établit et peut être diagnostiqué. (Vézina, 2012).

5. Les Causes du cancer

Les causes du cancer restent très variables en fonction du type de cancer. Toutefois, il est admis que certains types ont une composante génétique importante comme le cancer du sein. Selon les estimations, l'hérédité serait responsable dans 5 à 15% des cas de cancer. Les recherches ont permis également de constater le rôle important de risques dits "environnementaux" dans la survenue du cancer. Ces facteurs tendent à favoriser ou accélérer le développement des tumeurs. L'âge fait partie des critères importants : le risque de cancer augmente en même temps que l'âge avance. Cependant, le cancer peut survenir quel que soit l'âge de l'individu.

Il est ainsi admis de nos jours que près de deux tiers des cancers sont liés aux habitudes de vie et notamment au tabagisme, à l'alimentation, ainsi qu'à l'environnement, qui comprend la pollution, la manipulation de substances toxiques, etc. Certains cancers sont également associés à des micro-organismes, notamment des virus. [2]

6. Classification des cancers

La classification des tumeurs a plusieurs buts :

- ☞ Prévoir le pronostic.
- ☞ Adapter la thérapeutique à la situation clinique.
- ☞ Comparer les résultats thérapeutiques entre groupes de malades relativement homogènes.
- ☞ Permettre des études thérapeutiques permettant de mettre en évidence un progrès thérapeutique.

Elle va donc permettre de définir des groupes thérapeutiques pour lesquels un protocole thérapeutique, prenant en compte toutes les possibilités thérapeutiques, sera établi. Il est indispensable de faire une classification tumorale avant tout traitement pour permettre :

- ☞ De ne pas proposer un traitement inutile (par exemple: intervention mutilante alors que le malade présente déjà des métastases).
- ☞ De proposer le traitement le plus adapté (par exemple: traitement à visée générale alors qu'un traitement à visée locale est plus adapté). (Heron, 2003)

Les cancers diffèrent selon les caractéristiques des tumeurs : tumeur bénigne, maligne ou métastatique, et aussi selon leurs origines tissulaires. (Tigrine, 2014)

7. Traitement du cancer

Il s'agit d'un traitement multidisciplinaire, associant plusieurs traitements, tels que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

Le traitement dépend avant tout des facteurs suivants:

- ☞ Le type de tumeur.
- ☞ Le stade de la maladie
- ☞ L'âge et l'état de santé général.

La décision des modalités du traitement est une décision collégiale qui implique plusieurs spécialistes). (Isautier, 2012)

7.1. Chirurgie : souvent le premier traitement

L'opération chirurgicale est la forme la plus ancienne de traitement des cancers. C'est encore aujourd'hui bien souvent le premier traitement qui est proposé aux personnes chez qui un cancer a été diagnostiqué. Elle est utilisée dans environ 80 % des cas.

- ☞ **Le principe** : il est très simple ! Une fois la tumeur localisée, on vous opère pour la retirer.
- ☞ **L'objectif attendu** : éliminer la tumeur et les éventuelles cellules cancéreuses présentes à proximité de celle-ci. Plus la tumeur est petite, plus les chances de succès sont importantes. [3]

7.2. Radiothérapie : l'exposition à des rayons

La radiothérapie est l'un des traitements les plus fréquemment employés dans la prise en charge des cancers. Plus de la moitié des personnes atteintes d'un cancer reçoivent ce type de traitement.

- ☞ **Le principe** : il consiste à exposer les cellules cancéreuses à des rayons. Cette exposition provoque une transformation des cellules qui perdent alors leur faculté à se multiplier. Seule la zone où se trouve la tumeur est exposée aux rayons afin d'éviter au maximum que des cellules saines ne soient elles aussi touchées.
- ☞ **L'objectif** : là encore, il s'agit d'éliminer le plus possible de cellules cancéreuses. Comme la chimiothérapie, la radiothérapie peut être réalisée avant ou après une intervention chirurgicale.

Dans le premier cas, le but est de diminuer la taille de la tumeur afin d'augmenter les chances de retirer toutes les cellules cancéreuses au cours de l'opération. Dans le second cas, l'objectif est de détruire les éventuelles cellules cancéreuses restantes et ainsi de réduire les risques de récurrences. [3]

- **La radiothérapie est souvent associée à la chirurgie** : elle peut être pré, post ou per-opératoire.
 - ☞ **Pré-opératoire**, elle réduit le volume de la tumeur et facilite l'intervention chirurgicale.
 - ☞ **Post-opératoire**, elle complète l'intervention en détruisant les cellules qui auraient échappé à l'acte chirurgical.
 - ☞ **Per-opératoire**, elle consiste, au cours d'une intervention chirurgicale, à irradier directement la tumeur ou sa zone d'implantation après ablation de celle-ci. Cette modalité d'irradiation trouve son intérêt dans des tumeurs profondes, abdominales ou thoraciques. L'intervention chirurgicale autorise une bonne accessibilité à la tumeur, sans interposition des tissus sains. Certaines tumeurs bénéficient d'une radiothérapie par neutrons ou par protons (proton thérapie) délivrés par des cyclotrons. Ces rayonnements sont caractérisés par la précision de leurs faisceaux. Ils permettent ainsi de traiter certaines tumeurs de l'œil en préservant la vision, ou du tronc cérébral. [4]

7.3. Chimiothérapie : agir avec des médicaments

La chimiothérapie est un traitement reposant sur la prise d'une substance chimique.

- ☞ **Le principe** : vous donner un ou plusieurs médicaments actifs contre les cellules cancéreuses. De nombreux médicaments anticancéreux (on dit aussi anti-tumoraux) ont été mis au point, notamment depuis les années 70. Ces médicaments agissent soit en détruisant les cellules cancéreuses, soit en arrêtant leur multiplication. Certains d'entre eux sont plus actifs contre un type de cancer plutôt que d'autres.
- ☞ **L'objectif** : éliminer, où qu'elles se trouvent, les cellules cancéreuses présentes dans l'organisme. La chimiothérapie peut ainsi servir à réduire la taille d'une tumeur avant une opération chirurgicale, à limiter les risques de récurrences après l'intervention chirurgicale ou à traiter des localisations secondaires de la tumeur. [3]

7.4. Hormonothérapie : une action indirecte

Ce type de traitement repose, comme pour la chimiothérapie, sur la prise de médicaments.

- ☞ **Le principe** : certains cancers sont sensibles à l'action d'hormones naturellement produites par l'organisme. C'est fréquemment le cas pour les cancers du sein et de la prostate. Les cellules cancéreuses ont tendance à se multiplier plus vite en présence de ces hormones. L'idée est donc de bloquer la production ou l'activité de ces hormones.
- ☞ **L'objectif** : contrairement aux autres formes de traitement des cancers, l'hormonothérapie ne vise pas à détruire directement les cellules cancéreuses. Il s'agit

de vous donner des médicaments qui soit bloquent la production hormonale, soit s'opposent à son action. Cela permet ainsi de réduire la croissance des cellules cancéreuses. [3]

7.5. L'immunothérapie

Le but de ce traitement est de stimuler les défenses de l'organisme contre les cellules cancéreuses. Les mécanismes de défense immunitaire sont de mieux en mieux connus et on constate que les tumeurs entourées de nombreuses cellules immunitaires ont un meilleur pronostic. Malheureusement, un nombre trop important de cellules cancéreuses bloquent les mécanismes immunitaires. Une association de chimiothérapie et d'immunothérapie est donc nécessaire. [4]

7.6. les traitements de confort dits aussi soins de support

Ils constituent une part importante des traitements en apportant une meilleure qualité de vie: traitements de la douleur, des symptômes dus aussi bien à la maladie qu'aux thérapeutiques elles-mêmes, aides psychologiques et diététiques et ergothérapie de toutes sortes. Ils ne doivent pas faire oublier l'attention, l'écoute, la compréhension et le dialogue dont ont besoin ces patients. Guérir ou allonger la durée de la vie, mais aussi la rendre la plus confortable possible, doivent être les objectifs prioritaires des équipes cancérologiques. [4]

Tous ces traitements visent à éliminer les cellules cancéreuses. Ils agissent soit localement, c'est-à-dire uniquement sur les cellules cancéreuses d'un organe atteint, soit par voie générale, c'est-à-dire sur l'ensemble des cellules cancéreuses présentes dans l'organisme. Les thérapies ciblées sont sélectives et s'attaquent à une cible précise dans la cellule cancéreuse. La chirurgie et la radiothérapie sont des traitements dits locaux, la chimiothérapie et l'hormonothérapie des traitements dits généraux. [3]

II. Protéines kinase C

1. Généralités

A la fin des années 1970, une enzyme appelée Protéine Kinase C, a été découverte dans le cervelet des bovins. Il s'agit d'une sérine/thréonine Kinase recrutée principalement par le DAG membranaire suite à l'hydrolyse du PI (4,5) P₂.

Depuis, 11 isoformes distinctes de PKC ont été identifiées chez l'homme. Dans les cellules immunitaires notamment, les PKC sont impliquées dans la prolifération, la survie, l'apoptose, l'activation et la différenciation cellulaires. De plus, ces Kinases semblent impliquées dans le développement embryonnaire, la perception de la douleur, et le développement de la mémoire à long terme. (Leghmari, 2008)

2. Structure des PKC

La famille des PKC comprend au moins douze isozymes, similaires par leur domaine catalytique de sérine et thréonine kinase. Leur structure se caractérise par une région régulatrice N-terminale et une région catalytique C-terminale. (Bruno et Goms, 2003)

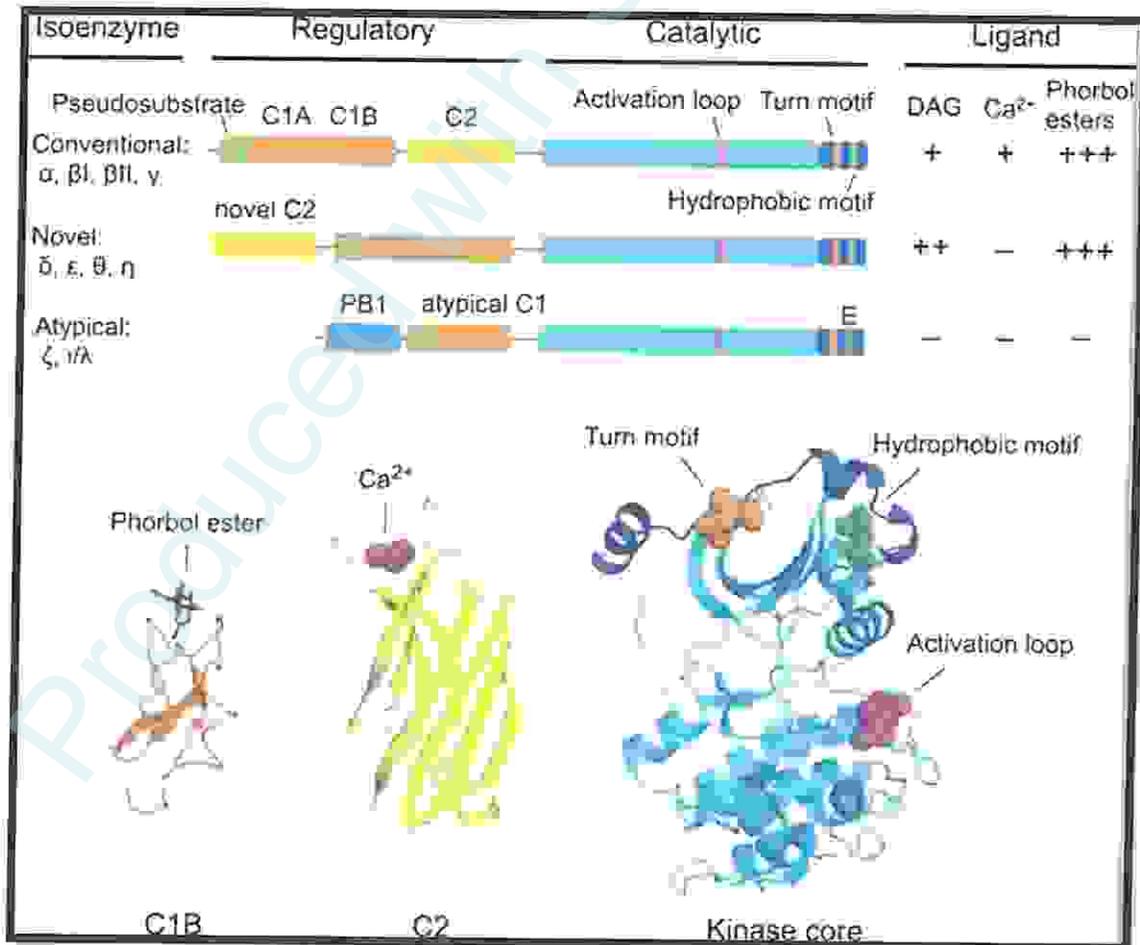


Figure 03 : Sous familles et structures des PKC. (Alyssa et al, 2013)

On a 12 isoformes de PKC connues, réparties en 3 classes :

- ☞ Les PKC classiques (α , β I, β II, et γ). Possèdent, au niveau de leur domaine C1,C2 motifs riches en cystéines permettant la liaison au diacylglycerole (DAG) et la localisation de la PKC au niveau des membranes. Elles possèdent également un domaine C2 pouvant lier le calcium.
- ☞ Les PKC nouvelles (δ , ϵ , η , θ), contiennent les compartiments C1 et C2 dans l'ordre inverse de celui des PKC classique cependant, le domaine C2 ne peut pas lier les ligands et n'est pas activé par le calcium.
- ☞ Les PKC atypiques (ζ , λ , μ et ι) possèdent un domaine C1 ne contenant qu'une séquence riche en cystéine et ne possèdent de domaine C2. Elles ont un domaine C4 plus court que les autres PKC et sont dépourvues d'un important site accepteur de phosphate. (Duquesnes, 2008 .. Brauer, 2007)

2.1. Le site pseudo-substrat

Il est situé en N-terminal du domaine C1 et mime la séquence « consensus substrat », mais avec substitution du résidu sérine/thréonine phosphorylable par une alanine. Ce site peut se lier au site de liaison du substrat du domaine catalytique et ainsi manifester un effet inhibiteur. La substitution de l'alanine par une sérine ou un glutamate mimant la charge négative supprime l'effet inhibiteur. (Ramani, 2008)

2.2. Le domaine C1, site de liaison du PMA

Le domaine C1 des cPKC et nPKC est le domaine de liaison du DAG et de ses analogues, les esters de phorbol. Il consiste en deux répétitions tandem de domaines « doigt de zinc » riches en cystéines, A et B, pour les cPKC et nPKC, et d'un seul domaine « doigt de zinc » riche en cystéines pour les aPKC. Bien que les deux domaines puissent potentiellement interagir avec la membrane et lier le DAG ou les esters de phorbol, en pratique seul l'un des deux se lie à ce second messenger. L'affinité pour les seconds messagers est variable en fonction des isoenzymes, et il peut y avoir activation préférentielle de certaines isoenzymes en fonction de l'amplitude du signal généré par l'activation cellulaire. De plus, le domaine C1 est impliqué dans le ciblage de la PKC dans les différents compartiments subcellulaires par interactions lipide-protéine ou protéine-protéine. Les aPKC se transloquent du cytoplasme au noyau, car elles présentent une séquence de localisation nucléaire et une séquence d'export nucléaire respectivement en N-terminal et en C-terminal de leur région C1. (Ramani, 2008)

2.3. Le domaine C2

C'est le site de liaison du calcium et des phospholipides des cPKC. Il lie deux à trois ions calcium qui induit des changements électrostatiques et conformationnels. Il permet la liaison à la phosphatidylsérine et peut pénétrer dans la membrane. L'affinité pour le calcium est variable en fonction des isoenzymes. Le domaine C2 des nPKC ne présente qu'une faible homologie avec celui des cPKC (15 %) et ne comprend pas de site de liaison du calcium. Cependant, il peut être régulé par phosphorylation, ce qui permet d'augmenter l'affinité de ce domaine pour les membranes, cette interaction s'établissant par des feuillets β . De plus, le domaine C2 intervient dans des interactions intramoléculaires, en particulier avec le domaine C1, sur lequel il aurait un effet inhibiteur qui serait levé par liaison avec le calcium.

Le domaine C2 intervient aussi de façon majeure dans l'ancrage de la PKC à différents sites sub-cellulaires. En effet, il comporte une séquence pseudo-RACK de 6 à 10 résidus qui régule négativement l'activation et la translocation de la PKC, en se liant de manière intramoléculaire au site de liaison des RACKs sur la protéine. De plus, le domaine C2 comprend des sites de liaison avec des protéines intracellulaires, comme l'actine, les lamines et l'annexine V. (Ramani, 2008)

2.4. La région V3

Elle sépare la région régulatrice de la région catalytique des PKC. Elle est très accessible au clivage protéolytique après activation de la PKC, qui, en séparant ces deux régions, la rend constitutivement active. (Ramani, 2008)

2.5. Le domaine catalytique et la région V5

Le domaine catalytique de la PKC est non seulement très conservé entre les différents isotypes, mais présente aussi une haute homologie avec d'autres classes de protéines-kinases, comme les PKA. Il comprend le domaine C3 qui est le site de liaison à l'ATP, et le site C4 qui est le site de liaison aux substrats phosphorylés par la kinase. Il comprend des sites de phosphorylation, l'*activation-loop*, le *turn motif* et le motif hydrophobe qui sont essentiels au procession, à la localisation et à l'activation de la kinase. Ces domaines phosphorylés forment un clamp intramoléculaire avec le lobe N-terminal de la kinase et ordonne la structure du domaine et la boucle d'activation voir figure 04. (Ramani, 2008)

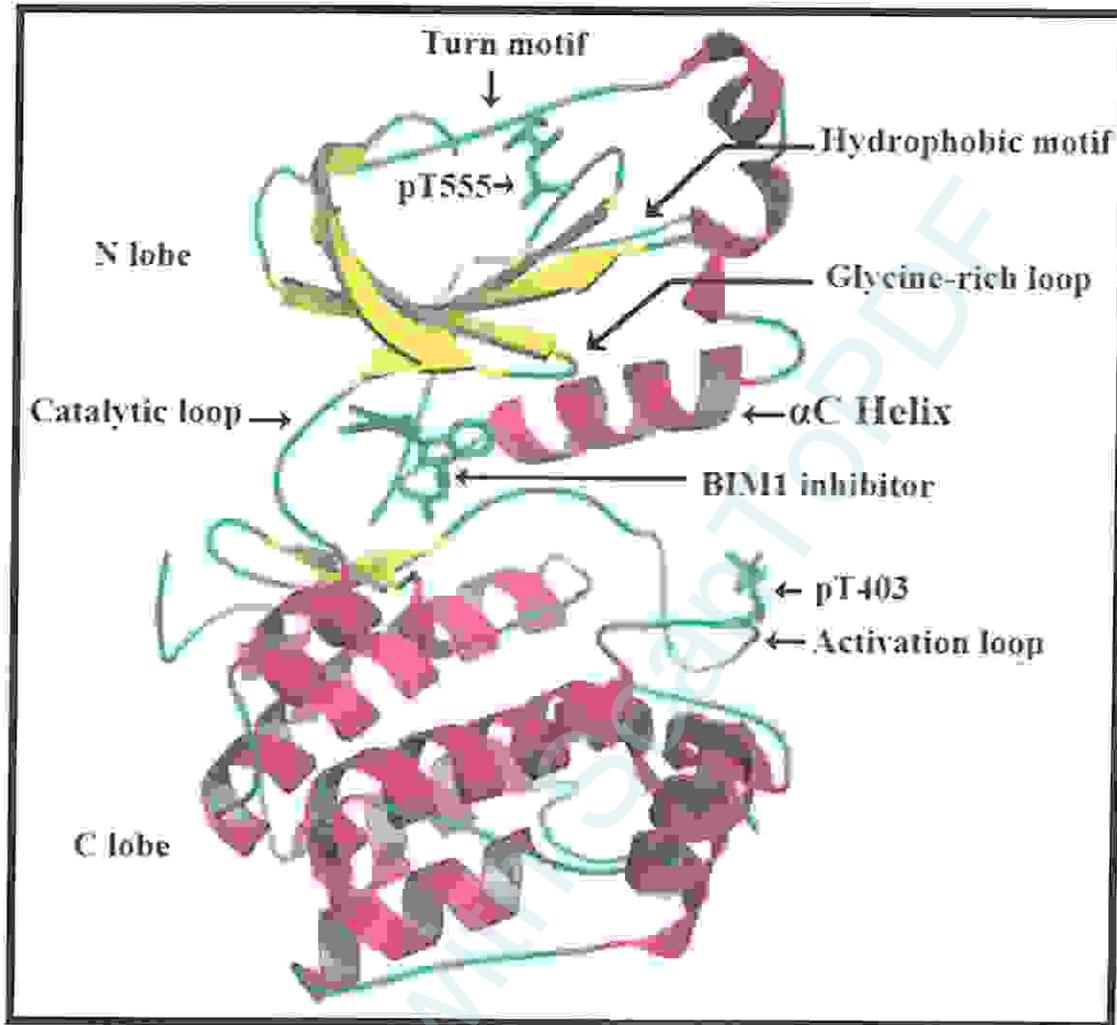


Figure 04: structure du domaine catalytique du PKC beta en complexe avec l'inhibiteur BIM1 selon le model cartoon (image générée par *Pymol*)

La région V5 participe à des interactions intramoléculaires, en particulier avec le domaine C2. Il présente des sites de phosphorylation, un site de liaison aux RACKs et un site de localisation nucléaire, en particulier pour l'isoforme δ .

Les PKC présentent un haut degré d'homologie au niveau du domaine catalytique voir figure 05. (Ramani, 2008)

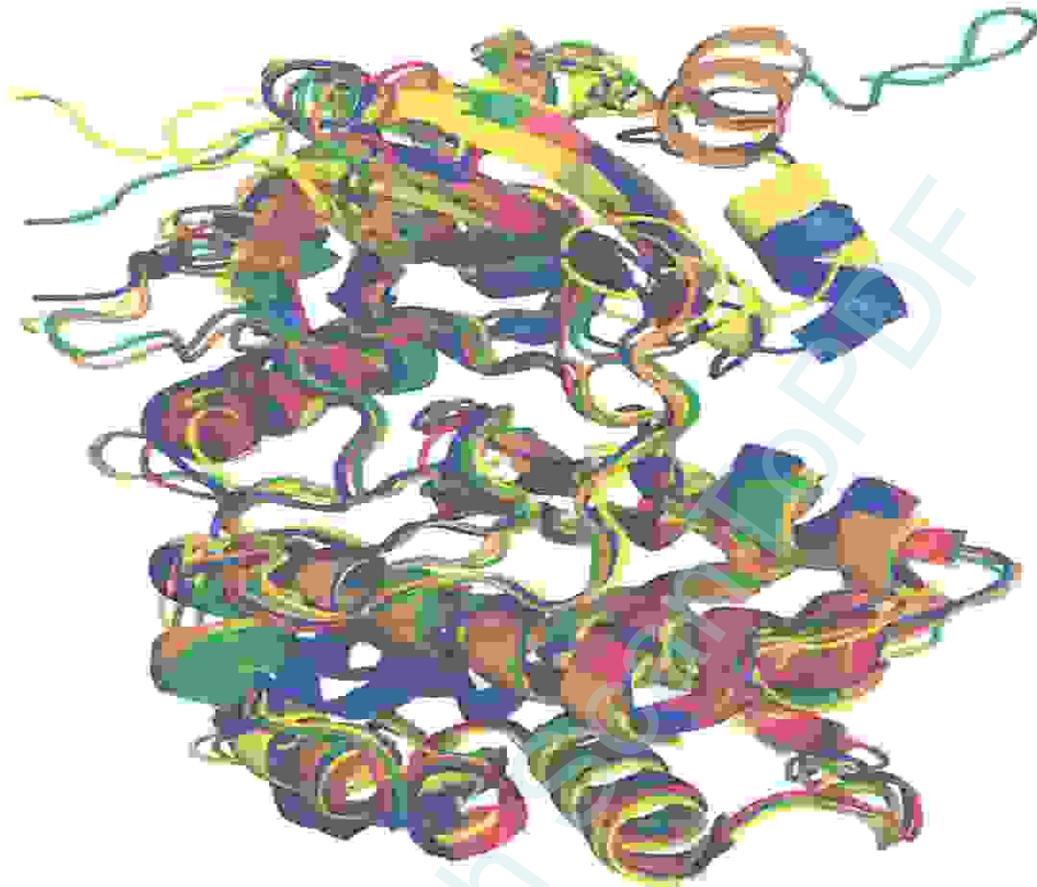


Figure 05 : Superposition des domaines catalytiques des enzymes PKC alpha (en vert), PKC delta (en rouge), PKC zeta (en jaune), PKC eta (en bleu) et PKC beta (en orange).

3. Distribution des PKC dans l'organisme

Les isoformes de PKC α , β_1 , β_2 et δ semblent être exprimées de façon ubiquitaire et sont retrouvées dans la plupart des tissus. L'expression de la PKC γ est restreinte au système nerveux central et à la moelle épinière. La PKC η est fortement exprimée au niveau de la peau et des poumons mais très faiblement dans la rate et le cerveau. La PKC θ est présente de façon prédominante dans le muscle squelettique et dans une moindre mesure dans le poumon, la rate, la peau et le cerveau. Enfin la PKC μ a été décrite dans de très nombreux tissus. Elle est très fortement exprimée dans le thymus et les poumons.

Cependant, la plupart des tissus est composée de divers types cellulaires. Ainsi au niveau du monocyte, 8 isoforme de PKC sont exprimées : α , β_1 , β_2 , δ , ϵ , η , μ et θ . La présence des isoformes de PKC semble aussi évoluer en fonction de la différenciation des monocytes en macrophage. (Leghmari, 2008)

4. Vers de nouvelles cibles thérapeutiques: la voie de signalisation PKC

Les fonctions cellulaires sont contrôlées par des protéines de signalisation, localisées à proximité ou dans la membrane plasmique. La plupart des mécanismes de régulation intracellulaires impliquent des processus de phosphorylation/déphosphorylation par les kinases et les phosphatases. Des progrès existent dans la compréhension des processus moléculaires et génétiques impliqués dans les voies de signalisation intracellulaires qui régulent les différentes activités cellulaires, en particulier la prolifération et la survie. La plupart de ces voies semblent perturbées dans les cellules tumorales. Se développe alors la notion de thérapies ciblées ou « targeted therapy ». Ces thérapeutiques anti-cancéreuses plus ciblées sont basées sur la nécessité d'une transmission de signaux et d'une stimulation cellulaire constante par des facteurs de croissance pour maintenir l'homéostasie dans un organisme pluricellulaire. Schématiquement, on assiste à la fixation d'un facteur de croissance sur un récepteur transmembranaire spécifique qui va se dimériser et entraîner une phosphorylation de tyrosine kinases intracellulaires. Cette succession de phénomènes va conduire à la transmission du signal vers le noyau. Afin de diminuer l'action majeure de ces facteurs dans la croissance tumorale. (Bourotte, 2004., Richard, 2011., Cauvin, 2015)

4.1. La voie de signalisation intracellulaire de la PKC

Un stimulus externe (ligand) en se liant à son récepteur provoque à l'intérieur de la cellule une série d'événements qui vont conduire à une réponse cellulaire. Cette série d'événements définit la signalisation intracellulaire. En effet, le « message » du signal extracellulaire va être délivré « transduit » et amplifié à l'intérieur de la cellule, mettant en jeu diverses cascades de messagers intracellulaires. Ces effecteurs sont le plus souvent des protéines kinases, des enzymes capables de phosphoryler un substrat sur différents acides aminés, la tyrosine, la sérine, ou la thréonine, entraînant ainsi une modification de sa conformation qui va modifier l'activité de ce substrat (activation, inhibition). Cette cascade biochimique induit des réponses cellulaires variées, comme l'activation d'une enzyme, la régulation du cytosquelette, ou l'expression de gènes spécifiques. Ces mécanismes sont en retour régulés négativement par des protéines Phosphatases permettant l'arrêt du signal.

Les voies de signalisations sont rarement linéaires: il existe en effet des communications entre les différentes voies de signalisation « cross-talk » qui permet une régulation plus fine de la réponse cellulaire. A cette complexité s'ajoute encore le contexte cellulaire lui-même, puisque la réponse à un même stimulus peut varier en fonction du type cellulaire et de son

activité (expression de certains récepteurs, de régulateurs négatifs, par exemple). (Abraïl, 2013)

4.2. Activation des PKC et leur régulation

4.2.1. Activation par phosphorylation

L'activation des PKC requiert la phosphorylation du domaine catalytique dans la boucle d'activation, et le détachement du pseudo-substrat du site actif.

La PKC est synthétisé sous forme de précurseur inactif non phosphorylé, probablement lié au cytosquelette. A ce stade le site catalytique incompetent. Plus tard, la boucle d'activation est phosphorylé (Thr 500), probablement par une PDK1 (protéine kinase I phosphoinositide dépendante), une protéine kinase dépendante des phospholipides également impliquée dans l'activation de la protéine kinase B. Sans cette première phosphorylation, les PKC α et β ne sont pas active alors que d'autre kinase comme la PKC δ ne sont que peu active. Quant aux PKC atypique, le résidu thréonine est remplacé par un acide glutamique dont la charge négative mime la phosphorylation. S'en suivent 2 autophosphorylations (Thr 641, Ser 660) en C-terminal du domaine catalytique. La forme mature de PKC est maintenant catalytiquement compétente, mais resterait inactive à cause de l'opposition du pseudosubstrat et du domaine catalytique.

Des phosphorylations sur des tryosines peuvent aussi réguler positivement ou négativement l'activité des PKC δ et impliquerait les kinases c-Src ou c-Fyn dans les kératinocytes et les kinases Lyn dans des cellules leucémique. (Leghmari, 2008)

4.2.2. Activation par DAG

L'activation des PKC requiert la présence simultanée du DAG et du calcium. De manière générale, presque tous les ligands, les facteurs de croissance, les hormones et les neurotransmetteurs, induisent d'une façon ou d'une autre la production du DAG et de l'inositol triphosphate (IP₃). Ce qui voudrait dire que les PKC sont impliquée dans un grand nombre de réponses cellulaire.

L'hydrofobicité et la petite taille du DAG lui permettant de diffuser latéralement dans les membranes cellulaires de manière assez rapide. Cependant le DAG a une courte demi-vie, car il peut être dégradé par les DAG lipases (pour formé du glycérol ou des acides gras), ou converti en phosphatidate sous l'action des DAG kinases.

Le DAG membranaire lie le site hydrophobe du domaine C, ce qui permet à la PKC de se loger dans la membrane avec une forte affinité pour la PS. En effet en l'absence DAG, les PKC se fixent avec une faible affinité aux membranes anioniques sans discriminer les types de lipides auxquels elles se fixent. Le calcium qui se fixe au domaine C2 serait impliqué dans cette interaction. Ce recrutement membranaire des PKC entraîne un changement conformationnel au niveau du domaine catalytique, qui permet sa dissociation du pseudosubstrat auto-inhibiteur. La PKC est alors complètement active. (Leghmari, 2008)

4.2.3. Activation par d'autres lipides

Plusieurs lipides seconds messagers et médiateurs peuvent activer l'effet du DAG et calcium, ou activer directement les PKC. Les PKC non-classiques sont activées par de plus faibles concentrations en acides gras que les PKC classiques. Les 3-phosphoinositide 3-kinases PI(3,4) P₂ et PI (3, 4, 5) P₃ activent aussi bien les PKC non-classiques (δ, ϵ et θ), et atypiques (φ) dans un environnement riche en PS. Les acides gras insaturés, plus spécialement l'acide arachidonique, LPA et lysoPC, peuvent également activer les PKC. Ces lipides potentialisent les effets du DAG à des concentrations basales de calcium (100 nM). Les dérivés de sphingolipides inhibent les PKC conventionnels en masquant leur interaction avec les PS.

Les PKC atypiques ne sont pas activées par le DAG ou les ester de phorbol, mais sont activées par d'autres produits lipidiques, tels que PI (3, 4, 5) P₃, l'acide lysophosphatidique et les céramides. Seul la PKC γ peut être activé par une protéine LIP « lambda-PKC interaction protéine ». (Leghmari, 2008)

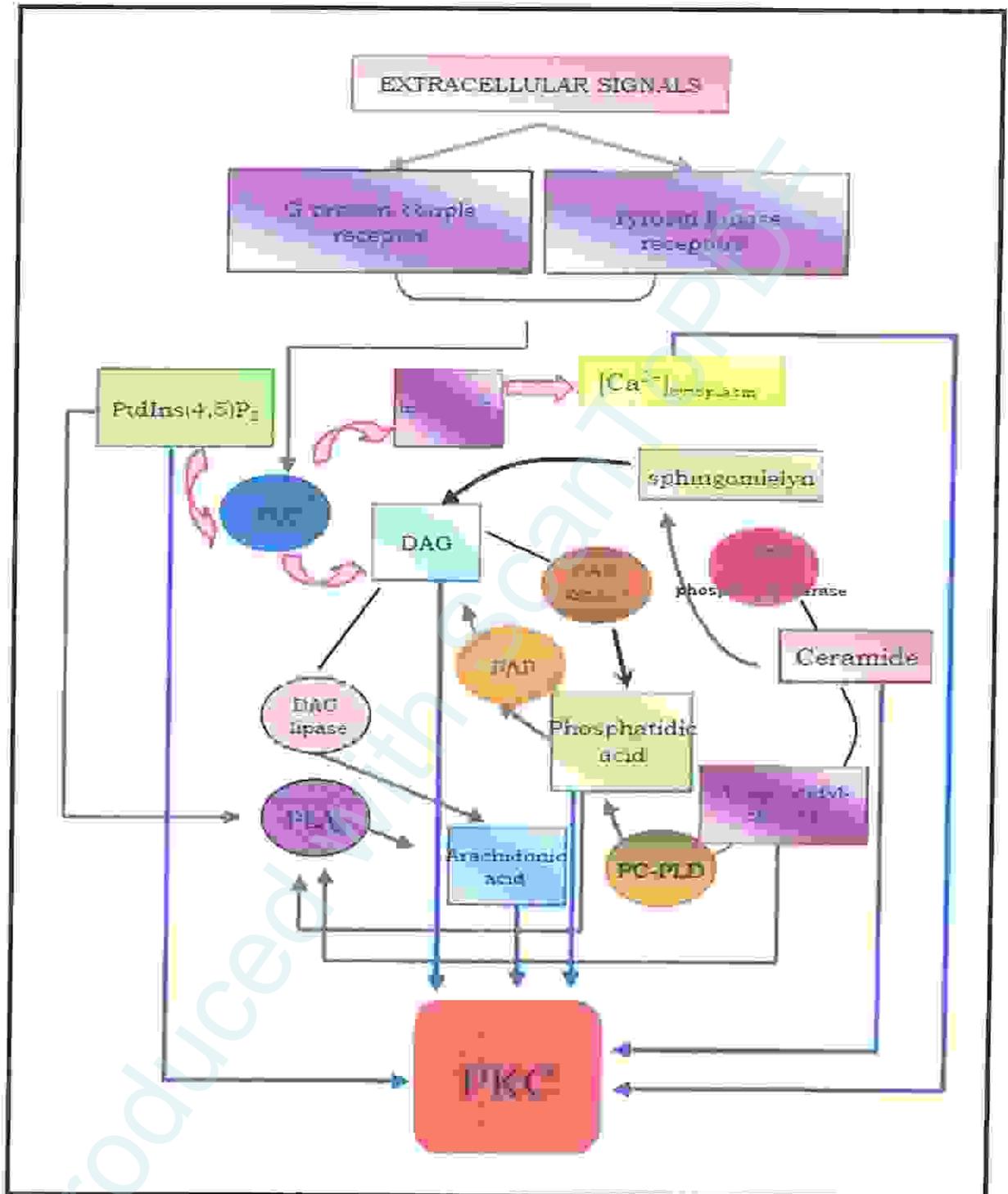


Figure 06 : Diagramme des différentes voies d'activation de la PKC. La voie PLC représentée par des flèches roses, les flèches bleues indiquent les activateurs de la PKC. (Bautista, 2007).

4.3. Les différentes voies métaboliques de la PKC

Différentes protéines qui participent dans la plupart des voies métaboliques intracellulaires sont phosphorylées par la PKC active. (Yang et Kazanietz, 2003)

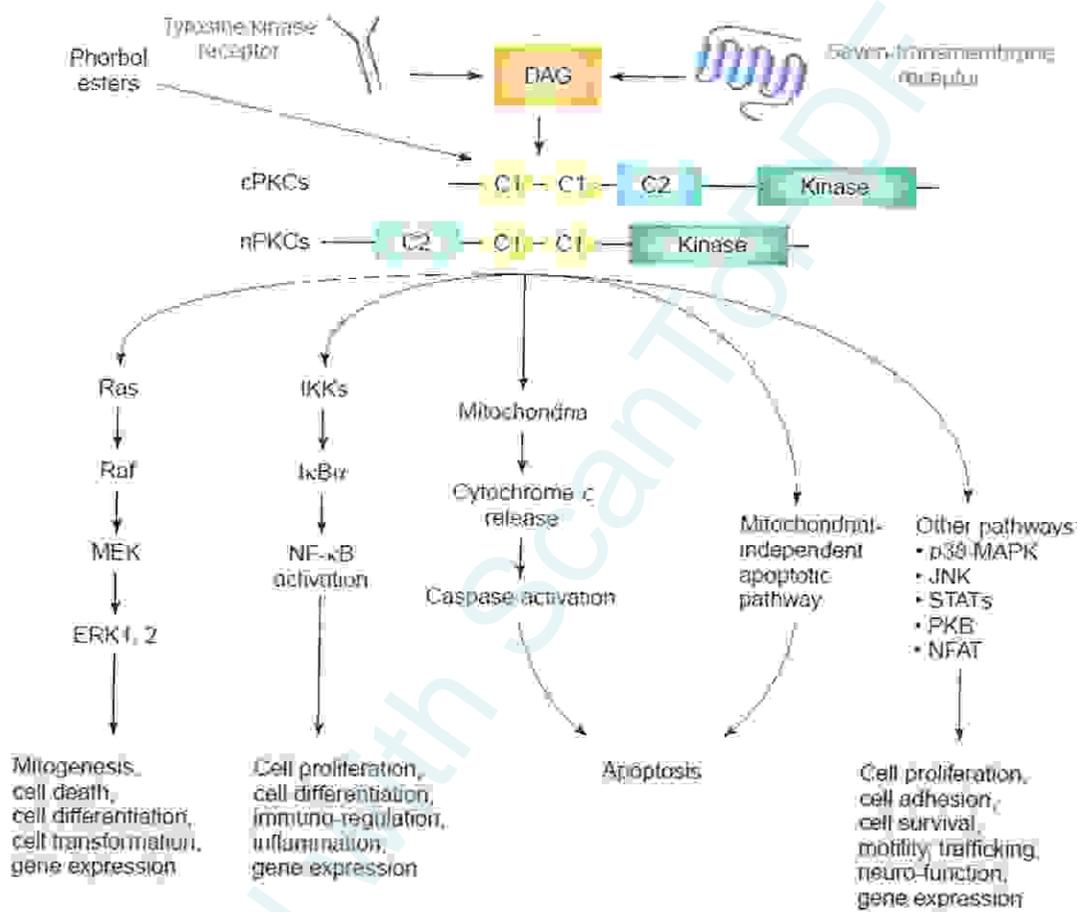


Figure07 : Diagramme des différents processus cellulaires qui fait intervenir les isoenzymes de la protéine Kinase C (PKC). (Yang et Kazanietz, 2003)

4.4. La protéine Kinase C (PKC) et l'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire, utilisée par les organismes pluricellulaires, qui a lieu naturellement et qui est considérée comme une partie du développement, du maintien et du renouvellement normal d'un tissu. Elle est définie comme une mort cellulaire programmée, impliquant le «suicide» des cellules en faveur du bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble. La PKC joue un rôle fondamental dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire et des études récentes suggèrent qu'il est également impliqué dans la régulation de la survie des cellules. Les premières approches à la définition du rôle de la PKC dans l'apoptose invoquent l'activation de PKC par phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA). Néanmoins, par l'utilisation de ces types d'approches, les enquêteurs ont clairement démontré

un rôle pour PKC dans la régulation de l'apoptose induite par les deux récepteurs de mort (de la voie extrinsèque), et en endommageant l'ADN des agents et des toxines cellulaires (voie intrinsèque). Dans certaines études, le PMA induit l'apoptose, ou sensibilise les cellules à récepteur de mort apoptose induite. (Reyland, 2007 ., Lamy, 2009)

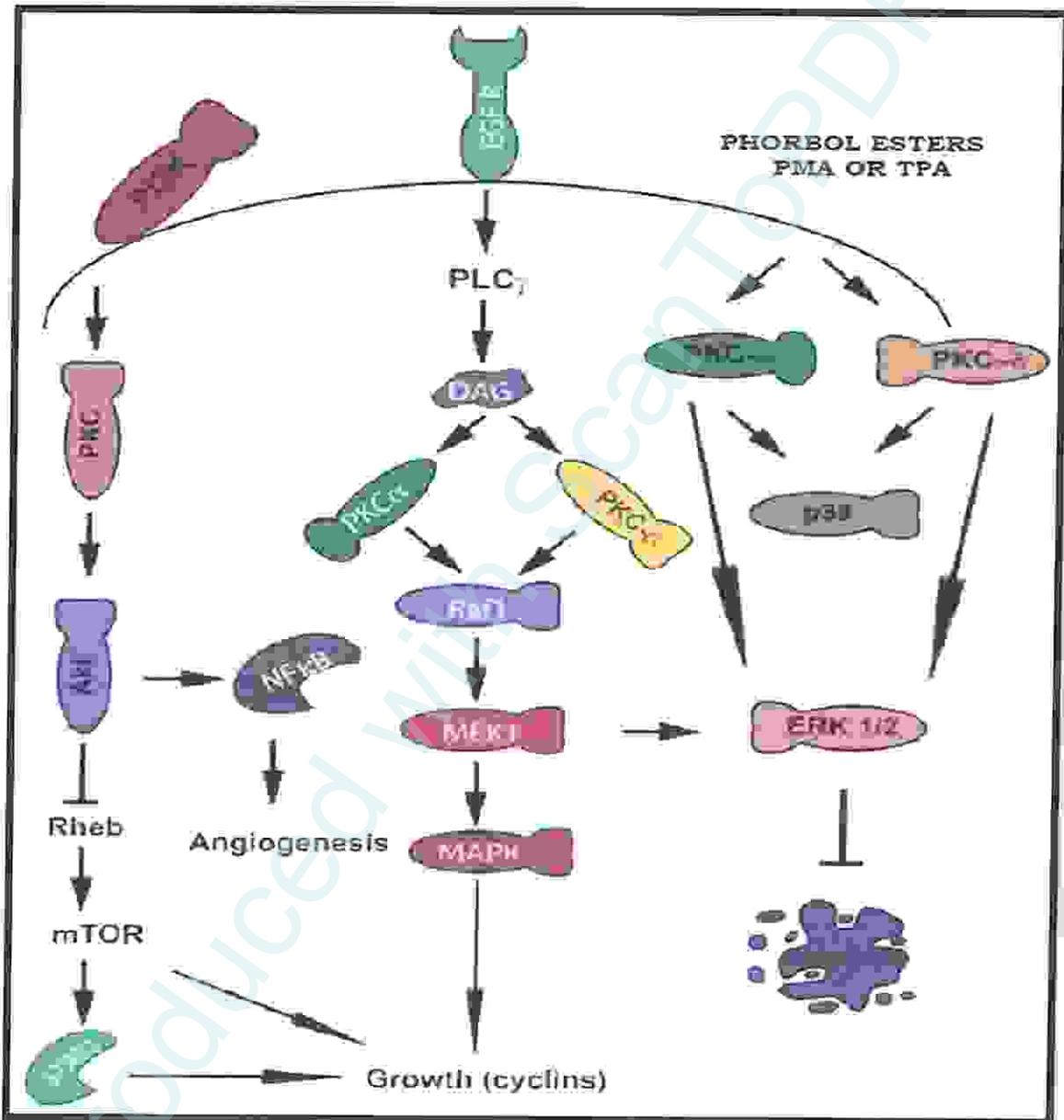


Figure08 : Rôle de la PKCalpha, PKCtota et PLC-DAG dans l'activation des voies ERK et PI3K_Akt. (Ashar et al, 2009)

Chapitre 02
Les flavonoïdes

Produced with ScanTOPDF

1. Les flavonoïdes

1.1. Définition

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Et jouent un rôle important dans la protection des plantes. Les flavonoïdes se trouvent également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant ces composés sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde entier. (Bouchama, Yezza, 2014)

1.2. Structure des flavonoïdes

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone qui fait de deux cycles phényles C₆, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Ce dernier est situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle centrale). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (Figure ci-dessous). La Distinction des sous-classes se fait sur la conformation de la structure centrale (cycle C). (Bouchama, Yezza, 2014)

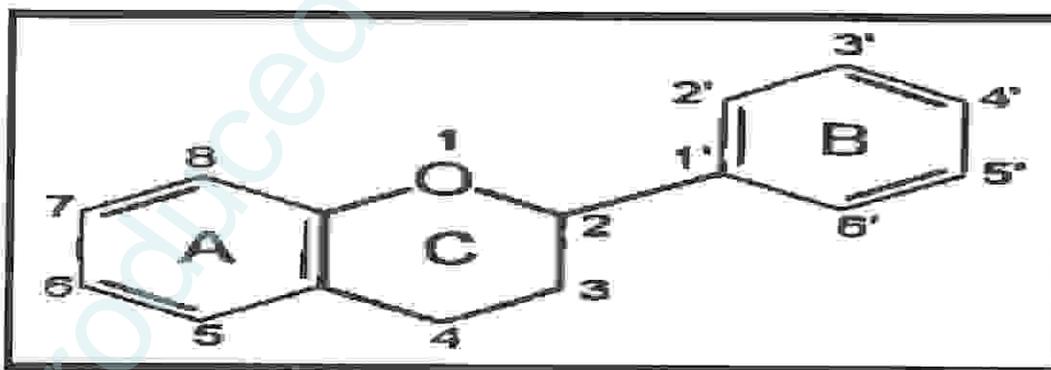


Figure 09 : Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003)

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C. (Bouchama, Yezza, 2014)

1.3. Biosynthèse des flavonoïdes

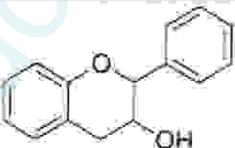
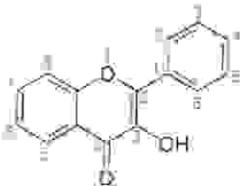
A l'origine, les flavonoïdes proviennent de la désamination d'un acide aminé essentiel, la phénylalanine. La réaction de désamination est catalysée par la phényl ammonia lyase (PAL) et conduit à la formation de cinnamate. Ce dernier est ensuite transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'enzyme cinnamate-4- hydroxylase (C4H) et la CoA-ligase (4CL). Cette réaction préliminaire précède la biosynthèse de tous les flavonoïdes. Le coumaroyl-CoA est ensuite transformé en chalcone en faisant intervenir le malonyl-CoA et la chalcone synthèse. Le motif chalcone est ainsi le point de départ de la synthèse des différents groupes de flavonoïdes. (Tigrine, 2014)

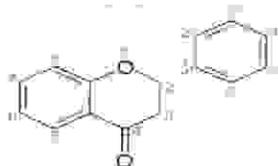
1.4. Classification des flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C, c'est-à-dire, la présence de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo. (Yao et al, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006)

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et aurones (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003), quelques classes sont cités dans le tableau 01.

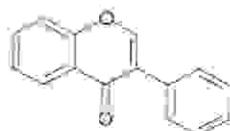
Tableau 01 : présente quelques classes distinctes des flavonoïdes (Bellebeir, 2008).

Classe	Formule	Source	Propriété
Flavanols		Raisins, thé, cacao.	-Antioxydants naturels -anticancéreuses
Flavonols		Oignon, pomme, brocoli, fruits rouges.	-antihistaminique, antiinflammatoire et antioxydante. -antihistaminique, antiinflammatoire et antioxydante. -Isorhamnétine: propriétés antioxydante.

Flavanones

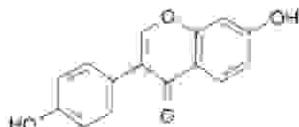
Les Agrumes : orange, citron, pamplemousse, mandarine, orange amère.

- neutralisation des radicaux lib.es.
- amélioration de l'absorption de la vitamine C.
- la prévention des cancers de la peau.

Isoflavones

soja.

- phytoestrogéniques.
- Source de phytoestrogènes.

Anthocyanes

Myrtille, mûre, raisin noir, aubergine, prune...

- la lutte contre le vieillissement cellulaire en améliorant l'élasticité et la densité de la peau.
- Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes.
- antiseptiques urinaires.

1.5. Propriétés des flavonoïdes

Parmi les nombreuses propriétés biologiques des flavonoïdes, nous nous intéressons dans ce travail à leurs propriétés anticancéreuses notamment. (Teniou, 2012)

1.5.1. Propriétés anticancéreuses des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont utilisés pour leur capacité à inhiber l'allergie, l'inflammation, les viroses, la cancérogénèse. Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer. (Lagarde, 2001 .., Zeghad, 2009)

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains.

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement ; lutéoline, quercétine, Kamphérol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. (Zeghad, 2009)

Tableau 02 : la relation entre la consommation de flavonoïdes et le cancer. (Hadj Salim, 2009)

Flavonoïdes ou source de flavonoïdes	Effets des flavonoïdes sur le cancer
Flavanones, flavanols, flavones, flavonols, Anthocyanidins, isoflavones.	Les flavones diminuent le risque de cancer du sein.
Flavones, isoflavones.	Réduction de la mortalité pour les malades du sien post ménopausique
Flavonoïdes	Diminution du risque de cancer dans tous les sites combinés.
Quercétine (oignons, raisin blanc),	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Diminution des incidences du cancer du poumon. ❖ Diminution de la répartition du cancer du poumon.
Myricétine	Diminution du risque de cancer de la prostate.
Kamphérol, Quercétin	Diminution du risque de cancer de l'estomac.
Catéchine	Diminution des incidences du cancer du rectum.

1.5.2. Mécanisme d'action anticancéreuse des flavonoïdes

Un agent chimiopréventif ou anticancéreux efficace et acceptable doit répondre à différentes propriétés :

- ☞ Ne pas avoir d'effets toxiques pour les cellules normales et saines.
- ☞ Avoir une haute efficacité contre de multiples cancers.
- ☞ Sa consommation orale doit être possible.
- ☞ Ses mécanismes d'actions sont connus.

- ☞ Son coût est faible.
- ☞ Il est accepté par la population.

Les vitamines A, C, E, bêta-carotène, flavonoïdes et autres constituants des fruits et légumes pourraient être ces agents chimiopréventifs.

Les flavonoïdes peuvent agir comme des bloqueurs de l'activation métabolique des pro-carcinogènes en carcinogènes, dans ce cas ils permettent une détoxification et/ou une élimination des carcinogènes. (Tabart, 2011., Morel, 2011)

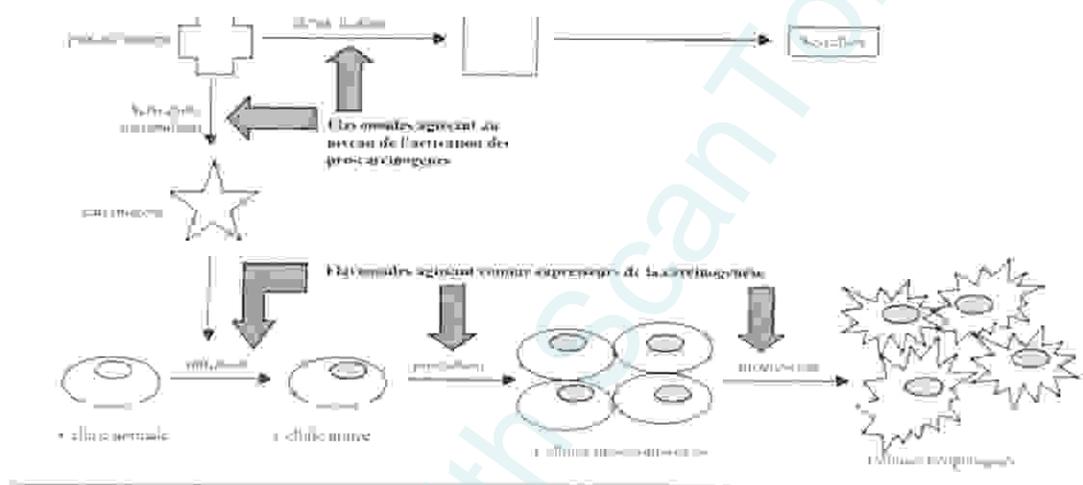


Figure 10 : Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogenèse (Morel, 2011).

L'effet bénéfique des flavonoïdes dans la thérapie contre les cancers serait lié à leur capacité à agir comme antioxydant grâce à leur capacité de réduction des ERO endogènes. Mais, en tant que pro-oxydant, ils interviendraient également dans la fragmentation apoptotique des cellules. Ces effets peuvent être expliqués par différents mécanismes.

- ☞ Ils pourraient agir comme agents bloquant les étapes d'initiation. Ils influencent le métabolisme des pro-carcinogènes en modulant l'activité du Cytochrome P450 impliqué dans leur activation en tant que carcinogènes. Ils peuvent limiter la formation des cellules initiateurs en stimulant la réparation de l'ADN.
- ☞ Ils pourraient supprimer les agents carcinogènes et inhiber la formation et la croissance des tumeurs en inhibant la prolifération cellulaire. Ils peuvent affecter les voies de signalisation de croissance en inhibant l'activité de la protéine-kinase C, en inhibant l'expression des oncogènes et l'activité de l'ornithine décarboxylase, enzyme clé de la synthèse des polyamines associées à la prolifération cellulaire et ils peuvent inhiber cette prolifération en affectant le métabolisme de l'acide arachidonique.

- ☛ Ils pourraient induire l'apoptose des cellules tumorales, la protection contre les dommages oxydatifs sur l'ADN, l'inhibition de l'activation des carcinogènes, et l'activation des systèmes de détoxification. (Tabart, 2011)

Produced with ScanTOPDF

Chapitre 03
Docking Moléculaire

Produced with ScanTOPDF

1. Docking moléculaire

1.1. Définition

Le docking est une technique informatique qui permet de prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et les acides aminés composant la structure d'une protéine. Il se déroule en deux étapes distinctes : dans un premier temps une étape de positionnement du ligand dans le site choisi de la protéine, puis dans un second temps, une étape d'évaluation des interactions énergétiques potentielles entre le ligand et la protéine. Les méthodes utilisées pour ces deux étapes diffèrent en fonction du programme de docking utilisé. (François, 2014)

De façon générale, le but du docking est de prédire la structure du complexe formé par un ligand et son récepteur. Plus particulièrement, dans les travaux présentés ici, les ligands sont des petites molécules destinées à inhiber l'activité d'une protéine, qui constitue le récepteur.

Historiquement, les premiers outils de docking obéissaient au principe dit « lock-and key » (principe « clef-serrure ») selon lequel le ligand qui représente la clef, est complémentaire au niveau géométrique du site actif du récepteur, qui représente la serrure. (Elkaim, 2011)

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques. Connaître la façon dont les protéines interagissent avec d'autres entités biochimiques est une étape essentielle pour comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées. (Teniou, 2012)

1.2. Les différents types de docking moléculaire

Le docking moléculaire est l'étude *in silico* des différents mécanismes et interactions qui interviennent lorsque plusieurs structures moléculaires s'assemblent, l'objectif étant de parvenir à déterminer comment ces molécules vont s'agencer les unes par rapport aux autres. Il existe deux grands types de docking moléculaire : Le docking rigide consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système protéine-ligand en considérant que chacune des deux molécules conserve une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte. Cependant, il est tout à fait concevable que les structures de la protéine et du ligand soient modifiées durant le processus de docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités. On parle, dans ce cas, de docking flexible. A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus.

fréquemment cités sont respectivement : AutoDock, GOLD, FlexX, DOCK et ICM. (Mokrani, 2012., Teniou, 2012)

1.3. Les outils du docking moléculaire

Docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand). Le terme docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand ». (Mokrani, 2012)

1.3.1. Le récepteur

Les protéines sont de grosses molécules ou macromolécules qu'interviennent dans de nombreuses fonctions organiques. 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 accessibles gratuitement appelée la « protein data Bank » (PDB). (Airaault, 2007., Soufilalout, 2010)

1.3.2. Le(s) ligand(s)

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. Les structures des quatre molécules retenues pour le docking "Quercétine, silybinine, naringine, curcumine" les médicaments ont été choisis dans le Centre national de Biotechnologie Informations (NCBI). Ces molécules ont été téléchargées en format (SDF) et converti en format (PDB) l'aide de convertisseur Open Babel (<http://openbabel.org>). (Mokrani, 2012., Wei et Yan-Hua, 2013)

1.4. Principes de fonctionnement de docking

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. La partie de recherche doit

parcourir au mieux l'espace conformationnel pour trouver l'énergie minimale globale. En docking rigide il s'agit pour le programme d'explorer l'espace autour du récepteur en utilisant des mouvements de translation et de rotation. En docking flexible il faut ajouter les mouvements de torsion intramoléculaire. Plus le ligand comporte de points de flexibilité et plus l'espace conformationnel est grand, donc plus difficile à parcourir. Dans cette étude deux approches différentes de recherche de la flexibilité du ligand ont été choisies : l'approche systématique et l'approche par algorithme génétique. (Bensgueni, 2007)

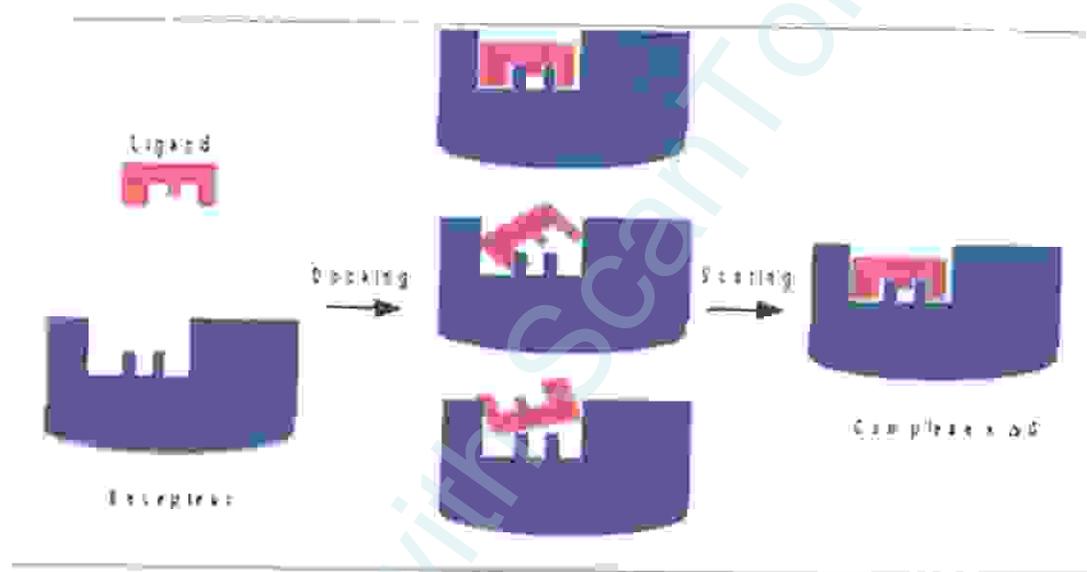


Figure 11 : Principe générale d'un programme de docking. (Bensgueni, 2007)

1.5. Algorithme de recherche

En principe, un docking peut être fait de façon « manuelle », directement par le modélisateur, en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine à l'aide d'une interface graphique. Ensuite, la géométrie de l'ensemble est optimisée de manière à corriger les problèmes stériques et obtenir un complexe énergétiquement stable. Cette approche est appliquée quand on a une idée précise du mode d'interaction réel du ligand. Néanmoins, le plus souvent, le mode d'interaction réel n'est pas connu. Dans ce cas, tester manuellement toutes les conformations et orientations des ligands s'avère impossible d'un point de vue pratique, même en considérant la protéine comme un corps rigide. Pour contourner cette difficulté, les algorithmes de docking ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association protéine-ligand les plus favorables.

Les algorithmes de docking peuvent être séparés en deux grandes classes : ceux qui ne tiennent pas compte de la flexibilité de la protéine, en traitant celle-ci comme un corps rigide, et ceux qui sont capables de prendre en compte, partiellement la flexibilité du récepteur. (Lalout, 2016).

2. Programme de GOLD

Le programme GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) est l'un des programmes de docking les plus réussis et largement utilisé, provient d'une collaboration entre l'Université de Sheffield, GlaxoSmithKline plc et CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*). Il est basé sur trois parties majeures : un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de modes de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison. (Verdonk, et al., 2003)

2.1. Algorithme de Gold :

GOLD utilise un algorithme génétique pour le docking de petites molécules (ligand) dans le site actif d'une protéine. Il considère le ligand comme flexible alors que la protéine est maintenue fixe sauf pour les groupements hydroxyles de certains résidus à savoir Tyrosine, Serine et Thréonine. (Reddy, 2007)

L'algorithme génétique est basé sur le principe de la sélection naturelle, développé par *Charles Darwin* en 1838. Les algorithmes génétiques fonctionnent par une génération successive d'individus ou structures du ligand. Chaque individu possède des gènes se sont ses caractéristiques. La méthode comporte trois phases :

- ☞ **La phase de reproduction** : vise à identifier les individus pouvant donner une autre génération. Pour la première génération les éléments sont créés au hasard pour éviter la dépendance vis-à-vis de la structure de départ. Pour les générations suivantes elles sont composées des meilleurs éléments de la génération précédente sélectionnés par une fonction d'évaluation. Dans notre cas il s'agit souvent d'une fonction basée sur la Fitness.
- ☞ **la phase de crossover** : les gènes des individus sélectionnés sont échangés 2 à 2 pour créer la nouvelle génération, le lieu de croisement est déterminé au hasard.
- ☞ **La troisième étape est la mutation** : certains individus peuvent être le résultat de mutations où un gène est modifié de façon aléatoire. Le cycle de génération est répété jusqu'à ce que soit atteint le nombre maximum de générations ou le nombre maximum d'évaluations de l'énergie. (Bensegueni, 2007)

2.2. Le mécanisme du placement du ligand dans le site actif

GOLD utilise une méthode unique pour ce faire, qui est fondée sur les points de fixation, il ajoute des points de fixation aux groupements de liaisons hydrogènes sur la protéine et le ligand, puis il va cartographier les points accepteurs qui se trouvent dans le ligand sur les points donateurs dans la protéine et vice versa. En outre, GOLD génère des points de fixation hydrophobiques dans la cavité de la protéine sur laquelle les groupements CH du ligand sont mappés. (Korb et Cole, 2010)

2.3. La fonction de score

GOLD utilise différentes fonctions de score pour le processus d'optimisation : **GoldScore** (une fonction de score basée sur le champ de force), **ChemScore**, **ASP** (Astex Statistical Potential), **CHEM PLP** (Piecewise Linear Potential) et **User Defined Score**. Cependant, Goldscore est la fonction originale pour GOLD, issue des travaux de Willet. Cette fonction est la somme de quatre éléments :

$$GOLD\ Fitness = Shb_ext + Svdw_ext + Shb_int + Svdw_int$$

- ☞ *Shb_ext* est l'énergie de liaison hydrogène entre le récepteur et le ligand.
- ☞ *Svdw_ext* est l'énergie des forces de Van der Waals (vdw) entre le récepteur et le ligand.
- ☞ *Shb_int* est l'énergie de liaison hydrogène interne du ligand.
- ☞ *Svdw_int* est le résultat de la contrainte intramoléculaire dans le ligand.

Les méthodes de « *scoring* » permettent d'évaluer l'énergie de liaison du complexe formé et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra d'une part de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées, mais également de classer la meilleure pose de différents ligands pour identifier les meilleurs d'entre eux. Dans les programmes de docking, on trouve différents types de fonction de score : celles utilisant un champ de force de mécanique moléculaire, celles reposant sur les connaissances actuelles et les méthodes empiriques. (Jones, 1997)

Chapitre 04

Matériel et méthodes

Produced with ScanTOPDF

L. Matériel

L. Microordinateur

Dans notre étude, nous avons utilisé une station puissante (processeur Intel Core I7 2.8 GHz, 8 Go de RAM, plateforme : Windows7). Les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7 (64bits).

2. Programmes

2.1. PyMOL

PyMOL est un logiciel de visualisation moléculaire, créé par Warren Delano. En plus d'offrir de nombreuses possibilités de rendus en 3D, le logiciel PyMOL permet de réaliser des animations, des alignements de structure, de générer des structures...etc , Il est l'un des outils le plus utilisé dans la publication scientifique. Il s'agit d'un logiciel libre et gratuit. (Jérôme, 2014)

La fenêtre inférieure contient également " la fenêtre de visualisation." Ce contiendra une liste des objets moléculaires une fois que tu as chargé une structure de protéine. C'est dans cette fenêtre que la majorité du travail s'effectue. Elle permet de visualiser les différents Objets, de modifier les styles de visualisation, de réaliser des sélections, La partie principale de L'écran sert à visualiser les molécules chargées voir figure 12. (Warren et al, 2004)

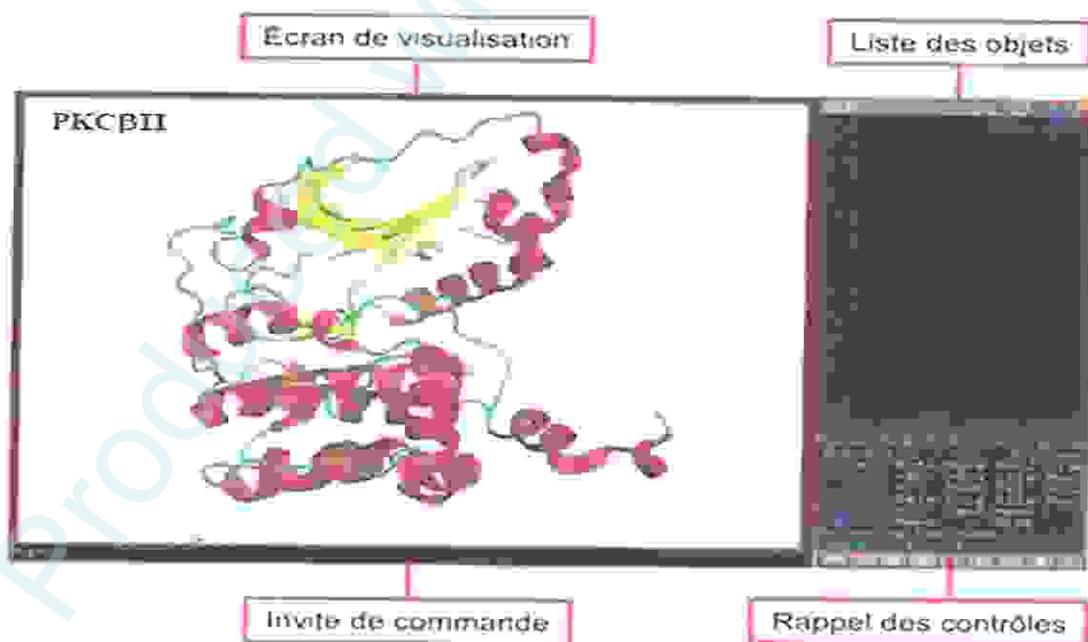


Figure 12 : La fenêtre de visualisation.

2.2.GOLD

GOLD est un programme de calcul des modes de docking de petites molécules dans les sites de liaison des protéines et est fourni dans le cadre de GOLD Suite, un ensemble de programmes pour la visualisation et la manipulation des structures (Hermes v 1.4), pour l'arrimage protéine-ligand (GOLD v 5.0.1) et pour le traitement et la visualisation des résultats de docking (GoldMine v 1.3).

Ses principaux avantages sont sa fiabilité à prédire des structures cristallographiques pour des complexes de type protéine-ligand et l'emploi d'un algorithme génétique efficace. De plus, le logiciel dispose d'une interface graphique simple d'emploi, et aisément scriptable et s'adapte particulièrement bien aux environnements de calcul parallèle. (Anonyme, 2016)

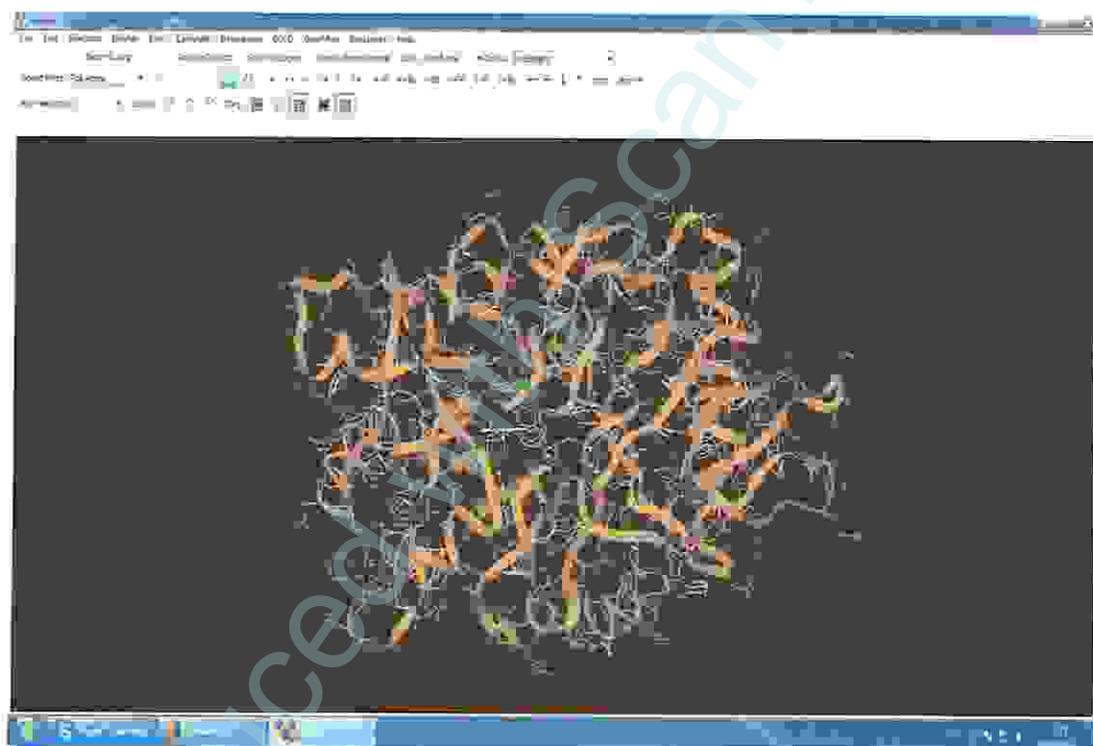


Figure 13 : L'interface graphique du GOLD.

2.2.1. Hermes :

Hermes est un programme permettant de visualiser la structure des protéines en trois dimensions. Ses caractéristiques comprennent:

- La capacité de lire les structures des protéines et de ligand à partir de fichiers externes.
- Une gamme d'options de visualisation 3D, y compris le choix des modèles d'affichage, les couleurs, la capacité de cacher et puis afficher à nouveau les atomes, les résidus, les ligands, les molécules d'eau, etc.
- ☞ La capacité de mesurer et afficher les distances, les angles et les angles de torsion.

- ☞ La capacité de trouver et montrer les liaisons hydrogène.
- ☞ La possibilité d'enregistrer les fichiers.
- ☞ La possibilité de modifier les ligands.
- ☞ La possibilité de charger et de visualiser les surfaces confournées. (Anonyme, 2016)

3. Les banques de données

3.1. La banque des données protéiques (PDB)

La banque de données protéiques (Protein Data Bank) est la principale source de données de biologie structurale et permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont principalement déterminées par les deux méthodes la cristallographie à rayons X et la RMN. Les structuralistes du monde entier sont tenus d'y déposer leurs données expérimentales, de cette façon elles appartiennent au domaine public.



Figure 14 : L'interface graphique du site web de la base de données PDB.

3.2. Pubchem

Pubchem est une banque de données américaine de molécules chimiques gérée par le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), branche de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis sous l'autorité de la *National Institutes of Health* (NIH).

PubChem répertoire plusieurs millions de composés en mettant en ligne, gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres chimique, biochimique, Pharmacologique, production, toxicologie.

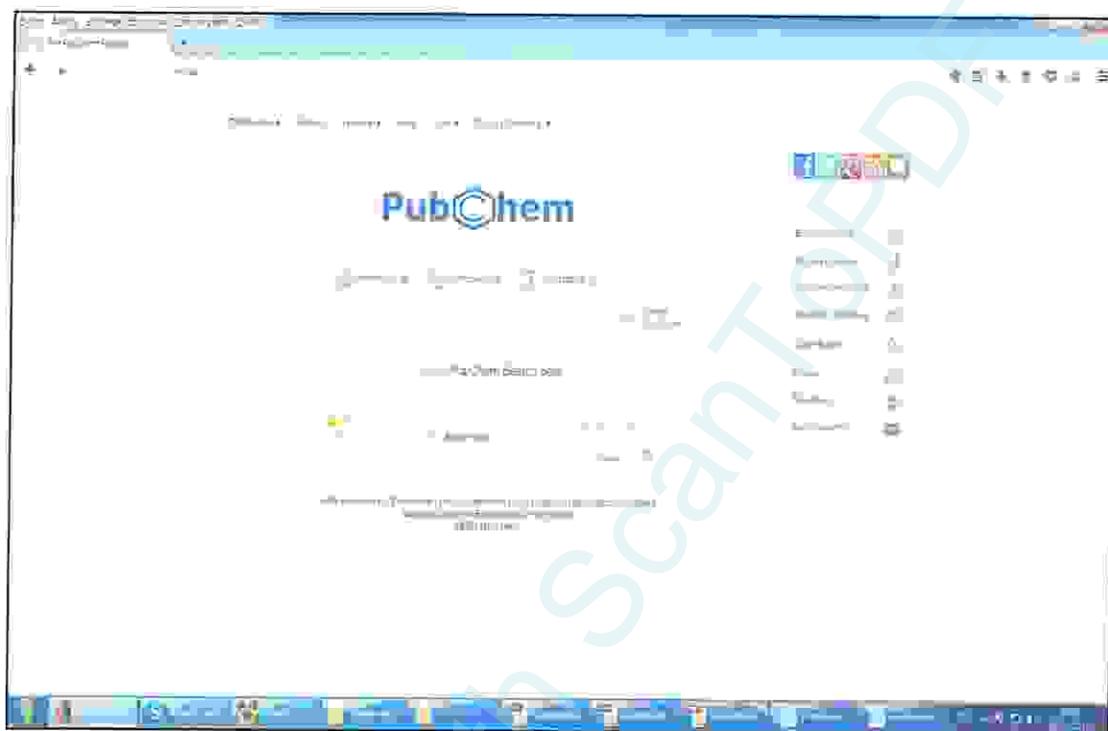


Figure 15 : L'interface graphique du site web de la base de données Pubchem.

4. Structure des protéines kinase C utilisées

On a 29 structures tridimensionnelles pour la protéine kinase C (*Homo sapiens*) disponibles sur la PDB, identifiées par les codes, 2WH0 2ELI 2ENJ 2ENN 2ENZ 2JED 2E73 2UZP 2I0E 1ZRZ 1YRK 2BIY 1WMH 1XJD 1KPA 1KPB 1KPC 5LIH 4RA4 5F9E 4RA5 4MJS 4Q9Z 3ZH8 4DNL 3TXO 3A8W 3A8X 3IW4.

Pour le docking, nous avons choisi parmi les 4 structures de Protéine kinase C étudiées celle portant le code PKC η car elle présente la meilleure résolution soit 2.05 Å.

Les caractéristiques de ces enzymes sont regroupées dans le tableau 3 ci-dessous :

Tableau 03 : les structures des Protéines kinase utilisées.

Code PDB	PKC	Organisme	Ligand co cristallisé	Résolution	Référence
3TXO	PKC η	<i>Homo sapiens</i>	Naphthyridine	2.05 Å	Van Eis <i>et al.</i> , 2011
2JED	PKC θ	<i>Homo sapiens</i>	NVP-XAA228	3.32 Å	Stark <i>et al.</i> , 2008
2I0E	PKC β II	<i>Homo sapiens</i>	Bisindolylmaleimide	2.60 Å	Grodsky <i>et Love.</i> , 2006
3IW4	PKC α	<i>Homo sapiens</i>	NVP-AEB071	2.80 Å	Wagner <i>et al.</i> , 2009

II. Méthodes

1. Les étapes de docking

1.1. Préparation des molécules à l'arrimage

Le complexe protéine-ligand est téléchargé dans le format *.pdb* à partir de la banque de données en introduisant son code pdb.

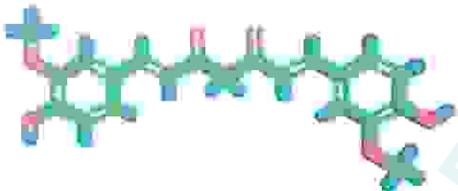
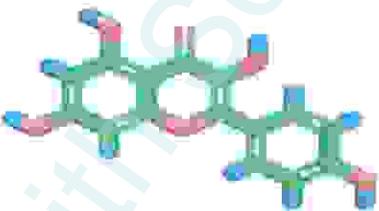
GOLD utilise directement le format *.pdb* et n'a pas besoin d'une préparation préalable.

1.2. Préparation des ligands

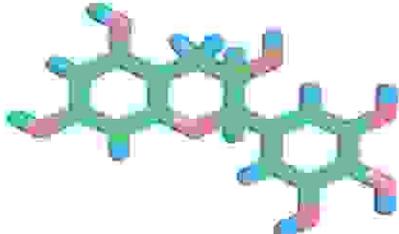
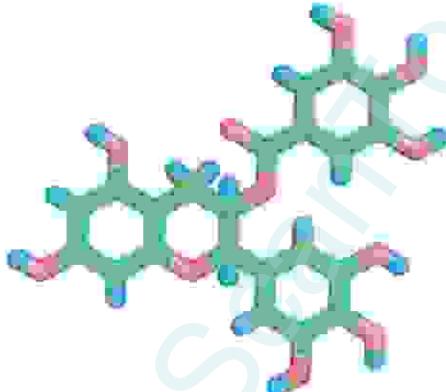
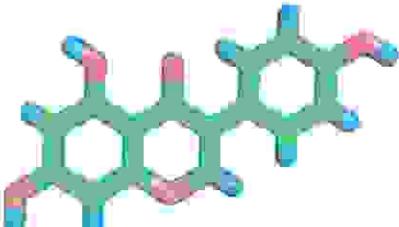
Les structures des 15 molécules retenues pour le docking, la quercétine, le kaempférol, la myricétine, Lisorhamnétine, l'apigénine, la lutéoline, la chrysine, la catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine, l'épicatéchine gallate, l'épigallocalatéchine, l'épigallocalatéchine gallate, la naringénine, curcumine, ont été téléchargées de la base de données PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) du National Center for Biotechnology Information, sous format SDF 2D.

Les structures ont été converties au format 3D par LigPrep. Elles sont ensuite transformées dans le format *.mol2* par l'intermédiaire du programme disponible gratuitement *mol2mol*. Toutes les structures chimiques des composés ligands utilisés dans l'étude ont montré sur Le tableau 04 :

Tableau 04 : représentation des structures 2D et les formules des flavonoïdes.

Nom des flavonoïdes	Structures 2D	Formules
Curcumine		C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Quercétine		C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Kaempférol		C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Myricétine		C ₁₅ H ₁₀ O ₈
Isorhamnétine		C ₁₆ H ₁₂ O ₇

Apigénine		$C_{15}H_{10}O_5$
Lutéoline		$C_{15}H_{10}O_6$
Catéchine		$C_{15}H_{14}O_6$
Epicatéchine		$C_{15}H_{14}O_6$
Gallocatéchine		$C_{15}H_{14}O_7$
Lépicatéchine gallate		$C_{22}H_{18}O_{10}$

Epigallocatechine		$C_{15}H_{14}O_7$
Epigallocatechine gallate		$C_{22}H_{18}O_{11}$
Silybinine		$C_{25}H_{22}O_{10}$
Génistéine		$C_{15}H_{10}O_5$

2. Les différentes étapes de docking

Après l'ouverture du visualiseur *Hermes*. On ouvre la fenêtre *GOLD setup wizard*, en cliquant sur *Wizard*. Le complexe *enzyme-ligand.pdb* sera téléchargé, en cliquant sur le bouton *Load Protein*.

Les étapes suivantes sont nécessaires :

2.1. Addition des hydrogènes

Tous les atomes d'hydrogène doivent être présents dans le fichier d'entrée des protéines.

2.2. Suppression des molécules d'eau

Les molécules d'eau dans les cavités des protéines peuvent parfois être un élément fondamental. Elles sont capables d'assurer le relais entre le récepteur et le ligand et ainsi créer des réseaux de liaisons hydrogène. Dans nos études, nous n'avons pas mis en évidence l'intérêt d'introduire des molécules d'eau. Un clic sur l'option *Delete Remaining Waters* permet l'élimination des molécules d'eau.

2.3. Suppression des ligands

Le fichier protéine peut avoir un ou plusieurs ligands occupant le site de liaison qui doit être enlevé avant de pouvoir effectuer un docking. En cliquant sur *Delete Ligands* de la liste des options proposées, puis sur le bouton *Extract*.

Le ligand extrait est enlevé du fichier de la protéine et automatiquement rechargé dans *Hermes* de sorte qu'il puisse être employé pour définir le site de liaison. Le ligand est sauvegardé sous forme *ligand.mol2*.

2.4. Définition de site de liaison

Il est nécessaire de préciser le site de liaison de l'enzyme, en cliquant sur *Define Binding Site* de la liste *Global Options* puis choisir l'option *One or more ligands*. Une liste de ces ligands actuellement chargés dans le visualiseur *Hermes* sera montrée. Choisissez le ligand de référence que vous souhaitez utiliser à partir de cette liste.

2.5. La sélection du Ligand

Pour sélectionner le ligand, appuyer sur *Add*. Choisir *ligand.mol2* puis cliquer sur *Open*. Le *ligand.mol2* sera inscrit au *Ligand File*.

2.6. La fonction de score

La fonction *Goldscore* est utilisée dans le cadre du docking, pour l'évaluation de l'énergie des systèmes protéine-ligand.

2.7. Run GOLD

Avant de terminer la mise en place de notre arrimage, cliquer sur l'option *Advanced*, sélectionner *Output Options*. Cette page est séparée en trois vues

tabulées : *File Format Options*, *Information in File* et *Selecting Solutions*, permettent de contrôler les informations des fichiers de sortie.

Enfin, le choix de l'option *Run GOLD* dans le menu permet de lancer les calculs. Une fois le travail terminé, le message *Finished Docking Ligand* apparaîtra dans la fenêtre *Run GOLD*. Les résultats de docking sont présentés sous forme de 5 fichiers de sortie, pouvant être observés dans la fenêtre *Run GOLD*:

- Les fichiers contenant des informations sur la protéine et le ligand initialisé (*gold_protein.mol2* et *gold_ligand.mol2*) ;
- Les fichiers contenant le ligand docké (*gold_soln_ligand_m1_n.mol2*) ;
- Les fichiers contenant le score de Fitness (*ligand_m1.rnk* et *bestranking.lst*) : les tentatives d'amarrage sont énumérées selon le score de Fitness. Donc, la meilleure solution est placée en premier ;
- Les fichiers log des protéines et de ligand (*gold_protein.log* et *gold_ligand_m1.log*).
- ☞ Les fichiers contenant les messages d'erreur (*gold.err*).

2. Filtrage selon la règle de 5 de lipinski « 1997 »

En 1997, Lipinski a défini un ensemble de propriétés physico-chimiques permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure 2D. Selon cette règle, un composé possède toutes les chances d'être biodisponible oralement s'il respecte au moins 3 des 5 critères suivants :

- ☞ Ne possède pas plus de **5 donneurs** de ponts hydrogène (OH et NH).
- ☞ Ne possède pas plus de **10 accepteurs** de ponts hydrogène (O et N).
- ☞ Possède une masse moléculaire (PM) inférieure à 500 da ($< 83 \times 10^{-23}$ g).
- ☞ Possède un coefficient de partition octanol/eau (**log P**) ou une lipophilie entre -2 et 5-
- ☞ Possède un nombre de **liaisons rotatives** inférieur à 15.

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur **Molinspiration** se trouvant en réalisant les étapes suivantes sur le site web :

<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>

- ☞ Ouverture du site web indiqué au-dessus.
- ☞ Entrer l'inhibiteur dans la case « **Enter SMILES** ».
- ☞ Click sur le bouton « **calculate properties** ». (Tenio, 2012)

Chapitre 05

Résultats et discussion

Produced with ScanTOPDF

I. Résultats

1. Fiabilité de programme utilisé

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la PKC par diverses molécules, nous avons tenté d'évaluer la fiabilité du logiciel GOLD utilisé dans cette étude. La performance de ce programme est jugée au moyen de 2 critères différents :

- ☞ L'écart quadratique moyen ou le RMSD (Root Mean Square Déviation).
- ☞ L'analyse visuelle.

1.1. Le test RMSD

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (*root mean-square déviation*) entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par le programme de docking. Un seuil maximal de 2Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne position d'une mauvaise position. (Gabb et al, 1997)

Dans notre cas, le test de fiabilité du programme GOLD par le RMSD a été réalisé sur 04 complexes de la PKC disponibles dans la PDB.

Les codes PDB des complexes et de leurs inhibiteurs ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenus avec GOLD sont mentionnés dans le tableau 05.

Tableau 05 : Valeurs de RMSD des 04 complexes PKC-ligand étudiés.

Code PDB	PKC	Ligand cocristallisé	RMSD (Å)
3TXO	PKC η	Naphthyridine	0.434
2I0E	PKC β II	Bisindolylmaleimide	0.786
2JED	PKC θ	NVP-XAA228	0.634
3IW4	PKC α	NVP-AEB071	0.426

Sur les 04 complexes PKC-inhibiteur étudiés, le programme GOLD simule correctement les interactions, avec des valeurs de RMSD inférieurs à 2 Å. Ceci prouve davantage que ce programme est bien adapté à l'étude *in silico* de l'inhibition de la PKC qui nous intéresse ici.

Conclusion

Le test par le RMSD nous permet de conclure, que le programme GOLD peut être utilisé pour prédire les interactions enzyme-inhibiteurs. Il est généralement plus efficace en présence de petites molécules de ligand.

1.2. L'analyse visuelle

L'analyse visuelle par GOLD est une étape essentielle pour confirmer les résultats du RMSD. Elle permet de déterminer si un ligand simulé se superpose avec le ligand Cocristallisé. (Figures : 16, 17, 18, 19).

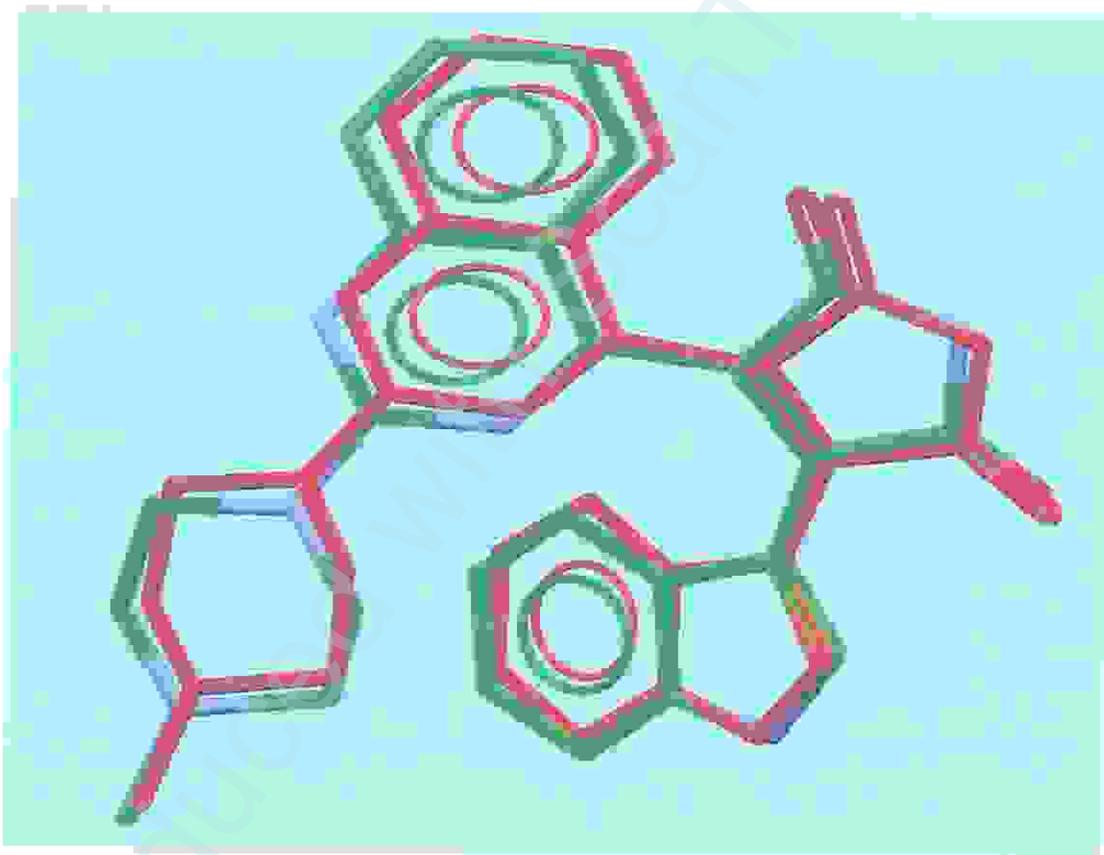


Figure 16 : Superposition des géométries de la NVP-AEB071 (l'inhibiteur de la PKC α) donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb : 3IW4. RMSD = 0.426Å). Image générée par GOLD.

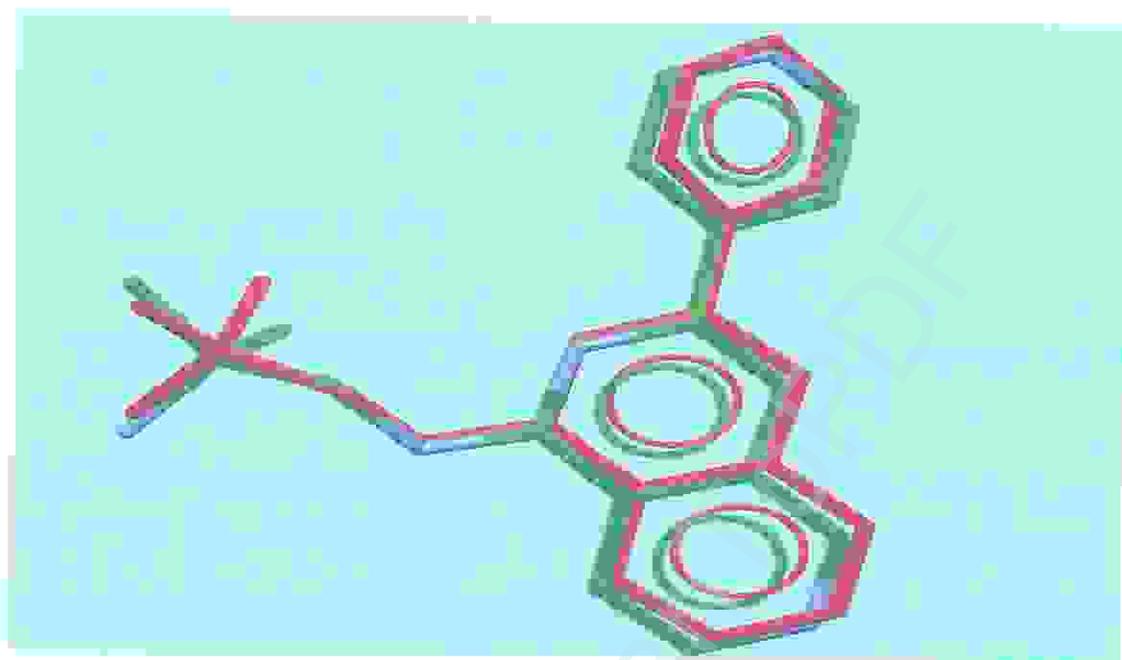


Figure 17 : Superposition des géométries de la Naphthyridine (l'inhibiteur de la PKC η) donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb : 3TXO. RMSD=0,434 Å). Image générée par GOLD.

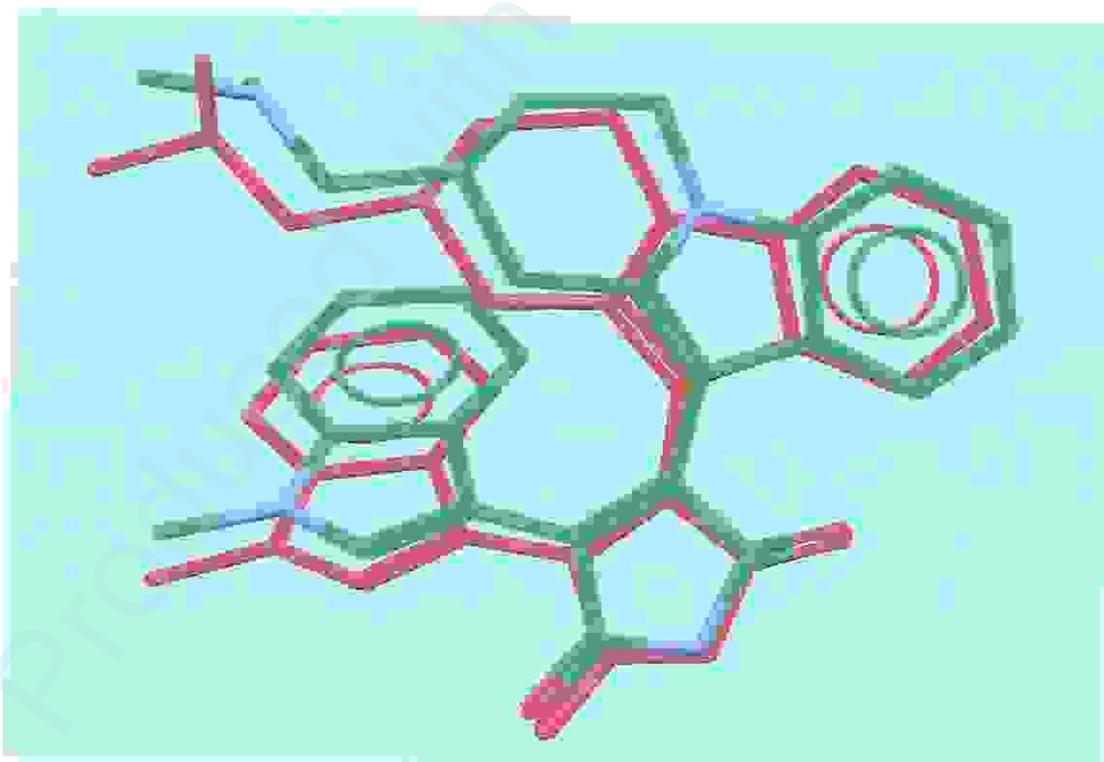


Figure 18 : Superposition des géométries de la NVP-XAA228 (inhibiteur de la PKC θ) donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb :2JED. RMSD=0.634Å). Image générée par GOLD. Image générée par GOLD.

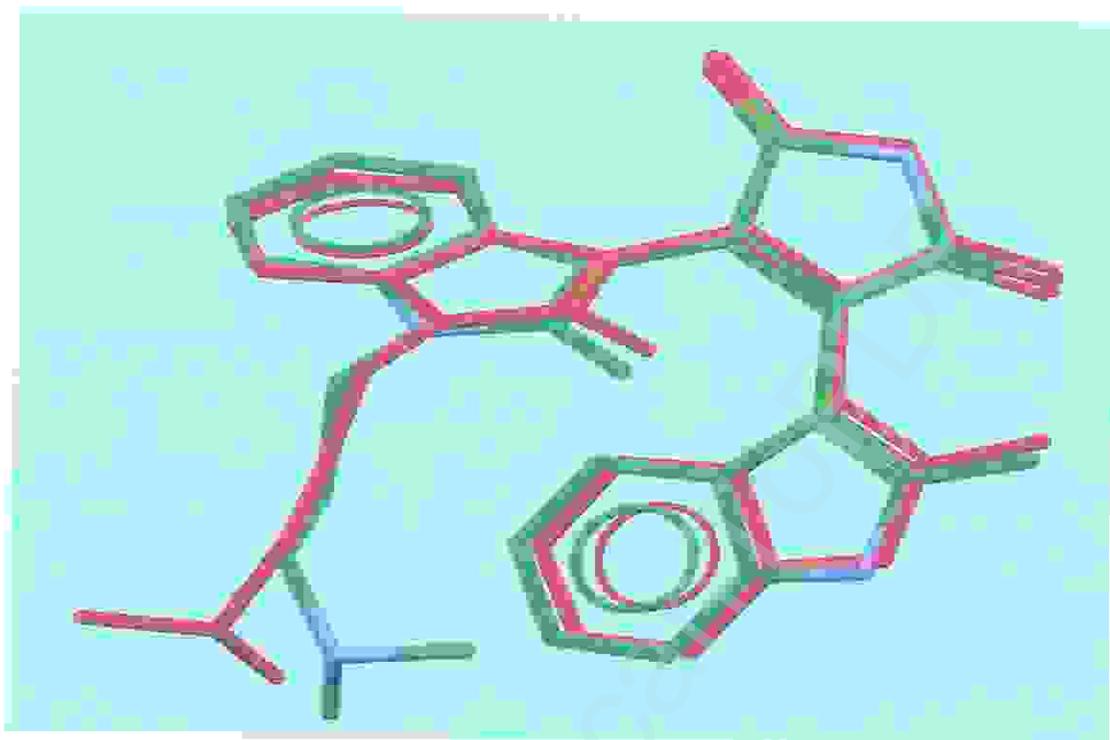


Figure 19 : Superposition des géométries de la Bisindolylmaleimide (l'inhibiteur de la PKC β II) donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb: 2I0E, RMSD=0.786Å). Image générée par GOLD.

Conclusion

En effet, l'analyse visuelle par GOLD réalisée sur les 04 complexes PKC-inhibiteurs cités plus haut montre que les modèles des ligands simulés par GOLD sont correctement placés dans le site actif de la PKC. Ils présentent des conformations spatiales très proches voir même superposables à celles déterminées expérimentalement par cristallographie qu'on retrouve dans la PDB.

2. Le docking des diverses molécules sur le récepteur 3TXO par GOLD

2.1. Le complexe PKC η -inhibiteur (Naphthyridine)

Notre démarche consiste d'abord d'étudier l'interaction avec Naphthyridine, inhibiteur de la cible.

A l'aide du programme *Pymol*, nous avons pu définir les résidus de la cavité catalytique de PKC η (3TXO) en visualisant ceux entourant l'inhibiteur Naphthyridine dans un périmètre de 5Å. (Figures 20et 21)

La figure (20) montre les résidus du site actif de la PKC η complexée avec l'inhibiteur Naphthyridine, ces résidus sont : ASN437, LEU361, GLY362, LYS363, PHE366, VAL369, ALA382, LYS384, GLU403, GLU434, PHE435, VAL436, GLY439, THR417, MET433, ASP440, ASP483, ASN484, LEU486, ALA496, ASP497, 7 PHE498 et PHE644.

L'inhibiteur (figure 21) est en représentation de différents couleurs, et les acides aminés du site actif de l'enzyme sont représentés en orange

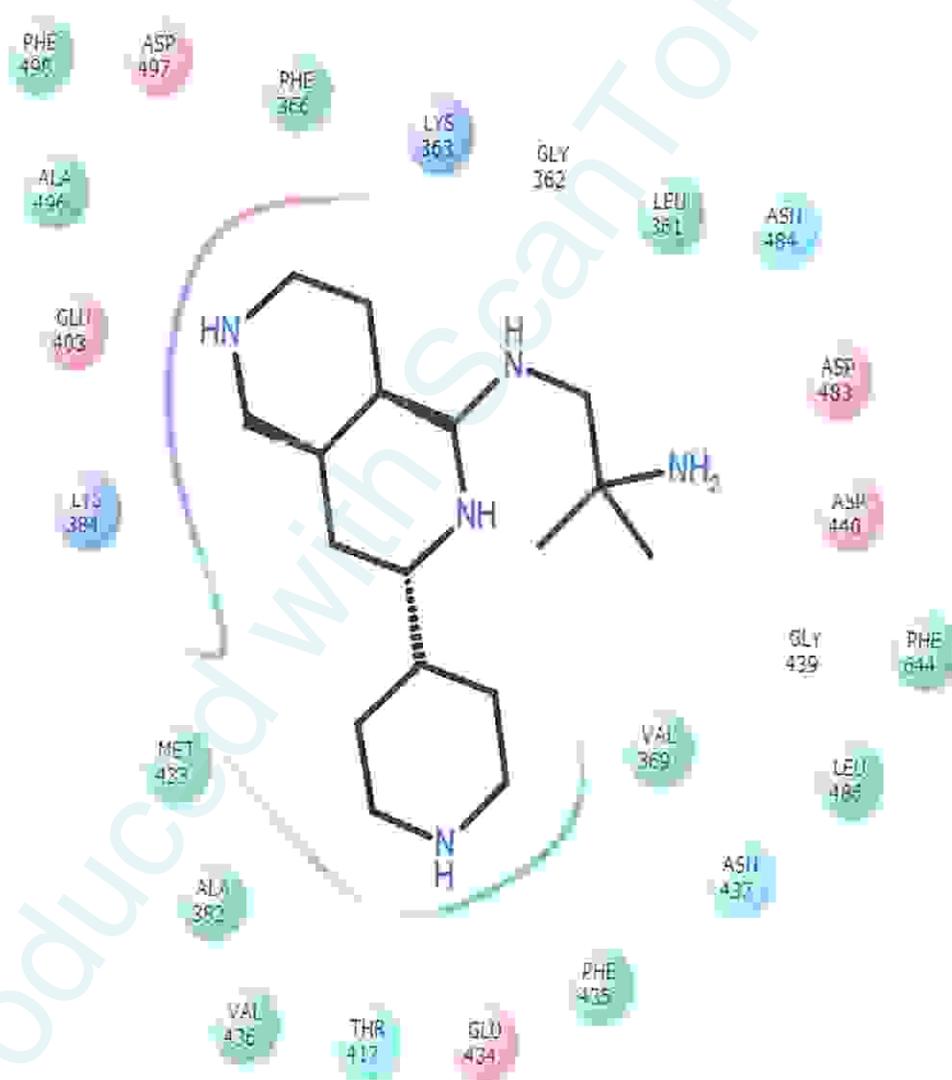


Figure 20 : Diagramme d'interaction de l'inhibiteur Naphthyridine avec la PKC η (code pdb : 3TXO).

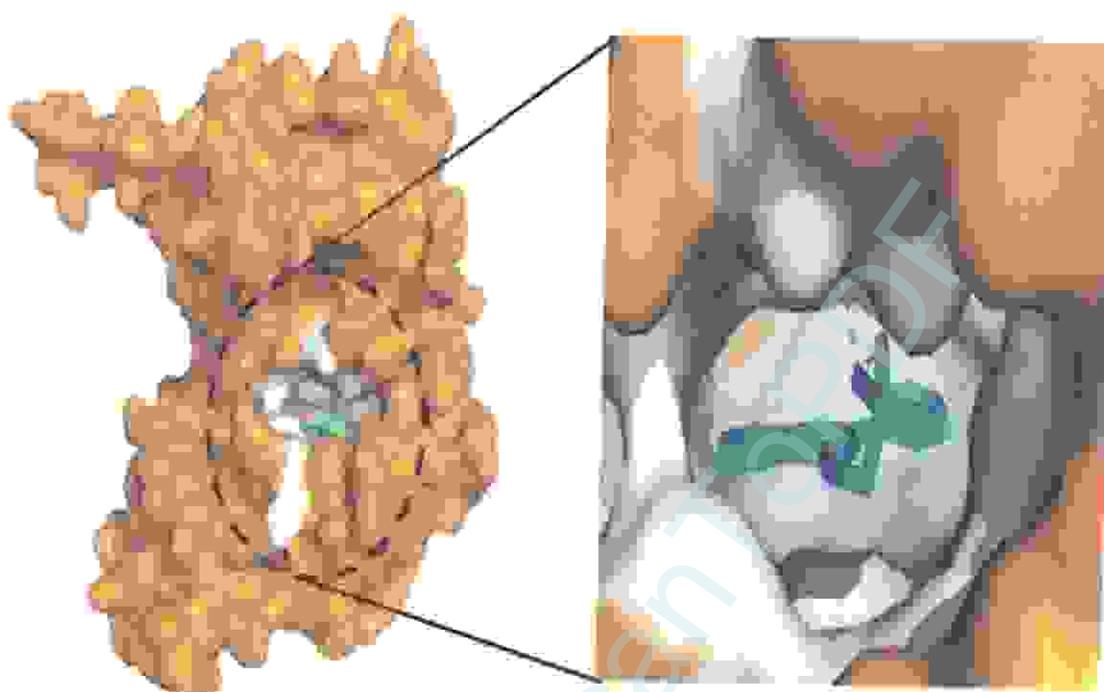


Figure 21 : Emplacement de l'inhibiteur Naphthyridine dans le site actif de la PKC η (code PDB: 3TXO). Image générée par Pymol.

L'analyse visuelle réalisée par GOLD montre que l'inhibiteur Naphthyridine est bien placée dans le site actif de la PKC η où il est stabilisé par 3 liaisons hydrogènes grâce aux acides aminés suivant: LYS384, VAL436 et GLU403, (tableau 06, figure 22).

Tableau 06 : les interactions hydrogènes entre la PKC η et le Naphthyridine.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
GLU403	N	2.965
LYS384	N	3.060
VAL436	N	2.715

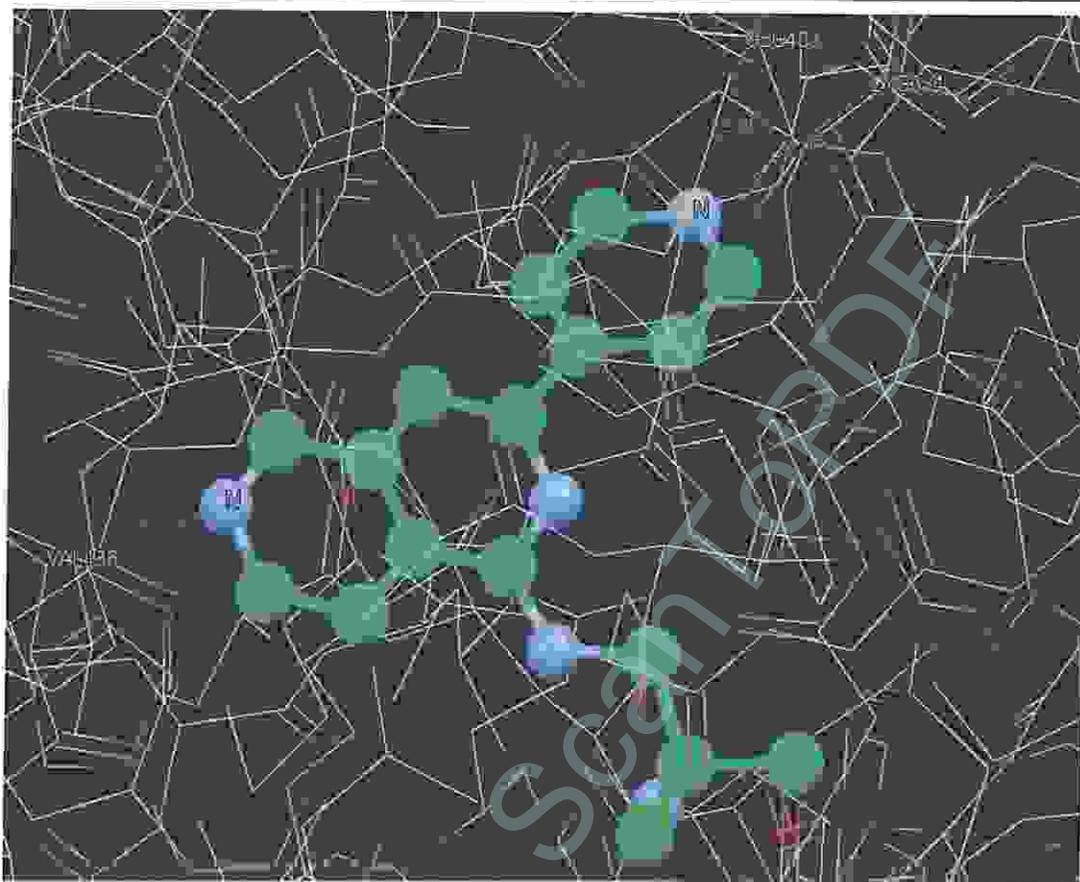


Figure 22: Mode de liaison de la Naphthyridine avec le site actif de la PKC η (code PDB: 3TX0). Image générée par GOLD.

2.2. Le docking des différents flavonoïdes sur le récepteur 3TXO

Le docking de 15 flavonoïdes est effectué sur la structure de la protéine Cocristallisé avec l'inhibiteur Naphthyridine.

Nous avons jugé intéressant de tester ces flavonoïdes, de comparer leurs scores (GOLD score) par rapport au ligand cocristallisé (Naphthyridine), pour proposer le meilleur inhibiteur de l'enzyme PKC η . Les résultats de docking sont présentés dans le tableau 07.

Tableau 07 : Résultats de docking avec le programme GOLD.

N	Molécules	GOLD score (Kcal/mol)
1	Naphthyridine (inhibiteur)	63.41
2	Gallocatéchine gallate	79.97
3	Lépicatéchine gallate	73.60
4	Epigallocatechine gallate	67.46
5	Curcumine	67.03
6	Silybinine	63.14
7	Isorhamnétine	60.68
8	Myricétine	58.92
9	Gallocatéchine	58.38
10	Quercétine	57.10
11	Catéchine	56.16
12	Lutéoline	55.65
13	Kaempférol	53.13
14	Epicatechine	52.42
15	Apigénine	52.22
16	Epigallocatechine	49.54

Parmi les complexes qui figurent dans le tableau 07, nous avons retenu les meilleurs résultats uniquement. C'est-à-dire ceux qui présentent un meilleur score de docking (Valeur d'énergie d'interaction) supérieures à celles du ligand de référence (cocrystallisé).

La majorité des flavonoïdes testés par le programme GOLD possèdent une énergie d'interaction proche à celle de ligand initial (inhibiteur).

La Gallocatéchine gallate, la Lépicatéchine gallate, la Curcumine, l'Epigallocatechine gallate ayant des Gold score excellents : 79.97 Kcal/mol, 73.60 Kcal/mol, 67.46 Kcal/mol et 67.03 Kcal/mol respectivement (le score d'inhibiteur cocrystallisé (Naphthyridine) est 63.41 Kcal/mol).

2.2.1. Etude des interactions du Gallocatéchine gallate avec la PKC η

Le mode d'interaction de ce composé avec la PKC η a été étudié avec GOLD. L'analyse visuelle montre que la Gallocatéchine gallate forme 3 ponts d'hydrogène avec le site actif de la PKC η . (tableau08, figures 23et 24)

Tableau 08 : Représentation des interactions formées par Gallocatéchine gallate.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
ASP497	O	2.989
ASP440	O	2.927
ASP440	O	2.955



Figure 23 : Représentation de liaison d'hydrogène (en vert) formée par le Gallocatéchine gallate. Image générée par GOLD.

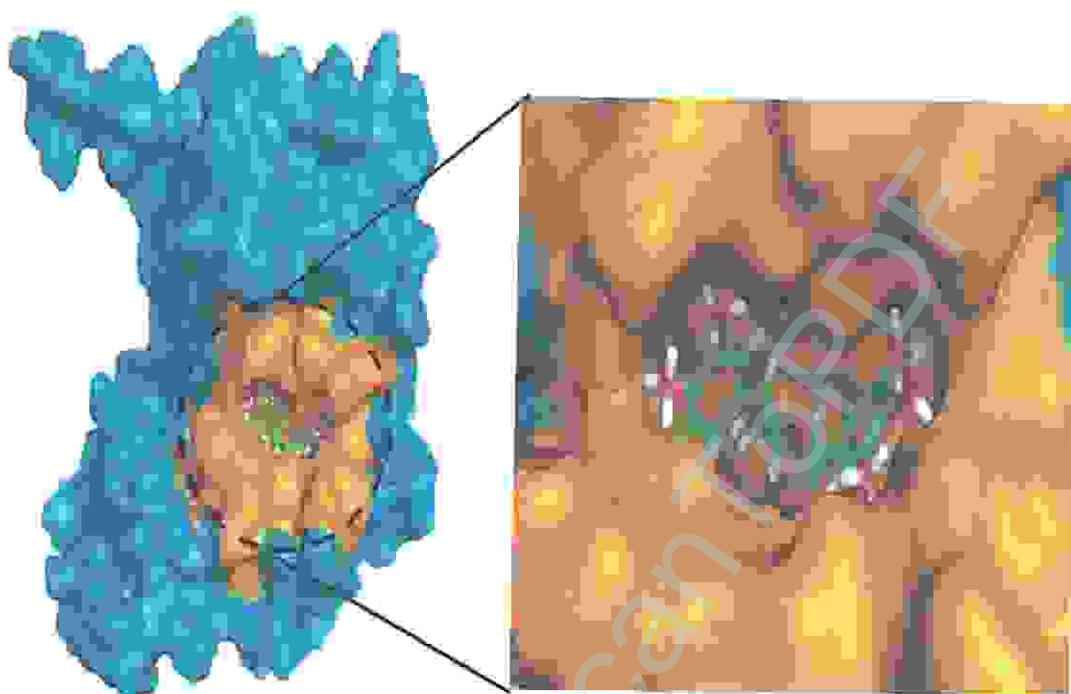


Figure 24 : Emplacement de Gallocatéchine gallate dans le site actif de la PKC η . Image générée par *Pymol*.

2.2.2. Etude des interactions du Lépicatéchine gallate avec la PKC η

Le mode d'interaction de ce composé avec la PKC η a été étudié avec GOLD. L'analyse visuelle (voir figure 25 et 26) montre que la Lépicatéchine gallate forme 4 ponts d'hydrogène avec le site actif de la PKC η . (tableau 09)

Tableau 09: Les ponts hydrogènes entre la PKC η et la Lépicatéchine gallate.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
ASP440	O	2.738
ASP440	O	2.431
VAL436	O	2.624
ASP497	O	2.741



Figure 25 : Représentation de liaison d'hydrogène (en vert et en orange) formée par la Lépicatéchine gallate, Image générée par GOLD.

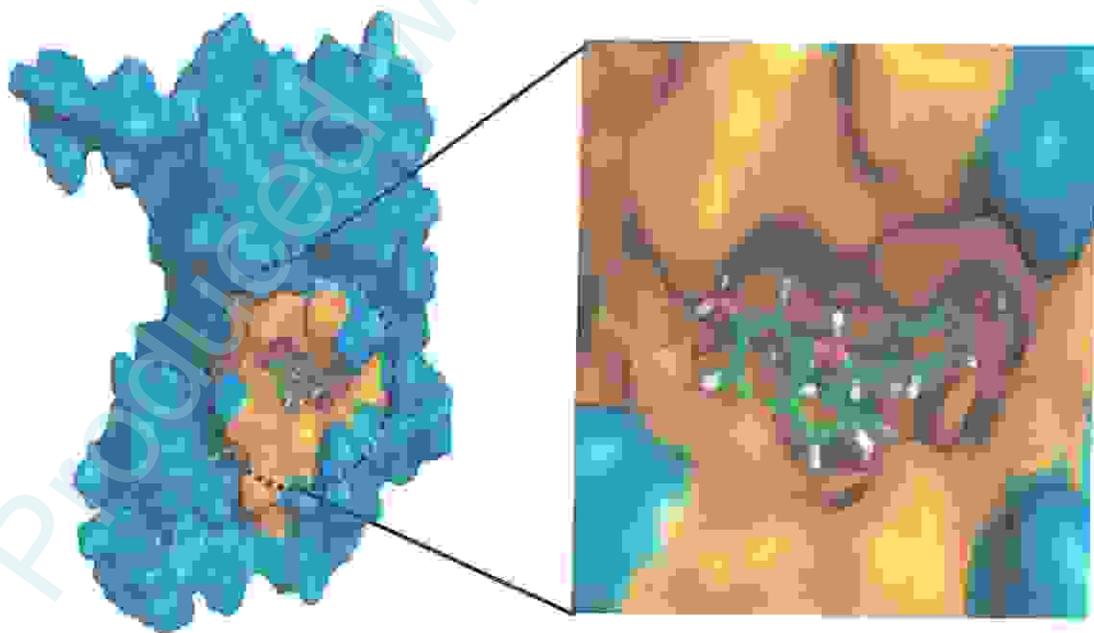


Figure 26 : Emplacement de la Lépicatéchine gallate dans le site actif de la PKC η . Image générée par Pymol.

2.2.3. Etude des interactions du l'Epigallocatechine gallate avec la PKC η

Le mode d'interaction de l'Epigallocatechine gallate avec la PKC η a été étudié avec GOLD. L'analyse visuelle (figure 27 et 28) montre que l'Epigallocatechine gallate forme 5 ponts d'hydrogène avec le site actif de la PKC η . (tableau 10)

Tableau 10 : Les ponts hydrogènes entre la PKC η et Epigallocatechine gallate.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
ASP440	O	2.658
ASP440	O	2.709
ASP440	O	2.496
ASP497	O	2.744
ASP497	O	2.382

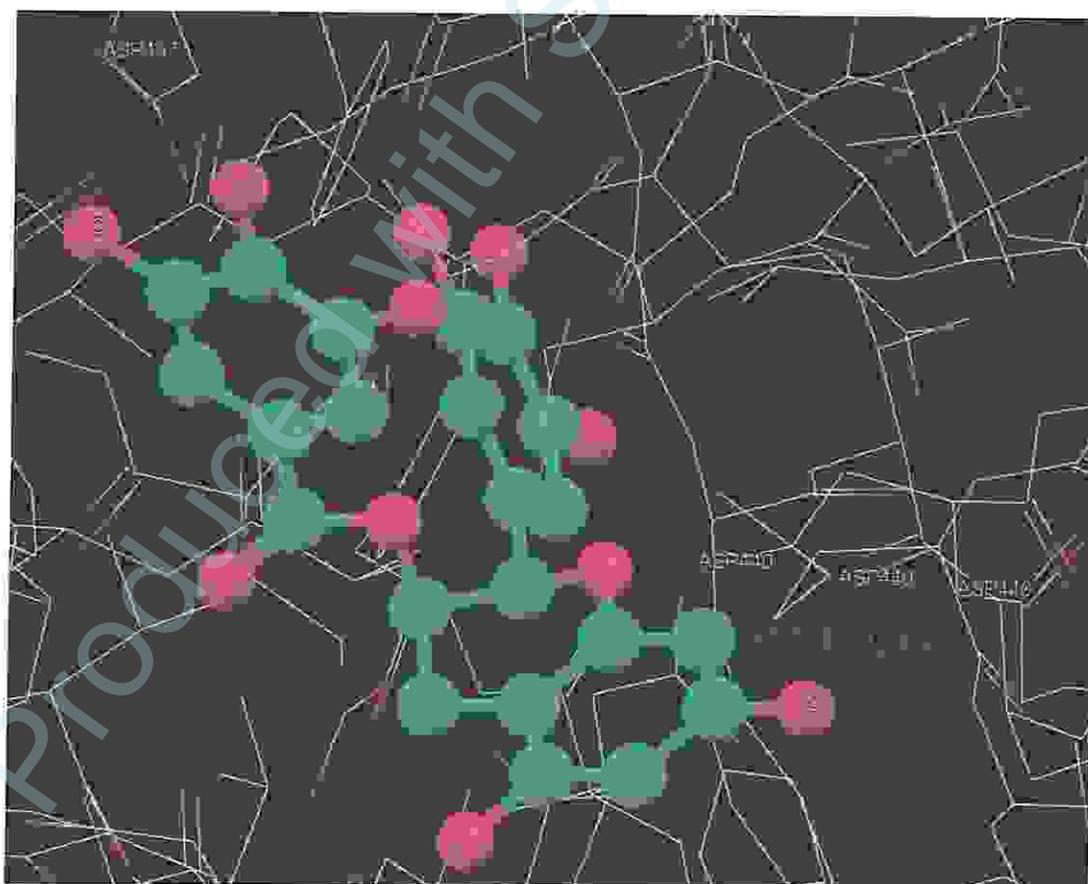


Figure 27: Représentation de liaison d'hydrogène (en vert et en orange) formée par l'Epigallocatechine gallate. Image générée par GOLD.

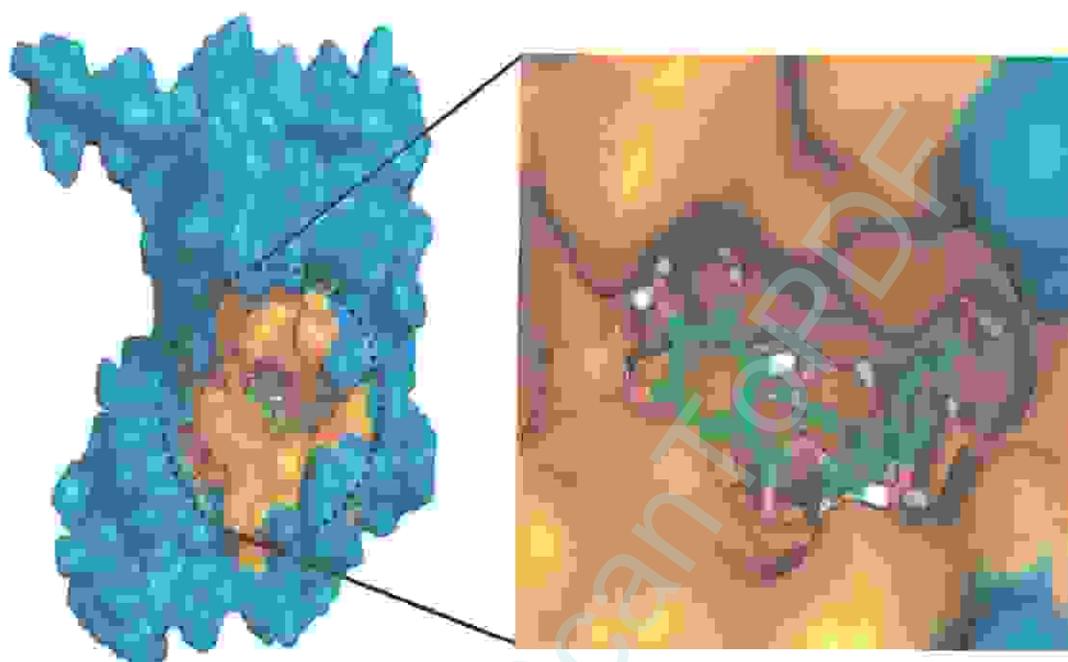


Figure 28 : Emplacement de l'Épigallocatechine gallate dans le site actif de la PKC η . Image générée par *Pymol*.

2.2.4. Etude des interactions du Curcumine avec la PKC η

Le mode d'interaction de la Curcumine avec la PKC η a été étudié avec GOLD. L'analyse visuelle (figure 29 et 30) montre que la Curcumine forme 3 ponts d'hydrogène avec le site actif de la PKC η . (Voir le tableau 11).

Tableau 11: Les ponts hydrogènes entre la PKC η et la Curcumine.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
ASP483	O	2.655
ASP497	O	2.150
VAL436	O	2.760

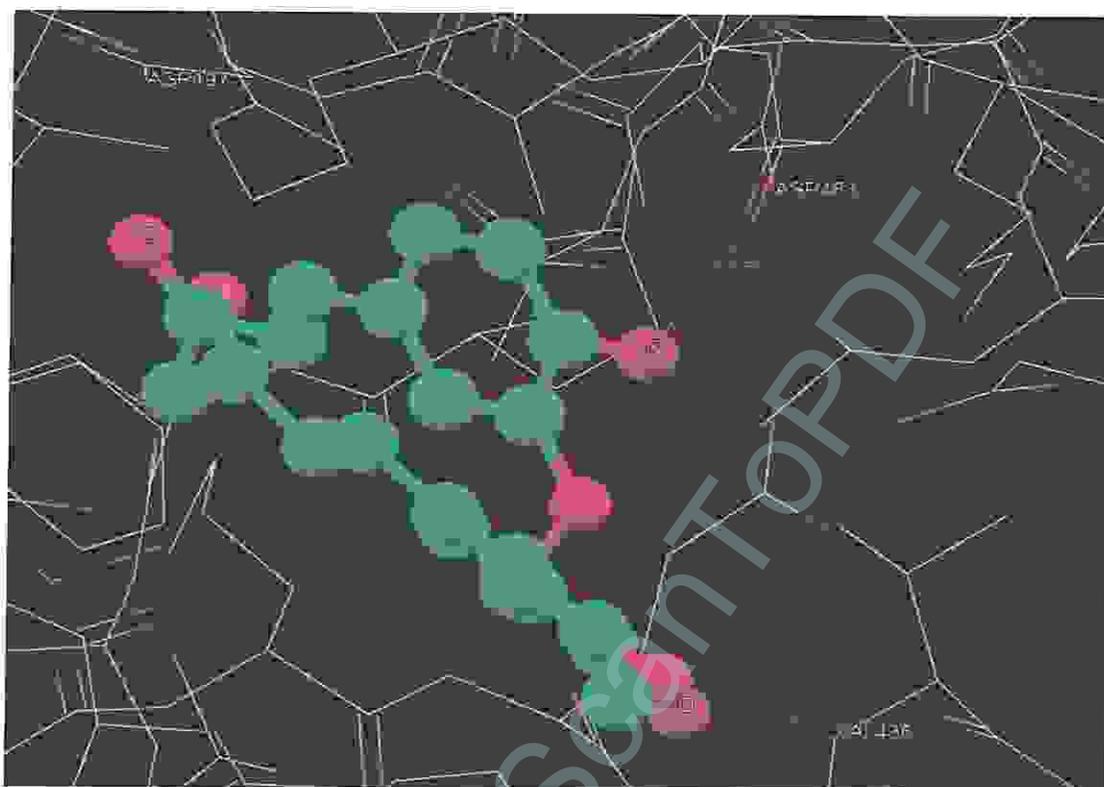


Figure 29 : Représentation de liaison hydrogène (en vert et en rouge) formée par la Curcumine, Image générée par GOLD.

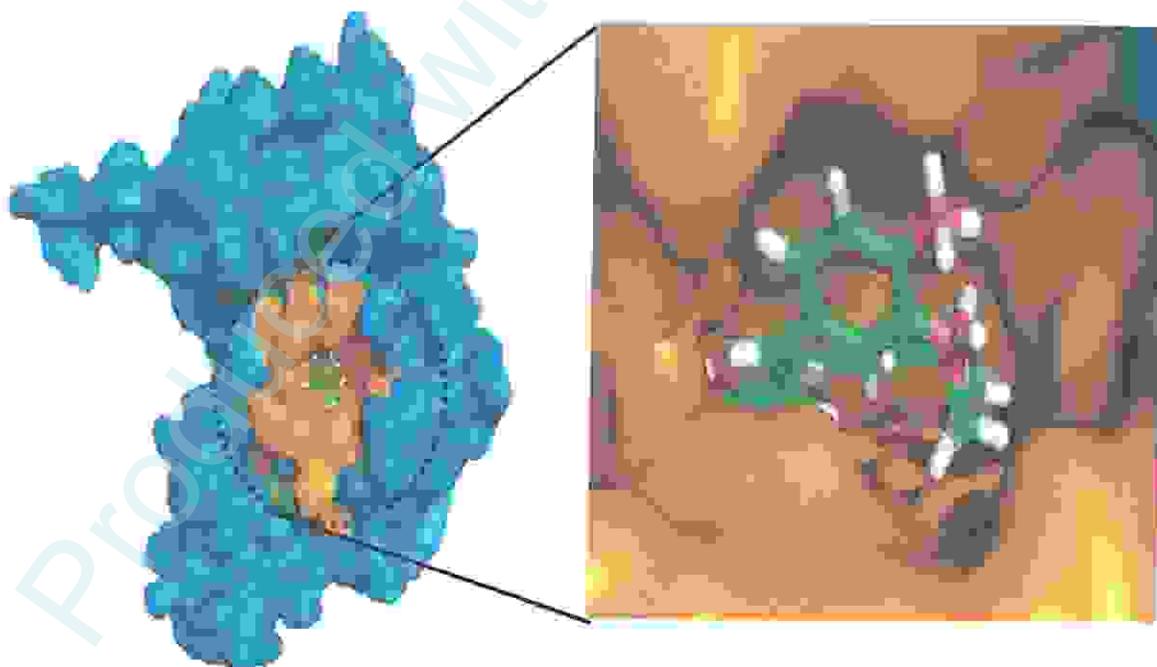


Figure 30 : Emplacement de la Curcumine dans le site actif de la PKC η , Image générée par Pymol.

3. Application de la règle 5 du Lipinski

Les principales raisons de l'échec des molécules en cours de développement d'un médicament sont le manque d'efficacité chez l'homme et les problèmes de pharmacocinétique. En effet, les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion d'une molécule peuvent être estimées à partir de sa structure chimique, ce qui contribue à réduire les échecs dus à ces mauvaises propriétés d'ADME. Dans notre travail, il était très important de compléter cette étude par l'application de la méthode de filtre ADME qui est basée sur la règle de cinq de Lipinski afin de nous renseigner sur les propriétés pharmacocinétiques des quatre flavonoïdes étudiés précédemment. Les résultats sont présentés dans le **tableau 12**.

Tableau 12: Propriété pharmacocinétique des flavonoïdes (La Gallocatéchine gallate, la Lépicatéchine gallate, la Curcumine et le Epigallocatéchine gallate).

	PM	Donneur de H	Accepteur de H	Liaisons rotatable	Log P
Gallocatéchine gallate	458.375	8	10	4	2.25
Lépicatéchine gallate	442.376	7	10	4	2.54
Curcumine	368.385	2	6	8	2.30
Epigallocatéchine gallate	458.380	8	11	4	2.25

À l'issu de ce test, les 04 flavonoïdes (La Gallocatéchine gallate, la Lépicatéchine gallate, la Curcumine et le Epigallocatéchine gallate) peuvent être proposés comme étant de nouveaux inhibiteurs théoriques de PKC η , pouvant être administrés par voie orale, ce conformément à la règle de Lipinski.

II. La discussion

Les PKC jouent un rôle très important dans la signalisation moléculaire dans différents processus cellulaires liés au cancer. Identifier il y a 30 ans comme des agents qui promouvaient les tumeurs, ils sont devenus aujourd'hui le sujet d'études par les laboratoires académiques et les compagnies pharmaceutiques. (Garg, 2013).

De nombreuses études ont établi les PKC comme régulateurs pléiotropiques des fonctions cellulaires (prolifération, différenciation, survie et motilité). (Griner et Kazanietz, 2007)

La complexité des PKC réside dans le fait qu'ils sont une famille de protéines structurellement proches et occupent des fonctions différentes. (Garg, 2013)

D'innombrables études ont évalué les effets anticancéreux des flavonoïdes *in vitro* et *in vivo*, plusieurs flavonoïdes et extraits flavonoïdiques de plantes ont montré de puissants effets inhibiteurs sur différents types de facteurs de croissance, de facteurs de transcription, de récepteurs, de protéines oncogènes, d'hormones... etc. qui ont un rôle clé dans processus de la carcinogénèse. Un mécanisme possible pour les effets anticancéreux potentiels des flavonoïdes pourrait être l'inhibition de diverses PK, telles que les PKC, les EGFR (Epidermal Growth Factor) tyrosine kinases, et les FAK (Focal Adhesion kinase), bloquant ainsi la transduction du signal de la prolifération cellulaire. (Garg, 2013)

Dans la présente étude, nous avons évalué l'affinité de 15 flavonoïdes vis à vis des PKC sur la base de leurs énergies de liaison. D'après les résultats de docking, nous avons constaté que les meilleures conformations pour le **Gallocatéchine gallate**, le **Lépicatéchine gallate**, la **Curcumine**, le **Epigallocatechine gallate** dans le site actif de la PKC η simule parfaitement la position observée par l'inhibiteur (Naphthyridine). Nous avons observé la formation de 3 liaisons hydrogènes entre l'inhibiteur (Naphthyridine) et les résidus LYS384, VAL436 et GLU403 de la PKC η . En revanche Nous avons observé la formation de 3 liaison d'hydrogènes entre la **Gallocatéchine gallate** et les résidus ASP440 et ASP497 de la PKC η et 4 liaison d'hydrogènes entre la **Lépicatéchine gallate** et les résidus ASP440, VAL436 et ASP497 de la PKC η et 5 liaison d'hydrogènes entre la **Epigallocatechine gallate** et les résidus ASP440 et ASP497 de la PKC η et 3 liaison d'hydrogènes entre la **Curcumine** et les résidus ASP483, ASP497 et VAL436.

En vue de ces résultats, on peut conclure que dans le site actif du PKC η il existe d'autres résidus clé dans interaction protéine –ligand. Nous avons obtenu des scores élevés pour les ligands : la Gallocatéchine gallate, la Lépicatéchine gallate, la Curcumine, l'Epigallocatechine gallate respectivement, et que ces ligands partagent des interactions avec les résidus ASP440 et ASP497 qui appartiennent au site actif du PKC η .

A la lumière de ces résultats on peut proposer le mode d'interaction le plus efficace du PKC η avec les ligands et qui englobe les résidus ASP440 et ASP497.

Conclusion

Produced with ScanTOPDF

Conclusion et perspectives

Notre travail avait pour but de nous initier aux outils de la simulation informatique et de développer nos compétences en particulier en docking moléculaire par **GOLD** afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la PKC η et traiter de manière plus efficace le cancer. Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé plusieurs étapes :

- La première étape : a permis de tester la fiabilité du programme **GOLD** par l'application du test de calcul des valeurs du RMSD de 04 complexes protéines-ligands téléchargés de la PDB. Les résultats ont donné des valeurs inférieures à 2Å. Ce test nous apporte la preuve que le programme **GOLD** est hautement performant et de conclure qu'il peut être utilisé en toute fiabilité pour simuler les interactions des inhibiteurs de la PKC η .
- La deuxième étape : Cette étape consiste à comprendre les mécanismes d'interaction entre un ligand et son récepteur, en l'occurrence la PKC η et son inhibiteur. Le docking moléculaire avec **GOLD** nous a permis de constater que parmi les 15 flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation étudiés, Gallocatéchine gallate, L'épicatéchine gallate, Curcumine, Epigallocatechine gallate sont les meilleur inhibiteur de la PKC η avec des scores égal à 79.97 Kcal/mol, 73.60 Kcal/mol, 67.46 Kcal/mol et 67.03 Kcal/mol respectivement.
- Enfin, l'application de la règle de 5 de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME des 4 flavonoïdes qui se présentent comme de nouveaux inhibiteurs théoriquement plus affines vis-à-vis de la PKC η .

Pour l'avenir et comme perspectives, il conviendrait dans le prolongement de cette étude, de tester l'activité biologique des 4 flavonoïdes nouvellement proposés par une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* pour confirmer les résultats théoriques réalisés *in silico*.

Référence Bibliographique

Produced with ScanTOPDF

Références bibliographiques

1. **ABRIAL E.**, (2013). Implication de la protéine kinase C dans les troubles bipolaires: vers de nouvelles cibles thérapeutiques, Neurosciences, Université Claude Bernard-Lyon I, 225p.
2. **AKROUM S.**, (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse, Université Mentouri de Constantine, 112p.
3. **ALYSSA X et al.**, (2013). Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox, *biochem J*, 452, 195-209p.
4. **Anonyme.**, (2016). The gold guide, uk, 112p.
5. **ARRAULT A.**, (2007). Stratégies de docking-storting assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma, Thèse, Université d'Orleans, 191p.
6. **ASHHAR A et al.**, (2009). Exploitation of protein Kinase C : a useful target for cancer therapy, *cncer treatment Reviews*, 35, 1-8p.
7. **BAILLET F.**, (2003). Cancérologie Niveau DCEM3, Université Pierre et Marie Curie, 298p.
8. **BAUTISTA SS**, (2007). Estudio de la estructura y función de la familia de proteínas quinasas C, memoria de doctora, univercidad de Murcia, 296p.
9. **BATRA P et SHARMA A.K.**, (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives, *3biotech*, 3, 439-459p.
10. **BELLEBCIR L.**, (2008). Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales, Biodiversité et production végétale, université Mentouri de Constantine, 119p.

11. **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 lipoxigénase et la cyclooxygénase, Biochimie Appliquée, Université Mentouri Constantine, 77p.
12. **BEROUD C.**, (2011). Bases de données et outils bioinformatiques utiles en génétique, Support de Cours, Université Médicale Virtuelle Francophone, 19p.
13. **BONSAI E.**, (2014). Bioinformatique et données biologiques, Cours d'introduction à la bioinformatique et de présentation des banques de séquences. 1ère partie.
14. **BOUCHAMA S et YAZZA S.**, (2014). Index des métabolites secondaires végétaux, Biochimie fondamentale et appliquée, université kasdi mrbah, Ouargla, 46p.
15. **BOUROTTE M.**, (2004). Synthèse d'inhibiteurs de protéines kinases: approches pharmacochimiques, Chimie Organique, Université louis pasteur, 320p.
16. **BOUZIANE CH .**, (2014). Etude de l'interaction de la phospholipase A2 et flavanones isolées de l'Inule Visqueuse par modélisation moléculaire, mémoire, Université Abou-bakar belkaid de Tlemcen, p55.
17. **BRAUER C.**, (2007). Les médiateurs et voies de signalisation intracellulaires impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale : nouvelles stratégies thérapeutiques en cancérologie, Thèse. Université Henri Poincaré-Nancy I, 179p.
18. **BRUNETON J.**, (2009). Phytochimie des plantes médicinales, Edition Tec & Doc, paris, 1268p.
19. **BRUNO D.**, (2007). Couplage haptique pour des applications de docking moléculaire, Thès, Université Pierre et Marie Curie, 172p.
20. **BRUT M.**, (2009). Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques: Les Modes Statiques, Thèse, Université Toulouse III-Paul Sabatier 233p.

21. **BRUNO D., Goms O.,** (2003). Étude d'une voie de signalisation intervenant dans la
Toulouse, 155p.
22. **CABARROT E.,** (2008). Cancérogenèses, développement tumoral, classifications
cours de cancérologie Module 10, Facultés de médecine de Toulouse, 23p.
23. **CAUVIN L.,** (2015). Voies De Signalisation Impliquées Dans La Sensibilisation Des
Tumeurs Mammaires Au Docétaxel Par Les Acides Gras Polyinsaturés N-3, Thèse,
Université François – Rabelais De Tours, 218p.
24. **CHIKHI A.,** (2007). Calculs et modélisation de l'interaction peptide de formylase-
substances antibactériennes à l'aide de techniques de docking (arrimage) moléculaire,
Thèse, Université Mentouri Constantine, 126 p
25. **DACOSTA E.,** (2003). Les phytonutriments bioactifs, Yves Dacosta (Ed), Paris, 317p.
26. **DUQUESNES N.,** (2008). Signalisation cellulaire et formation de complexes
protéiques lors de l'étirement des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, Thèse,
Université Paris XI Val-de-Marne, 148p.
27. **EDENHARDER R., GRUHAGE D.,** (2003). Free radical scavenging abilities of
flavonoïds as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert- butyl
hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102, *Mutat*
Res 540, 1, 1–18p.
28. **ELKAIM J.,** (2011). Drug design in silico criblage virtuel de protéines à visée
thérapeutique, Thèse, Université de bordeaux I, 251p.
29. **ESTELLE G.,** (2006). Dérivés de flavonoïdes et de vérapamil comme ligands des
transporteurs MRP1 et ABCG2: De la conception à l'activité anticancéreuse, Thèse,
Université de Grenoble, 135p.
30. **FRANCOIS M.,** (2014). Développement d'une nouvelle méthode de docking basée
sur les mécanismes enzymatiques et guidée par des groupes prosthétiques, Chimie,
Université Paris Sud, 117p.

31. **GABB J et al.**, (1997). Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information, *Journal of Molecular Biology*, 272, 106-120p.
32. **GARG R.**, (2013). Protein kinase C and cancer : what we know and what we do not. *Oncogene*, 33, 5225-5237p.
33. **GRINER E.M et KAZANIETZ M.G.**, (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer, *Nat Rev Cancer*, 7, 281-294p.
34. **GRODSKY N.B et LOVE R.L.**, (2006). Structure of catalytic domain of human protein kinase C beta II complexed with a bisindolylmaleimide inhibitor, Rapport scientifique, Rapport scientifique, Full wwPDB X-ray Structure Validation Report, 18p.
35. **HADJ SALIM J.**, (2009). Extraction identification caractérisation des activités biologiques de nitraria retusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Institut national polytechnique de Lorraine, 218p.
36. **HAVSTEEN B.H.**, (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *PharmacolTherapeut*, 96, 67- 202p.
37. **HERON F.**, (2003). La classification des cancers, Faculté de Médecine de Caen. France. Chapitre 6. p1.
38. **ISAUTIER S.**, (2012). Places de la vaccination anti papillomavirus humains dans la prévention du cancer du col de l'utérus situation à l'île de la réunion, Pharmacie, Université de lorraine, 113p.
39. **JEROM P.**, (2014). Formation PyMOL-11-12 december, Toulouse, 1/18P.
40. **JONES G et al.**, (1997). Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking, *Journal of Molecular Biology*, 267, 727-748p.

41. **KORB O et Cole J.**, (2010). *Ant Colony Optimisation for Ligand Docking*, Cambridge Crystallographic Data Centre, 6234, 72-83p.
42. **LAGRADE P.**,(2001). *Cancer, progrès de la prévention et du traitement*, Nutranews Science Nutrition, Prévention et Santé, 16p.
43. **LALOUT W.**, (2010). *Etude de l'interaction enzyme-substrat par modélisation moléculaire* Mémoire, Université Abou-bakr belkaid de Tlemcen, 90p.
44. **LALOUT W.**, (2016). *Contribution a la modélisation des interactions dans Les biomolécules: Cas de la Maladie de Parkinson*, Chimie Théorique et Modélisation Moléculaire, Université Abou Bekr Belkaide de Tlemcen, 75p.
45. **LAMY V.**, (2009). *Etude des propriétés anticancéreuses des lupulines, micro constituants spécifiques du houblon: aspects cellulaires et physiopathologiques*, Science de vivant, Université de Strasbourg, école doctorale des sciences de la vie et de la sante, 189p.
46. **LEGHMARI K.**, (2008). *La protéine Tat du Virus d'immunodéficience humaine (VIH) induit la production de l'IL-10 et du TNF-alpha dans le monocyte/macrophage humain : Etude des mécanismes d'activation de la voie NF-KappaB*, Immunologie, Université Toulouse, 236p.
47. **LYNE V.**, (2009). *Rôle de la protéine socs-1 dans la progression tumorale colique*, Thèse, Université paris-sud 11, 189p.
48. **MAHDJAR S.**, (2013). *Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante Matricaria pubescens et à l'évaluation de son activité antioxydante*, Memoir, Université Kasdi Merbah Ourgla.
49. **MOKRANI E.**, (2012). *Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique*, Mémoire Biochimie, Université Mentouri Constantine, 121p.

50. MOREL S., (2011). Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth (Fabaceae), Chimie des Biomolécules, Université d'Angers, 266p.
51. NESSLANY F., (2013). Etudes de génotoxicité, Master 2-Mention Toxicologie, Institut Pasteur de Lille Paris.
52. PIERRE-HENRI D *et al.*, (2011). Nutrition et cancer Légitimité de recommandations nutritionnelles dans le cadre de la prévention des cancers, Édition scientifique, Légitimité de recommandations nutritionnelles dans le cadre de la prévention des cancers. p16.
53. RAMANI D., (2008). Action du PMA sur les cellules endothéliales : approche morphologique et protéomique, Médecine, Université paris descartes, 60p.
54. REDDY A *et al.*, (2007). Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective, Current Protein and Peptide Science, 8, 329-351p.
55. REYLAND M.L., (2007). Protein Kinase C and Apoptosis, Cell Signaling and Human Diseases: Molecular Mechanisms, 2, 36p.
56. RICHARD C., (2011). Etude de la toxicité cardiaque des médicaments anticancéreux, Physiopathologie CardioVasculaire, Université de bourgogne, 161p.
57. STARK W *et al.*, (2008). The crystal structure of the kinase domain of the protein kinase C theta in complex with NVP-XAA228 AT 2.23Å resolution, Rapport scientifique, Full wwPDB X-ray Structure Validation Report, 20p.
58. TABART J., (2011). Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire et Etude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium, Doctorat en sciences, Université de Liège, 67p.
59. TENIOUS S., (2012). Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses, Mémoire Biochimie, Université Mentouri Constantine, 59p.

60. **TIGRINE C.**, (2014). Effets anticancéreux et chimioprotecteur de l'extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de *Cléome arabica*, Biochimie, Université Ferhat Abbas Sétif I Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 113p.
61. **TSIMOGIANNINS D et OREOPOULOU V.**, (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency, A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members, *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7, 140-146p.
62. **VAILLANCOURT-JEAN E.**, (2012). Ciblage pharmacologique du phénotype invasif et inflammatoire dans les médulloblastomes, Biochimie, Université du Québec Montréal, 92p.
63. **VERDONK M et al.**, (2003). Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 52, 609-623p.
64. **VEZINAA.**, (2012). Impact du statut de différenciation des cellules promyélocyaires HL-60 sur l'efficacité anticancéreuse et antiinflammatoire de l'EGCG, *Physiologie et biophysique moléculaires*, Université de Montréal, p109.
65. **WARREN L et al.**, (2004). Pymol user's guide, Delano scientific llc, 62p.
66. **WEI S., YAN-HUA L.**, (2013). Molecular docking of citrus flavonoids with some targets related to diabetes, *A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society (BDPS)*, 170p.
67. **YANG C., KAZANIETZ MG .**, (2003). Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC , *trends in pharmacol*, 24, 602-8p.
68. **YAO L et al.**, (2004). Flavonoids in Food and their health benefits, *Plant Food Hum Nutr*, 59, 113-122p.
69. **ZEGHAD N.**, (2009). progrès de la prévention et du traitement, *Biotechnologie végétale*, Université Mentouri Constantine, 130p.

Les Sites web

- [1] : <http://www.bio-synergie.eu/Cancer-Introduction.html> (consulter le 18/04/2017, 22:05).
- [2] : http://www.maxisciences.com/cancer/cancer-definition-causes-types-qu-039-est-ce-que-c-039-est_art35165.html (consulter le 19/03/2017, 21:01).
- [3] : <http://www. Roche.fr/patients/info-patients-cancer/traitement-cancer/traitements-cancer.html> (consulter le 04/04/2017, 20:30),
- [4] : <https://www.ligue-cancer.net/shared/brochures/traitements-cancers.pdf> (consulter le 17/03/2017, 22:00).

Résumé

Produced with ScanTOPDF

Résumé

Les flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation (isolés à partir des sources naturelles) ont été pris en tant que ligands pour le docking moléculaire. Les cibles moléculaires, PKC η dont la structure cristallographique est disponible sur la base de données PDB (code PDB : 3TXO), a été utilisé pour l'analyse d'interactions en utilisant le programme GOLD.

Les résultats du docking des ligands ont montré que la Gallocatéchine gallate, la Lépicatéchine gallate, la Curcumine, le Epigallocatechine gallate présentent une bonne affinité envers la cible liée au cancer:

Les mots clés : Docking, PKC η , GOLD, cancer, flavonoïdes.

Produced with Scantopdf

الملخص:

باستعمال وسائل بيومعلوماتية Bioinformatic tools، ارتأينا في هذا البحث إجراء دراسة حول إمكانية تثبيط أحد إيزوأنزيمات PKC (PKC η) من طرف بعض الفلافونويدات الأكثر انتشارا في أغذية الإنسان، أين قمنا بإرساء Docking هذه الفلافونويدات في الموقع الفعال للإنزيم المستهدف (PKC η) بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي (Genetic Optimization of Ligand Docking)، GOLD.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن كل من المركبات: Epigallocatechine gallate، Gallocatéchine، Lépicatechine gallate، Curcumine، على الترتيب تملك ألفة عالية affinity نحو الموقع الفعال للـ PKC η ، ما يُنتج إمكانية استعمالها كمثبطات انتقائية بهدف علاج السرطان.

الكلمات المفتاحية: الإرساء الجزيئي، الفلافونويدات، السرطان، GOLD.

Produced with Scantopdf

Abstract

The most abundant flavonoids in the diet (isolated from natural sources) were taken as ligands for molecular docking. The molecular targets, PKC η , whose crystallographic structure is available on the basis of PDB data (code PDB: 3TXO), was used for the analysis of interactions using the GOLD program.

The results of the ligand docking showed that Gallocatechin gallate, Lepicatechin gallate, Curcumin, Epigallocatechin gallate exhibit good affinity towards the target linked to cancer.

Keywords: Docking, PKC η , GOLD, cancer, flavonoids

Produced with Scantopdf