



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Interactions Protéine-Ligands: Cas de la farnésyl transférase et des flavonoïdes

Présenté et soutenu par : *ZAIT Meriem*

Le : 15/06/2016

BERKANE Rayene

Jury d'évaluation :

Présidente: *SATTA D.* (Pr - UFM Constantine).

Examinatrice : *HAMLAOUI I.* (MCB- UC3)

Rapporteur : *BENCHERAIET R.* (MCA- UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 – 2016*

Remerciements

La réalisation de ce mémoire n'a été possible que grâce à la contribution de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner notre reconnaissance :

Tout d'abord nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et notre sincère gratitude à Mme Bencharaïet, notre encadreur pour son aide, ses encouragements, sa disponibilité, ses remarques et ses critiques constructives qui nous ont motivées pendant toute la période de la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également à Mme Bencharif, Directrice du laboratoire de chimie des Matériaux Constantine (LCMC) pour nous avoir accueillies au sein du laboratoire.

Nous exprimons nos remerciements et notre reconnaissance à Mme Hamlaoui, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et surtout pour son aide, ses explications et ses conseils avisés.

Nous présentons notre profonde gratitude à Mr Bensegueni Rafik, pour ses précieux conseils qui ont grandement contribué à la qualité du travail accompli.

Nous tenons à remercier également Mr Kherrouba Madjid, pour tout le support qui nous a accordé, pour sa gentillesse et son soutien le long de la période passée au laboratoire.

Merci, à tous les membre du laboratoire LCMC pour nous avoir permis de réaliser ce travail dans un cadre agréable et dans des conditions chaleureuses.

Nos vifs remerciements s'adressent à Mme Satta, responsable de la filière Génétique Moléculaire qui a accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci, à tous les enseignants de Génétique Moléculaire pour lesavoirqu'ils nous ont inculqué le long du cursus et pour cette formation de qualité, en particulier Mr Rezgoune et Mme Zaidoune Samira.

Nos remerciements vont enfin, à nos familles, nos amis et toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

*La gratitude est la clé qui ouvre les portes du
vrai savoir*

Table de matière

Introduction	01
Chapitre I : La farnesyl transférase	04
I.1. Introduction	05
I.2. Description de la farnésyl transférase	05
I.2.1. Structure	05
I.2.1.1. Sous-unité α	06
I.2.1.2. La sous-unité β	06
I.2.2. Site actif de la FTase	07
I.3. Mécanisme réactionnel catalysé par la FTase	08
I.3.1. Rôle de la FTase	08
I.3.2. Substrats de la FTase	08
I.3.3. Les étapes de la farnésylation	09
I.4. FTase, cible thérapeutique	10
I.4.1. FTase et traitement antiparasitaire	11
I.4.2. FTase et syndrome progéroïde	11
I.4.3. FTase et cancer	11
I.4.3.1. Structure de la protéine RAS	12
I.4.3.2. Modification post/traductionnelle de la protéine RAS	12
I.4.3.3. Activation des voies de signalisation liées à la protéine RAS	13
I.4.3.4. RAS et oncogenèse	14
I.5. Les inhibiteurs de la FTase	15
I.5.1. Approche rationnelle	15
I.5.2. Approche aléatoire	15
I.5.2.1 Composés synthétiques	16
I.5.2.2. Composés naturels	17
Chapitre II : Les flavonoïdes	18
II.1. Introduction	19
II.2. Description générale	19
II.2.1. Structure chimique	19
II.2.2. Répartition et localisation	20
II.3. Classification des flavonoïdes	21
II.4. Intérêt biologique des flavonoïdes	22
II.4.1. Activité anti-tumorale	22
II.5. Flavonoïdes VS FTase	24

Chapitre III: Interaction FTase/flavonoïdes : résultat de l'étude *in*

<i>silico</i>	25
III.1. Introduction.....	26
III.2. Définition du docking	26
III.3. Principe du docking.....	28
III.3.1. Le searching.....	29
III.3.2. Le scoring.....	29
III.4. Interaction FTase/flavonoïdes.....	29
III.4.1. Descriptif des ligands.....	30
III.4.1.1. La fisétine.....	31
III.4.1.2. La galangine.....	32
III.4.1.3. L'isorhamnétine.....	32
III.4.1.4. Le kaempférol.....	32
III.4.1.5. La morine.....	33
III.4.1.6. La myricétine.....	33
III.4.1.7. La quercétine.....	34
III.4.1.8. La rhamnazine.....	34
III.4.1.9. La rhamnétine.....	34
III.4.1.10. La tamarixétine	35
III.4.1.11. La bis-chalcone.....	35
III.4.1.12. La chalcone.....	35
III.4.2. Validation du modèle de calcul.....	36
III.5. Interactions 1SA4/flavonoïdes.....	36
III.5.1. Analyse des complexes FLAVONOÏDES/1SA4.....	38
III.5.1.1. Analyse du complexe TIPIFARNIB/1SA4.....	38
III.5.1.2. Analyse des complexes FLAVONOLS/1SA4.....	39
III.5.1.3 Analyse des complexes BIS-CHALCONE/1SA4 et CHALCONE/1SA4.....	46
III.6. Interprétation des résultats	48
Conclusion générale	50
Référence bibliographique	53

Liste des abbreviations

- **AA:** Acides Aminés
- **AMM:** Autorisation de Mise sur le Marché
- **ASP:** Acide aspartique
- **ARG:** Arginine
- **CAAX:** **C:** cystéines; **AA:** acides aminés aliphatique ; **X :** acides aminés de sélectivité
- **CENP-E:** Protéine centromérique
- **CYS:** Cystéine
- **DMAPP:** Diméthylallyl-pyrophosphate
- **E, E, E-HFP:** Acide E,E,E-hydroxy-farnésylphosphonique
- **E-FPP:** Complexe enzyme-farnésyl diphosphate
- **ERO:** Espèces réactives d'oxygène
- **FNTA:** Farnésyltransferase, CAAX Box, Alpha
- **FNTB:** Farnésyltransferase, CAAX Box, Beta
- **FPP:** Farnésyl Pyphosphate
- **FPPS:** Farnésyl diphosphate synthase
- **FTase:** Farnésyl transferase
- **FTi:** Farnésyl transferase inhibitor
- **GAP:** GTPases Activatrice protéine
- **GDP:** Guanosine diphosphate
- **GEF:** Guanine Nucléotide Exchange Factors
- **Grb2:** Growth factor receptor binding protein-2
- **GTP:** Guanosine triphosphate
- **HIS:** Histidine
- **H-Ras:** Harvey Ras
- **IC₅₀:** Concentration inhibitrice 50 %
- **ICMT:** Isoprénylcystéine carboxyméthyl transférase
- **IDI:** Isopentényl diphosphate isomérase
- **IPP:** Isoprénoïde pyrophosphate
- **K-Ras:** Kirsten Ras
- **LCMC:** Laboratoire de chimie de matériaux Constantine
- **Log p :** Logarithme décimal du coefficient de partage
- **MET:** Méthionine
- **MVA:** Mévalonate (acide mévalonique)

- **N-Ras:** Neuroblastoma Ras
- **Nrotb :** Rotatable Bonds
- **OMS:** Organisation mondiale de santé
- **PPi:** Molécule de pyrophosphate
- **PSA:** Polar surface area
- **SER:** Sérine
- **SOS:** Son of sevenless
- **TRP:** Tryptophan
- **TYR:** Tyrosine
- **VdW:** Van der Waals

Liste des tableaux

Tableau 01: Pourcentage de l'expression des oncogènes RAS dans divers types de cancer humains.....	14
Tableau 02 : Exemple de chaque classe d'inhibiteurs de la FTase.....	16
Tableau 03: FTis isolés de produits naturels.....	17
Tableau 04: Distribution des flavonoïdes dans certains fruits et légumes.....	20
Tableau 05: Aglycones et hétérosides de flavonoïdes.....	21
Tableau 06: Propriétés anticancéreuses <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de quelques flavonoïdes.....	23
Tableau 07 : Valeurs des $\Delta G_{(\text{bind})}$ déduits du docking et les IC_{50} tirés de la littérature.....	36
Tableau 08 : Valeurs de ΔG_{bind} des complexes ISA4/flavonoïdes.....	37
Tableau 09 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>TIPIFARNIB/ISA4</i>	38
Tableau 10 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>FISTENE /ISA4</i>	39
Tableau 11 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>GALANGINE/ISA4</i>	40
Tableau 12 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>ISORHAMNETINE/ISA4</i>	41
Tableau 13 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>KAEMPFEROL/ISA4</i>	41
Tableau 14: Types de liaisons établies dans le complexe <i>MORINE/ISA4</i>	42
Tableau 15: Types de liaisons établies dans le complexe <i>MYRICETINE/ISA4</i>	43
Tableau 16 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>QUERCETINE/ISA4</i>	44
Tableau 17 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>RHAMNAZINE/ISA4</i>	44
Tableau 18 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>RHAMNETINE/ISA4</i>	45
Tableau 19 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>TAMARIXETINE /ISA4</i>	46
Tableau 20 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>BIS-CHALCONE/ISA4</i>	47
Tableau 21 : Types de liaisons établies dans le complexe <i>CHALCONE/ISA4</i>	48
Tableau 22 : L'application des règles de Lipinski et Veber sur la série des flavonoïdes...	49

Liste des figures

Figure 01: Sous unités de la FTase.....	06
Figure 02: Localisation du gène FNTA sur son chromosome (8p11.21).....	06
Figure 03: Localisation du gène FNTB sur son chromosome (14q23.3).....	06
Figure 04: Présentation de quelques résidus du site actif.....	07
Figure 05: Interactions du zinc dans le site actif.....	07
Figure 06: Interaction du FPP avec quelques acides aminés du site actif.....	09
Figure 07 : Illustration de la boîte CAAX.....	09
Figure 08: Les principales étapes de la farnésylation.	10
Figure 09: Mutation du gène LMNA et formation de la progérine.	11
Figure 10 : Structure primaire des quatre isoformes de la protéine RAS.....	12
Figure 11 : Maturation de la protéine RAS.....	13
Figure 12: Processus d'inhibition de la farnésylation de RAS.....	15
Figure 13 : Structure de base des flavonoïdes.....	19
Figure 14 : Les différentes classes de flavonoïdes.....	21
Figure 15 : La formation du complexe protéine-ligand.....	26
Figure 16: Les interactions électrostatiques	27
Figure 17: Les interactions de Van der Waals	27
Figure 18: Les liaisons hydrogènes	27
Figure 19: Les liaisons hydrophobes.....	28
Figure 20: Représentation des étapes du docking.....	28
Figure 21: Structure du complexe 1SA4.....	30
Figure 22 : Le tipifarnib dans le site actif de la FTase.....	38
Figure 23: Le tipifarnib avec quelques résidus de la FTase.....	38
Figure 24 : La fisétine dans le site actif de la FTase.....	39
Figure 25 : La fisétine avec quelques résidus de la FTase.....	39
Figure 26 : La galangine dans le site actif de la FTase.....	40
Figure 27 : La galangine avec quelques résidus de la FTase.....	40
Figure 28 : L'isorhamnétine dans le site actif de la FTase.....	40
Figure 29 : L'isorhamnétine avec quelques résidus de la FTase.....	41
Figure 30 : Le kaempférol dans le site actif de la FTase.....	41
Figure 31 : Le kaempférol avec quelques résidus de la FTase.....	42
Figure 32 : La morine dans le site actif de la FTase.....	42
Figure 33 : La morine avec quelques résidus de la FTase.....	42

Figure 34 : La myricétine dans le site actif de la FTase.....	43
Figure 35 : La myricétine avec quelques résidus de la FTase.....	43
Figure 36 : La quercétine dans le site actif de la FTase.....	43
Figure 37 : La quercétine dans le site actif de la FTase.....	44
Figure 38 : La rhamnazine dans le site actif de la FTase.....	44
Figure 39 : La rhamnazine avec quelques résidus de la FTase.....	45
Figure 40 : La rhamnétine dans le site actif de la FTase.....	45
Figure 41 : La rhamnétine avec quelques résidus de la FTase.....	45
Figure 42 : La tamarixétine dans le site actif de la FTase.....	46
Figure 43 : La tamarixétine avec quelques résidus de la FTase.....	46
Figure 44 : La bis-chalcone dans le site actif de la FTase.....	47
Figure 45 : La bis-chalcone avec quelques résidus de la FTase.....	47
Figure 46 : La chalcone dans le site actif de la FTase.....	48
Figure 47 : La chalcone avec quelques résidus de la FTase.....	48

Introduction générale

Le cancer est devenu un problème de santé mondiale. D'après les données de l'OMS, plus de 8,2 millions de personnes en sont décédées en 2012¹ et le nombre croissant de nouveaux cas risque de passer à 21,6 millions d'ici 2030².

En Algérie, plus de 40.000 nouveaux cas sont recensés annuellement dont la moitié sont des femmes³.

Ces données alarmantes indiquent la nécessité de mettre en œuvre des outils thérapeutiques puissants pour lutter contre le cancer.

Les approches utilisées jusqu'à présent pour traiter cette pathologie entraînent de nombreux effets indésirables et parallèlement, certaines cellules tumorales ont réussi à développer une résistance vis-à-vis des substances chimiques employées, les rendant ainsi hautement invasives et immortelles.

Sur la base d'études des processus moléculaires de l'oncogénèse, une nouvelle approche est actuellement en vogue: la thérapie ciblée qui vise à développer une gamme de substances anti-tumorales dont l'activité est l'inhibition spécifique d'une ou plusieurs protéines impliquées dans la tumorigénèse.

Une des cibles de cette stratégie est une métallo-enzyme à zinc, la farnésyl transférase (FTase). Cette dernière catalyse une modification post-traductionnelle entraînant la transformation de diverses protéines, notamment la protéine RAS. Cette dernière constitue l'oncogène le plus fréquemment muté dans les processus tumoraux avec une proportion qui peut atteindre 90% dans le cancer du pancréas. Ces données font de la FTase une cible à privilégier pour le blocage indirect des dommages causés par la RAS. En effet, la conception d'inhibiteurs de la FTase va permettre la naissance d'une nouvelle classe d'agents anticancéreux.

Diverses molécules de synthèse ont prouvé leur efficacité dans l'inhibition de la FTase mais au vu de quelques uns de leurs effets secondaires, les chercheurs se tournent de plus en plus vers les produits naturels. Parmi ces derniers, les flavonoïdes, composés issus du métabolisme secondaire des plantes qui, grâce à leur pouvoir antioxydant, possèdent diverses activités biologiques dont la prévention et le traitement du cancer, d'où l'intérêt qui leur est porté pour jouer le rôle d'inhibiteurs potentiels de la FTase.

¹<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>

²<https://www.iarc.fr/fr/media-centre/pr/2014/>

³<http://www.djazairress.com/>

Partant de ce constat, une série de flavonoïdes sont mis à contribution pour évaluer leur affinité vis-à-vis de la FTase en utilisant un moyen de bioinformatique : le docking moléculaire. Cet outil est largement employé dans les domaines de la biologie pour étudier les interactions entre une petite molécule, le ligand, et un récepteur connu, la protéine lors de la formation du complexe moléculaire.

Cette simulation *in silico* (docking moléculaire) entre l'enzyme et le ligand est considérablement plus facile et plus rapide à mettre en œuvre et coûte moins chère que l'utilisation des méthodes expérimentales. Elle reste une bonne alternative qui permet à la recherche en pharmacologie d'avancer plus vite.

Le docking moléculaire vise à prédire la formation du complexe le plus stable résultant de la protéine et du ligand pris séparément. Aussi, l'affinité de liaison entre les deux doit être élevée. L'avantage essentiel de cette approche est la mise en évidence des propriétés structurales et énergétiques de l'architecture moléculaire ainsi constituée.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire **LCMC (Laboratoire de Chimie des Matériaux Constantine)** et se décline en trois parties:

La première consiste en une description détaillée de la cible enzymatique choisie, la farnésyl transférase en exposant sa structure, son mécanisme catalytique et son rôle en tant que cible thérapeutique.

Dans la deuxième partie seront présentés les flavonoïdes, leurs structures chimiques, leurs localisations, leur classification et leurs propriétés biologiques.

La troisième partie aborde la stratégie mise en application pour tester le pouvoir inhibiteur des flavonoïdes vis-à-vis de la FTase en réalisant une étude *in silico*. Ce chapitre débute par une description générale du docking moléculaire (son principe, ces étapes) et se termine par une interprétation des résultats obtenus grâce à l'utilisation du logiciel libre ArgusLab 4.01⁴ pour le docking et le programme Discovery Studio 4.0 Client⁵ pour la visualisation et l'analyse des interactions.

⁴<http://www.ArgusLab.com>

⁵<http://www.Discovery-Studio-Client.com>

Chapitre I :

La farnésyl transférase

I.1. Introduction

Identifiée en 1990 par l'équipe de recherche de REISS (**REISS et al., 1990**), la farnésyl transférase (FTase) est présente chez un grand nombre d'espèces, y compris les mammifères (**BOS., 1989 ; YOKOYAMA et al., 1993**), les champignons (**VALLIM et al., 2004**), les plantes (**QIAN et al., 1996 ; CALDELARI et al., 2001**) et les protistes (**CHAKRABARTI et al., 1998**).

Elle catalyse la modification post-traductionnelle de plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire dont l'oncogène RAS. Ce dernier, présent dans 30% des cancers ne s'active que si un groupement farnésyl se fixe sur son extrémité C terminal (**PRIOR et al., 2012 ; PYLAYEVA-GUPTA et al., 2014**).

La compréhension du processus de cette modification permet de mettre au point des stratégies pour lutter contre le cancer ainsi que certaines pathologies où la farnésyl transférase est impliquée. En effet, depuis la découverte de cette dernière, les chercheurs de différents pays ont en fait une cible privilégiée et s'attèlent à lui trouver des inhibiteurs adéquats (**ASHAR et al., 2000 ; SINENSKY., 2000 ; SOUSA et al., 2008 ; MOORTHY et al., 2016**).

I.2. Description de la farnésyl transférase

La farnésyl transférase (FTase) est l'une des trois enzymes rattachées au groupe des prényl-transférases. C'est une protéine hétérodimérique dont le site actif contient deux éléments (**zinc, magnésium**) appartenant au bloc des métaux de transition, d'où son appellation de métallo-enzyme.

I.2.1. Structure

Quelque soit l'origine de la FTase, elle est toujours composée de deux sous-unités (**Figure 01**). Chacune d'elles est codée par un gène différent et se distingue par un repliement spécifique (**SHEN et al., 2015**).

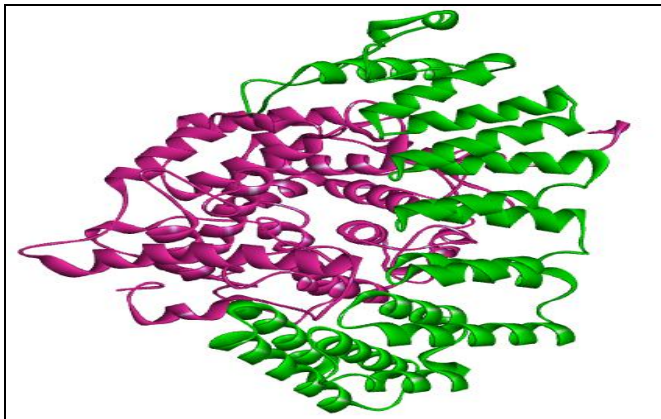


Figure 01: Sous unités de la FTase : La sous-unité β est en «en rose», la sous-unité α « en vert »

I.2.1.1. Sous-unité α

Cette sous-unité catalyse la réaction de prénylation (**MAURER-STROH et al., 2007**). Avec un poids moléculaire de 49 kDa, elle est codée par le gène **FNTA** (Farnesyltransferase, CAAX Box, Alpha). Ce dernier, localisé sur le chromosome 8 (8p11.21) (**Figure 07**), est constitué de 9 exons et 8 introns.

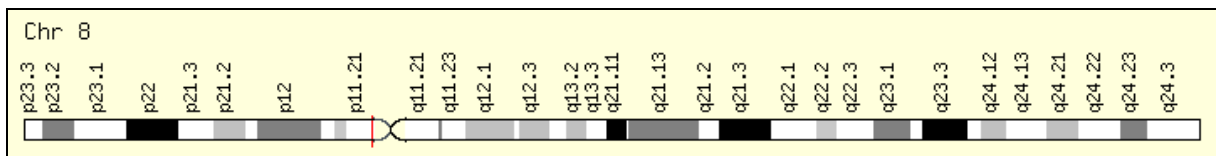


Figure 02: Localisation du gène FNTA sur son chromosome (8p11.21)⁶

I.2.1.2. La sous-unité β

De masse 46 kDa, cette sous-unité contient les sites de fixation du substrat peptidique (boite CAAX) et celui de la chaîne isoprénoïde (FPP) (**SINENSKY., 2000**). Son gène codant, **le FNTB** (Farnesyltransferase, CAAX Box, Beta), est porté par le chromosome 14 (14q23.3) (**Figure 08**) et se compose de 12 exons et 11 introns.

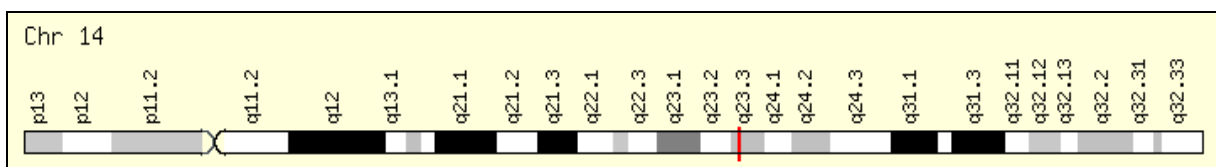


Figure 03: Localisation du gène FNTB sur son chromosome (14q23.3)⁶

⁶<http://www.genecards.org/>

I.2.2. Site actif de la FTase

Le site catalytique de la FTase se trouve à la jonction des deux sous-unités α et β de l'enzyme (**Figure 04**). Il comporte deux poches de nature très différente correspondant aux emplacements de liaison de petits peptides substrats CAAX et le groupement farnésyl (FPP).

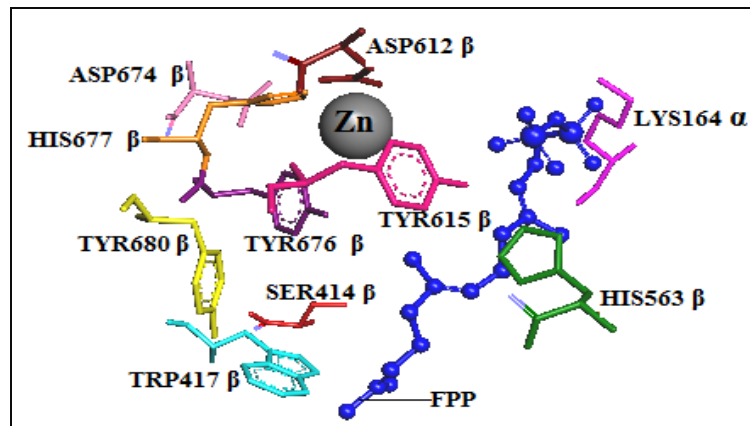


Figure 04: Présentation de quelques résidus du site actif

Il contient un atome de zinc et un atome de magnésium (LONG *et al.*, 2002). Ces deux entités jouent un rôle important au sein du site actif:

- **Le zinc**, indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme est relié à la sous-unité β par trois acides aminés : Asp 297, Cys 299 et His 362. Il est essentiel à la fixation du motif CAAX, se lie au soufre de la cystéine et abaisse le pKa de la fonction thiol facilitant ainsi l'attaque sur le C-1 du FPP pour conduire à la protéine farnésylée (TOBIN *et al.*, 2003).

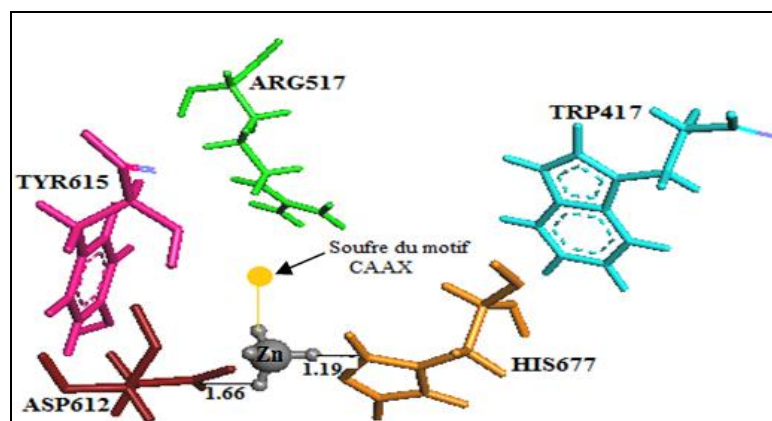


Figure 05: Interactions du zinc dans le site actif

- **Le magnésium** n'est pas nécessaire à la catalyse ou à la liaison du substrat à la FTase mais sa présence, à une concentration milli-molaire, accélère *in vitro* la réaction enzymatique (YANG *et al.*, 2010). En se fixant à l'acide aspartique 352 β , le magnésium lie le groupement diphosphate du FPP dans l'enzyme (LONG *et al.*, 2002).

I.3. Mécanisme réactionnel catalysé par la FTase

La protéine farnésyltransférase (FTase) joue un rôle spécifique dans la cellule. Elle est indispensable à la maturation et l'activation de plus de 60 protéines impliquées dans la transduction du signal du réseau intracellulaire.

I.3.1. Rôle de la FTase

La FTase catalyse la fixation d'une chaîne lipidique de 15 atomes de carbone. Ce radical, nommé farnésyl, est indispensable à l'acquisition de l'hydrophobie requise pour l'ancrage de certaines protéines (RAS) à la membrane cytoplasmique où elles effectuent l'essentiel de leurs fonctions physiologiques (BARBAR *et al.*, 2014 ; JAYASHREE *et al.*, 2015).

1.3.2. Substrats de la FTase

Pour remplir ses fonctions, la FTase doit fixer les deux substrats FPP et CAAX au niveau du site actif :

-FPP (farnésyl pyrophosphate)

Le groupement farnésyl transféré aux protéines est le produit de la voie métabolique du mévalonate (DHAR *et al.*, 2013). Ce dernier subit deux phosphorylations successives ainsi qu'une décarboxylation conduisant à la formation de l'unité isoprénique : isopentényl diphosphate (IPP), formé de cinq atomes de carbones (WITHERS *et al.*, 2007).

Le FPP est obtenu suite à la condensation de trois unités isopréniques par l'intervention d'une FPP synthase (FPPS) (BARBAR *et al.*, 2014). Ainsi, la chaîne FPP est de 15 carbones (Figure 06).

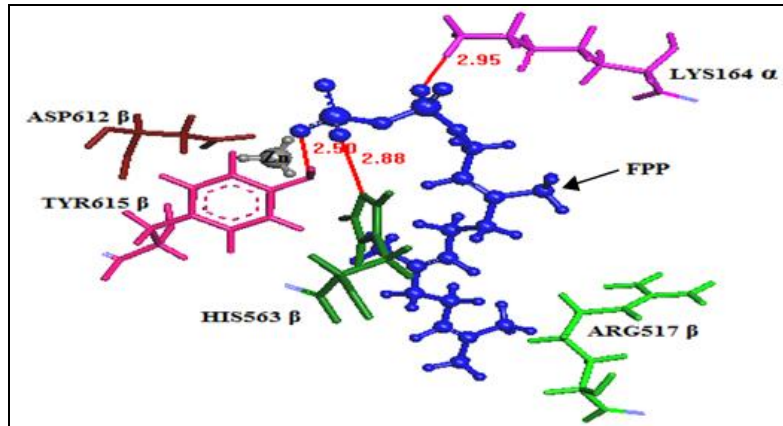


Figure 06: Interaction du FPP avec quelques acides aminés du site actif

-La Boite CAAX (Figure 07)

Ce petit substrat peptidique localisé dans l'extrémité C terminale des protéines cibles des enzymes de prénylation sert de catalyseur en intervenant dans l'**Etape 3** de la farnésylation (§ I.3.3) (Mc TAGGART et al., 2006).

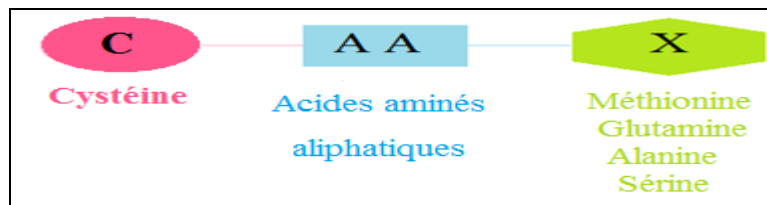


Figure 07 : Schéma représentant la boite CAAX

I.3.3. Les étapes de la farnésylation

Le mécanisme de farnésylation s'effectue en quatre étapes bien distinctes:

Etape 1 = Attachement du FPP à la FTase (Park et al., 1997) et assemblage du complexe binaire E-FPP (LONG et al., 1998).

Etape 2 = Reconnaissance du motif CAAX par la FTase et formation du complexe ternaire réactif (SINENSKY et al., 2000).

Etape 3 = Liaison du soufre de la cystéine (de la boite CAAX) au carbone C1 du FPP formant le peptide farnésylé puis libération d'une molécule de pyrophosphate (PPi).

Etape 4 = Fixation d'une nouvelle molécule de FPP déplaçant le peptide farnésylé vers une poche de sortie appelé « exit groove» (LONG *et al.*, 2002).

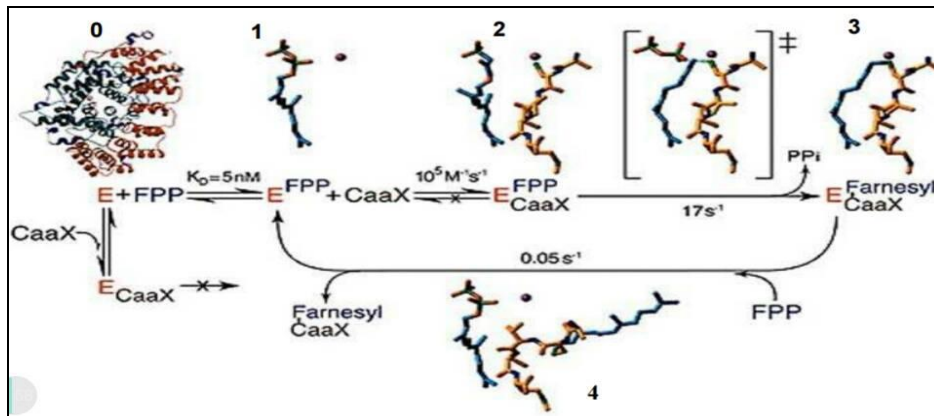


Figure 08: Les principes étapes de la farnésylation : **0**: Structure de la FTase sans ligand ; **1**: l'atome de zinc (en violet) et le FPP (en bleu) liés à la FTase ; **2**: le peptide substrat mimant la « boîte CAAX » (en jaune) avec le FPP formant le complexe ternaire réactif ; **3**: le produit farnésylé lié dans le site catalytique ; **4**: le produit de la farnésylation avec une nouvelle molécule de FPP (LONG *et al.*, 2002)

La farnésylation est suivie par une protéolyse et une méthylation qui confère une efficacité à la protéine cible. La première modification est un **clivage** des trois acides aminés en aval de la cystéine. La seconde, catalysée par une méthyltransférase, fixe un radical méthyl au groupement α -carboxyl de la cystéine. Ces transformations donnent naissance à une protéine possédant une extrémité C-terminale S-farnésyl cystéine α -méthyl ester (BARBAR *et al.*, 2014).

I.4. FTase, cible thérapeutique

L'implication de protéines farnésylées dans plusieurs pathologies est à l'origine de l'intérêt porté à la FTase en tant que cible thérapeutique. Cette dernière a d'abord été étudiée pour la lutte contre le cancer (VAN VOORHIS *et al.*, 2006). Plus récemment les inhibiteurs de la FTase (FTis) ont révélé une efficacité dans le traitement antiparasitaire ou pour soulager quelques symptômes de progéria (CAU *et al.*, 2013 ; SINGH *et al.*, 2016).

I.4.1. FTase et traitement antiparasitaire

La découverte du phénomène de prénylation chez certains parasites a permis d'utiliser les FTis comme agents antiparasitaires contre certaines infections telles que la:

- maladie africaine du sommeil (*Trypanosoma brucei*) (EASTMAN *et al.*, 2006).

- maladie de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) (BUCKNER *et al.*, 2012).
- leishmaniose (*Leishmania major*) (SINGH *et al.*, 2016).
- malaria (*Plasmodium falciparum*) (SONI *et al.*, 2016).
- toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) (RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

I.4.2. FTase et syndrome progéroïde

La Progéria est une maladie rare et sévère décrite pour la première fois par Hutchinson en 1897. Elle mime les caractéristiques cliniques et moléculaires de la vieillesse. Ce syndrome est la conséquence de la mutation du gène LMNA codant pour la lamine A conduisant à la formation d'une protéine tronquée appelée « progérine », où manquent une cinquantaine d'acides aminés du côté C-terminal (CAU *et al.*, 2013).

L'absence de ces acides aminés se traduit par une modification structurale qui :

- **empêche le clivage** du groupement farnésyle
- **entraîne l'accumulation** de progérines farnésylées
- **provoque des anomalies** au niveau de l'enveloppe nucléaire

Des chercheurs ont montré que l'utilisation des FTis inhibe fortement l'accumulation de progérine et partiellement la farnésylation de la Lamine A par conséquent, ils améliorent le phénotype des cellules et bloquent l'évolution clinique de la maladie (CAU *et al.*, 2013).

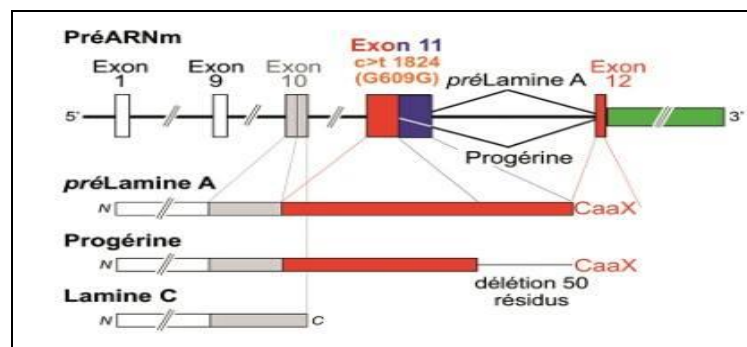


Figure 09: Mutation du gène LMNA et formation de la progérine (CAU *et al.*, 2013)

I.4.3. FTase et cancer

L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter le cancer est devenue une priorité. L'une des approches développées consiste à bloquer la modification post-traductionnelles des protéines les plus impliquées dans les pathologies. A titre d'exemple, la RAS farnésylée est signalée par certains chercheurs comme étant la plus fréquente vu

son association dans la plupart des événements de la transformation cellulaire comme la prolifération, la survie et l'invasion métastatique (CHEN *et al.*, 2013 ; GHASEMI *et al.*, 2015 ; Mc CORMICK *et al.*, 2016).

I.4.3.1. Structure de la protéine RAS

RAS appartient à la famille des GTPase qui se caractérisent par une activité enzymatique intrinsèque responsable de l'hydrolyse du GTP en GDP d'où le nom GTPases (AHEARN *et al.*, 2012).

Chez l'Homme, la protéine RAS est codée par 21 gènes différents mais seuls H-RAS, N-RAS et K-RAS sont importants. Ils codent pour 4 protéines de 21 KDa qui portent les mêmes noms que leurs gènes: H-RAS, N-RAS, K-RAS 4A et K-RAS 4B. Ces isoformes sont à forte homologie : ils possèdent les mêmes domaines globulaires dans leur partie N terminale où se trouve le site de fixation du GTP ou GDP mais diffèrent par leur extrémité C terminale qui est une région hypervariable réservée aux modifications post-traductionnelles de la protéine (KIMMELMAN *et al.*, 2014).

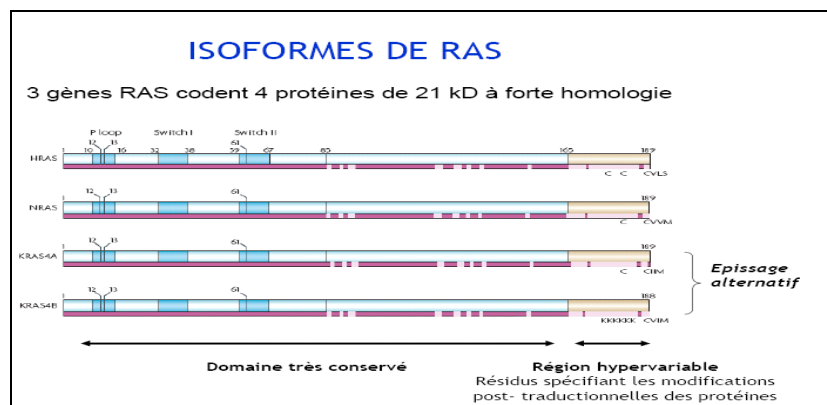


Figure 10 : Structure primaire des quatre isoformes de la protéines RAS (TANIGUCHI *et al.*, 2006)

I.4.3.2. Modification post/traductionnelle de la protéine RAS

La RAS subit des modifications post-traductionnelles catalysées par diverses enzymes qui lui permettent de changer sa localisation cellulaire et par conséquent son interaction avec d'autres molécules. Selon AHEARN et son équipe ces modifications sont réalisées en 4 étapes:

1^{ère} étape: Elle a lieu dans le cytoplasme où la FTase fixe un groupement farnésyl sur la cystéine de la boîte CAAX de la RAS.

2^{ème} étape: Elle se réalise au niveau du réticulum endoplasmique où les 3 derniers acides aminés de l'extrémité C terminale de la protéine sont clivés par une protéase. La cystéine farnésylée devenue C terminale est méthylée par l'enzyme ICMT (isoprénycystéine carboxyméthyl transférase).

3^{ème} étape: Elle s'effectue dans l'appareil de Golgi où les protéines H-RAS, N-RAS et K-RAS 4A sont palmitoylées alors que K-RAS 4B se fixe directement sur la membrane.

4^{ème} étape: Elle représente l'achèvement de la maturation de la protéine. L'hydrophobie que cette dernière a acquise dans la 2^{ème} étape lui assure son ancrage au niveau de la membrane plasmique où elle accomplit ces fonctions biologiques (AHEARN et al., 2012).

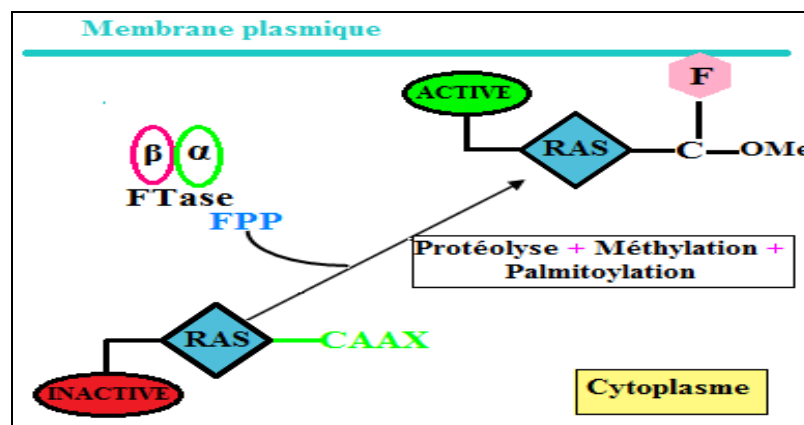


Figure 11 : Maturation de la protéine RAS

Une fois activée, la RAS mature joue le rôle d'un commutateur moléculaire pour transmettre les signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

I .4.3.3. Activation des voies de signalisation liées à la protéine RAS

RAS est induite en réponse à des signaux environnementaux par des récepteurs à activité tyrosine kinase. A la suite de la fixation d'un ligand (hormone, facteur de croissance), le récepteur se dimérise et s'autophosphoryle pour recruter les protéines GEF (Guanine Nucléotide Exchange Factors) qui sont le Grb2 et le SOS. Ces derniers forment un complexe permettant le remplacement du GDP par le GTP et l'activation de RAS qui, à son tour, stimule plusieurs voies dont la prolifération et la survie des cellules (CASTELLANO et al., 2011).

I.4.3.4. RAS et oncogénèse

Selon **Mc CORMICK**, 30% des cancers humains présentent une mutation de l'un des 3 proto-oncogènes N-RAS, H-RAS ou K-RAS. Ce dernier est le plus fréquemment altéré (**Mc CORMICK., 2016**).

Les mutations de RAS sont ponctuelles et de type faux sens ; elles touchent les codons 12, 13 et 61. Ceci a pour conséquence l'inhibition de la liaison entre les protéines RAS et leur GAP (mutations de G12 et G13) ou la perte de leur activité GTPasique intrinsèque (mutation Q61). Ces altérations donnent à RAS un pouvoir oncogénique responsable d'une accumulation de sa forme active et une prolongation anormale de sa signalisation.

La RAS mutée est identifiée dans divers types de cancers. Le **Tableau 01** indique la fréquence des différents types de tumeurs où la RAS mutée est impliquée.

Type de cancer	% des cancers impliquant RAS mutés	Type de gènes mutés	Références
Adénocarcinome du poumon	35%	K	BAINES et al., 2011.
Cancer colorectal	30 à 50%	K	Kim et al., 2012.
Adénocarcinome du pancréas	90%	K	PRIOR et al., 2012.
Carcinome de la thyroïde	55%	K, N, H	DER et al., 2015.
Leucémie aigue lymphoblastique	15%	K, N	SHIEH et al., 2013.

Tableau 01: Pourcentage de l'expression des oncogènes RAS dans divers types de cancers humains

La mutation de RAS est insuffisante à la transformation cellulaire. Cet oncogène doit d'abord subir une farnésylation permettant sa fixation à la membrane plasmique et le transfert des signaux tumoraux. Cette relation entre RAS farnésylée et cancer a conduit au développement d'inhibiteurs de la FTase. L'utilisation de ces derniers bloque l'activité de RAS en l'empêchant de s'associer à la membrane plasmique. Ce processus entraîne la diminution de la survie et limite la prolifération des cellules issues de la lignée tumorale (**PRIOR et al., 2012**).

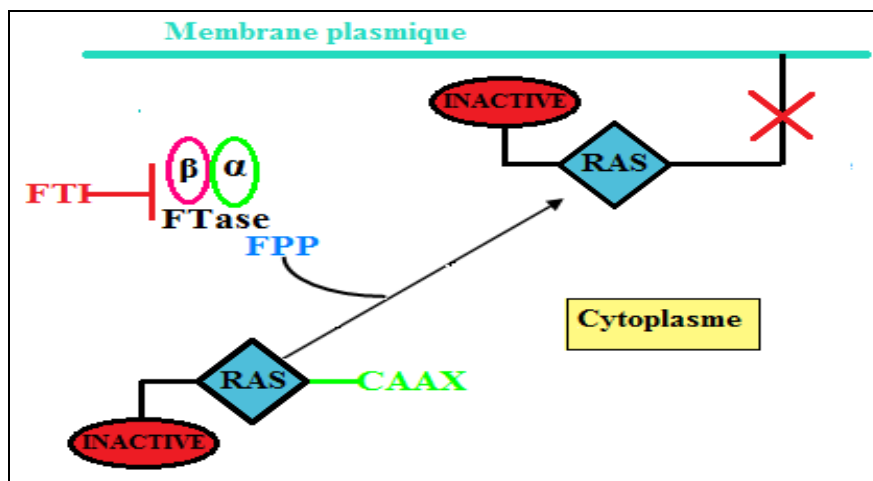


Figure 12: Processus d'inhibition de la farnésylation de RAS

I.5. Les inhibiteurs de la FTase

Depuis 1993, de nombreux inhibiteurs compétitifs spécifiques de la FTase ont été conçus. Plusieurs travaux ont confirmé l'efficacité des FTis sur plusieurs niveaux :

- Inhibition de la transformation
- Induction de l'apoptose
- Contrôle de l'angiogénèse.

Ces FTis ont été identifiés selon deux approches (**DHAR et al., 2013**) :

- l'une, nommée rationnelle, utilise des analogues des substrats de l'enzyme à savoir la boîte CAAX et le FPP
- l'autre, dite aléatoire consiste en un criblage de chimiothèques de produits synthétiques ou naturels.

I.5.1. Approche rationnelle :

Trois grandes classes de FTis ont été développées selon cette approche. Dans le **Tableau 02** sont proposés des exemples de chacune d'elles.

I.5.2. Approche aléatoire

Par le biais de cette approche, deux types de composés ont été testés:

I.5.2.1 Composés synthétiques

Deux composés obtenus par criblage de molécules synthétiques sont déjà commercialisés:

R115777 (Tipifarnib ou Zarnesta®)

Conçu au départ comme agent antifongique, le R115777 inhibe la farnésylation de la K-RAS ($IC_{50} = 7,9 \text{ nM}$) et celle de la lamine B ($IC_{50} = 0,8 \text{ nM}$).

SCH66366 (Lonafarnib ou Sérasar®)

Cette substance inhibe respectivement la farnésylation de H-RAS et K-RAS avec un IC_{50} de 1,9 et 5,2 nM.

Tableau 02 : Exemple de chaque classe d'inhibiteurs de la FTase

	Mode d'action	Exemples	Description
Classe I	inhibiteur compétitif du FPP	<p>1 : E,E,E-HFP IC_{50} (FTase de bovin) = 5,2 nM IC_{50} (p. <i>falciapurum</i>) = 100 nM</p>	<p>Acide E,E,E α-hydroxyfarnésylphosphonique :</p> <p>-Analogue de FPP où la tête pyrophosphate est remplacée par un groupement monophosphate.</p>
Classe II	inhibiteur compétitif de la boîte CAAX	<p>24 : BMS-193269 IC_{50} (FTase de porc) = 0,79 nM</p>	<p>L739, 750 :</p> <p>-Analogue du térapeptide CAAX obtenu par la substitution de la liaison peptidique centrale par une liaison éther.</p>
Classe III	Inhibiteur bisubstrat : compétitif à la fois du FPP et de la boîte CAAX	<p>48 : BMS-184467 IC_{50} (FTase de porc) = 6,2 nM</p>	<p>BMS-184467</p> <p>-Obtenu par hybridation des deux substrats de la FTase</p> <p>-constitué d'une chaîne farnésyle reliée à un tripeptide VVM.</p>

I.5.2.2. Composés naturels

L'utilisation de molécules synthétiques entraîne parfois des effets secondaires pour la santé, d'où l'intérêt porté aux composés d'origine naturelle dont la sélection pour telle ou telle activité biologique se fait grâce au criblage de chimiothèques de produits naturels isolés de microorganismes ou de plantes. Dans le **Tableau 03** sont présentées quelques biomolécules dont le pouvoir inhibiteur de la FTase est prouvé par plusieurs équipes de recherche.


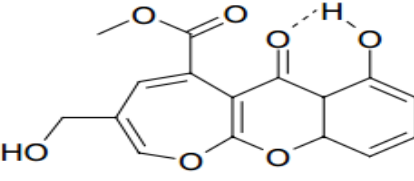
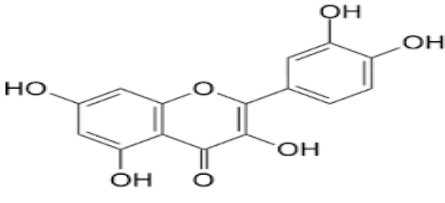
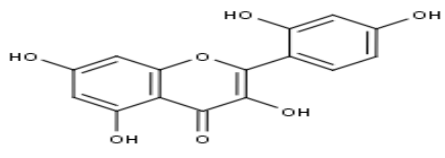
Inhibiteur FTase	IC ₅₀	Structure	Référence
Acide chaetomellique A	50 nM		SILVERMAN <i>et al.</i> , 1998.
Fusidiénol	300 nM		QIAN <i>et al.</i> , 1997.
Quercétine	5 µg/ml		KANG <i>et al.</i> , 2004
Morine	6 µg/ml		KANG <i>et al.</i> , 2004.

Tableau 03: FTis isolés de produits naturels

Chapitre II

Les flavonoïdes

II.1.Introduction

Les flavonoïdes appartiennent au groupe des polyphénols qui avec plus de 10.000 structures identifiées reste la famille la plus riche du règne végétal (WESTON et al., 2013). Ils sont considérés comme des nutraceutiques possédant plusieurs propriétés thérapeutiques d'où l'intérêt qui leur est porté. Plusieurs études ont démontré la capacité de cette catégorie de composés à prévenir voire traiter certaines pathologies y compris le cancer (BONFILI et al., 2008 ; MEDIC et al., 2009 ; ZIAEE et al., 2009 ; ZANDI et al., 2011).

II.2.Description générale

Avec plus de 5000 molécules décrites, les flavonoïdes sont des pigments synthétisés par les végétaux au cours de leur métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales (WESTON et al., 2013). Ils possèdent une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutique, cosmétique et alimentaire (LIWEBER et al., 2009). Ils participent dans les processus photosynthétiques, la régulation de gènes et le métabolisme de croissance (MEDIC et al., 2009).

II.2.1. Structure chimique

Les flavonoïdes possèdent tous un même squelette de base à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) (EDENHARDER et al., 2003). Il est constitué de deux noyaux aromatiques, désignés par les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, appelé cycle C (DACOSTA et al., 2003). Ces trois cycles peuvent porter des fonctions alcools libres, éthers ou glycosides (DACOSTA, 2003)

Les flavonoïdes dérivent de la biosynthèse d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6' tétrahydrochalcone. Cette dernière est métabolisée en différentes classes sous l'action successive d'enzymes (BRUNETON, 2009).

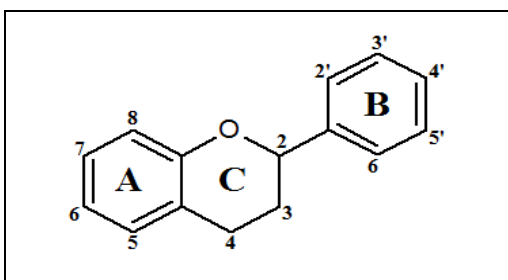


Figure 13 : Structure de base des flavonoïdes

II.2.2. Répartition et localisation

Les flavonoïdes, composés largement répandus chez les végétaux, se localisent dans les différentes parties de plantes (tiges, feuilles, pollen, graines, ...etc) selon le type de l'espèce (HENDRICH, 2006). Leur présence est influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales (LUGASI et al., 2003).

Même s'ils restent des constituants caractéristiques du règne végétal, il peuvent parfois se retrouver dans la sécrétion odoriférante du castor, la propolis de l'abeille ou la coloration des ailes de papillons (MARKHAM et al., 1982).

Les flavonoïdes sont particulièrement abondants chez des représentants de certaines familles végétales. Qu'ils soient sauvages ou cultivés, les légumes et fruits sont riches en composés flavoniques. Le **Tableau 04** suggère quelques sources de flavonoïdes :

Flavonoïdes	Aliments
Flavonols	
Quercétine	Oignon, pomme, olive, tomate
Rutine	Thé noir
Flavones	
Apigénine	Persil, thym, romarin, céleri
Lutéoline	Persil, céleri
Flavonones	
Naringénine	Fruits de genre citrus
Hespéridine-7-rhamnoglucoside (hespéridine)	Jus d'orange
Flavan-3-ols	
Epicatéchine	Thé vert, thé noir
Catéchine	Thé vert, thé noir, pomme
Isoflavones	
Génistéine-7-glucoside	Haricots verts, pois chiches

Tableau 04: Distribution des flavonoïdes dans certains fruits et légumes

II.3. Classification des flavonoïdes

Selon la voie de leur biosynthèse, les flavonoïdes sont classés sous différentes catégories.

Il vont différer entre eux par le nombre et la position des groupements hydroxyles (YAO et al., 2004 ; TSIMOGIANNINS et OREOPOULOU, 2006).

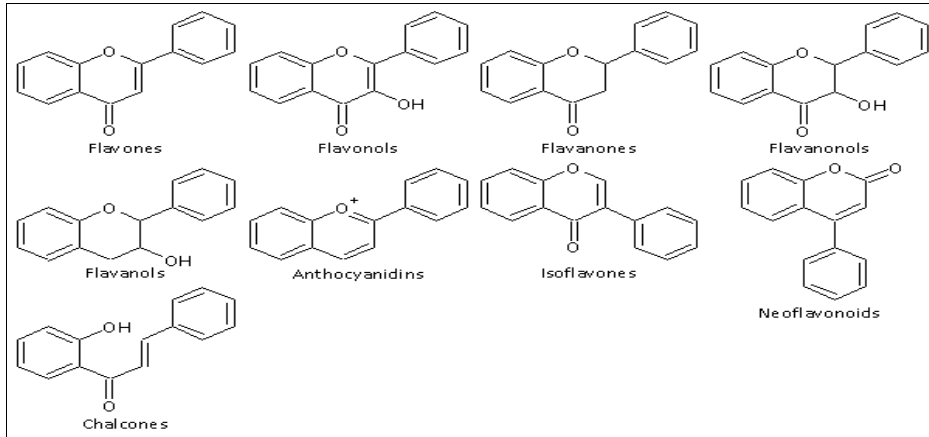


Figure 14 : Les différentes classes de flavonoïdes⁷

Les flavonoïdes peuvent exister sous forme d'aglycone ou d'hétérosides selon les substituants présents sur la génine (KUMAR et al., 2013).

Hétéroside	Aglycone
<p>Isorhamnétine 3-glucoside</p>	<p>Isorhamnétine</p>
<p>Kaempférol 3-glucoside</p>	<p>Kaempférol</p>
<p>Quercétine 3-glucoside</p>	<p>Quercétine</p>

Tableau 05: Aglycones et hétérosides de flavonoïdes

⁷<http://www.tuscany-diet.net/>

II.4.Intérêt biologique des flavonoïdes

La plupart des activités biologiques des flavonoïdes sont dues à leur pouvoir antioxydant (NAKAGAWA *et al.*, 2000). Ces molécules interviennent dans le processus de régulation du stress oxydant en piégeant les radicaux libres, chélatant les métaux de transition comme le fer et inhibant l'activité de certaines enzymes (xanthine oxydase, oxyde nitrique synthase) (PETERSON *et al.*, 1998 ; NIJVELDT, 2001 ; XIE *et al.*, 2015).

En effet, les flavonoïdes ont démontré plusieurs activités pour la prévention ou le traitement de certaines pathologies parmi lesquelles:

- Activité anti-fongique, anti-virale et anti-bactérienne (CUSHNIE *et al.*, 2005 ; ZANDI *et al.*, 2011 ; WU *et al.*, 2013).
- Activité anti-inflammatoire (MEDIC *et al.*, 2009 ; FU *et al.*, 2013).
- Activité anti-tumorale (ZHOU *et al.*, 2013 ; WEN *et al.*, 2014).
- Activité cardioprotectrice (GARCIA-LAFUENTE *et al.*, 2009).
- Cataracte chez les diabétiques (MAHMOUD *et al.*, 2015).
- Inhibition de l'hypercholestérolémie (CHANETA *et al.*, 2012).
- La goutte par l'inhibition de la xanthine oxydase (SPANOUÉ *et al.*, 2012 ; CAO *et al.*, 2014 ; LIN *et al.*, 2015).
- Hypertension (CUSHNIE *et al.*, 2005).
- Diabète par l'inhibition de l'aldose réductase (YAO *et al.*, 2004 ; MERCADER *et al.*, 2008 ; SHARMA *et al.*, 2008).
- Allergie (CUSHNIE *et al.*, 2005 ; SHARMA *et al.*, 2008 ; MERCADER *et al.*, 2008).

II.4.1.Activité anti-tumorale

Exerçant un effet bénéfique sur plusieurs mécanismes clés impliqués dans la pathogenèse du cancer, les flavonoïdes sont actuellement considérés comme des composés possédant un fort potentiel alternatif au traitement chimique. Effectivement, un certain nombre d'entre eux se sont avérés efficaces dans la prévention et la thérapeutique du cancer.

Cette activité anti-tumorale est le résultat des propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui préviennent les dommages causés par les ERO issus de processus métaboliques et sont responsables d'altérations génétiques, l'une des causes du cancer (WEN *et al.*, 2014).

In vitro, les flavonoïdes jouent le rôle d'agents antiprolifératifs et cytotoxiques contre les lignées cellulaires cancéreuses. Le **Tableau 06** résume les résultats de quelques études sur l'effet anticancéreux des flavonoïdes :

Flavonoïdes	Cibles	Résultats	Références
Quercétine	Cellules cancéreuses SK-Br3 et MDA-MB- 435	<i>In vivo</i> : activité antiproliférative Arrêt du cycle cellulaire en phase G1	JEONG et al., 2009
Rutine	Cellules leucémiques murines WEHI-3	<i>In vivo</i> : inhibition des cellules cancéreuses dans le foie et la rate des souris	LIN et al., 2009
Apigénine Lutéoline Quercétine	Cellules jurkat T, 22Rv1 et MDA-MB-231	<i>In vitro</i> : mort cellulaire par apoptose <i>In vivo</i> : inhibition de la croissance de tumeur	CHEN et al., 2008
Apigénine	Cellules cancéreuses MDHA-2774	<i>In vivo</i> : inhibition du cycle cellulaire en phase S et M /G2 Induction de l'apoptose des cellules	CHANG et al., 2008
Naringénine <i>Kaempferol 3-O-glucopyranoside</i>	Cellule MCF7	Activité antiproliférative	SUSANTI et al., 2007

Tableau 06: Propriétés anticancéreuses *in vivo* et *in vitro* de quelques flavonoïdes

D'autres travaux de recherche ont montré que les composées phénoliques intervenaient dans l'inhibition des différents stades de cancer : l'initiation, la promotion et la progression. Ils sont également, capables d'augmenter l'expression des composants pro-apoptotiques et par conséquent prévenir ou éliminer le cancer (NIJVELDT et al., 2001 ; PLOCHMANN et al., 2007).

II.5. Flavonoïdes VS FTase

Vu l'implication de la FTase dans le processus tumoral, son inhibition est devenue une cible prometteuse pour les chercheurs qui essaient d'identifier et de concevoir des agents anticancéreux. Parmi ces derniers, les flavonoïdes ont révélé une certaine efficacité vis-à-vis de l'éradication de cellules cancéreuses.

En effet, un travail de recherche effectué *in vitro* sur l'isorhamnétine isolé de *Persicaria Thunbergii*, a démontré que cette molécule inhibait la FTase avec un IC₅₀ de 37.5 µM (MI OH et al., 2005).

Dans une étude réalisée cette fois-ci par HYUN MI KANG et son équipe, 21 molécules représentant les sept classes de flavonoïdes, sont testées. Les flavonols se classent en tête de liste avec la plus forte inhibition. Sa valeur, déduite à partir de ce travail a donné des IC₅₀ de 5, 6 et 7 µg/ml, respectivement pour la quercétine, la morine et la myricétine (KANG et al., 2004). Ces résultats sont corroborés trois ans plus tard par MYOUNG-CHONG et ses collaborateurs. Selon eux, la naringénine, la quercétine, la quercitrine et l'isoquercitrine isolés de *Trapa pseudoincisa* présentent une action inhibitrice sur la FTase (SONG et al., 2008).

D'après une recherche plus récente effectuée sur un composé flavonique (theaflavine) extrait de *Camellia sinensis* (thé) et son effet comme agent anticancéreux, BALAJEE et DHANA ont établi que cette molécule bloquait l'expression de la FTase. Une étude comparative réalisée *in silico* entre le theaflavine et le tipifarnib (une molécule de synthèse utilisée actuellement comme inhibiteur de la FTase) leur a permis de conclure que la molécule flavonique exhibait une activité inhibitrice plus forte que celle du tipifarnib (BALAJEE et al., 2011).

Chapitre III

Interactions FTase/ flavonoïdes:

Résultats de l'étude *in silico*

III.1. Introduction

L'emploi des outils de l'informatique dans la recherche en biologie, chimie et médecine est devenu incontournable. Une des applications de la bioinformatique utilisée actuellement est le docking ; celui-ci est une méthode de modélisation moléculaire qui, à travers une simulation permet de prédire l'interaction entre une protéine et un ligand. Ce criblage rend possible la sélection des molécules dont l'activité biologique est la plus probable.

Cette technique d'étude *in silico* est plus rapide, plus efficace et moins coûteuse par rapport aux méthodes expérimentales classiques.

III.2. Définition du docking

Le docking (ancrage ou amarrage) est l'expression donnée aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches chimique, physique et biologique sont combinées pour étudier au niveau atomique les interactions entre deux molécules (YU *et al.*, 2010) :

- L'une, la cible, est une protéine possédant un ou plusieurs sites actifs spécifiques avec une structure tridimensionnelle connue.
- L'autre, le ligand, est une petite molécule flexible d'origine exogène.

Le docking permet la détermination des conformations les plus favorables pour la fixation du ligand à la cible conduisant à la formation du complexe le plus stable (YU *et al.*, 2010).

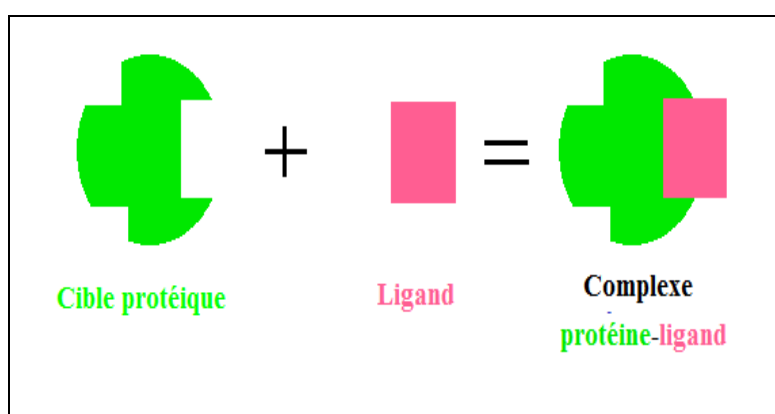


Figure 15 : La formation du complexe protéine-ligand.

En effet, La capacité de la protéine à fixer sélectivement et avec une grande affinité son ligand repose sur la formation de différents types d'interactions non covalentes parmi lesquelles :

- **Les interactions électrostatiques**, liaisons ioniques résiduelles faibles, proviennent de l'interaction entre deux atomes de charges opposées conduisant à la création d'une force attractive.

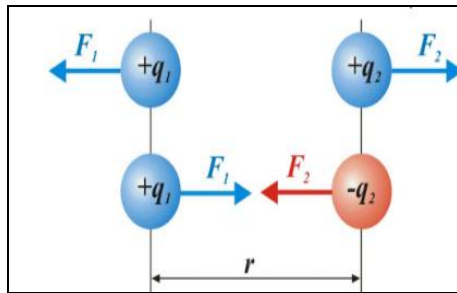


Figure 16: Les interactions électrostatiques.

- **Les interactions de Van der Waals**, forces électrique résiduelles faibles, résultent de l'interaction entre deux atomes, ou groupements d'atomes, adjacents neutres constituant des dipôles opposés et conduisant à la création d'une force attractive avec une distance de 3 à 4,5 Å approximativement.

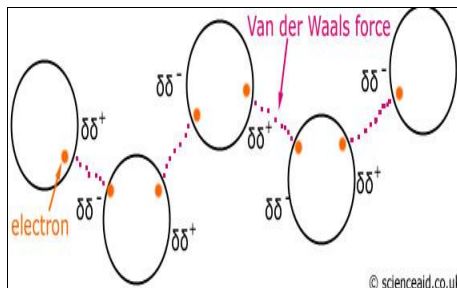


Figure 17 : Les interactions de Van der Waals.

- **Les liaisons hydrogène** découlent de l'interaction électrostatique entre un élément très électronégatif portant au moins un doublet non liant et un atome d'hydrogène. Ces interactions sont plus fortes que celles des [forces de Van der Waals](#) et elles se font sur une distance qui varie entre 2,2 et 4Å (DEMACHY *et al.*, 2014).

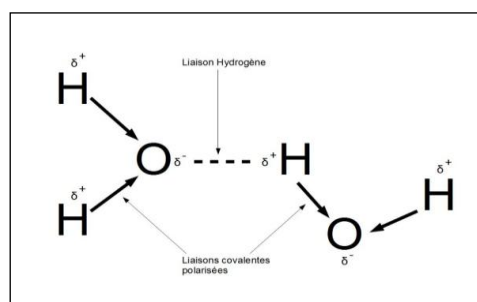


Figure 18: Les liaisons hydrogène

- **Les interactions hydrophobes** sont des chaînes organiques saturées ou aromatiques non polaires ayant très peu d'affinité pour l'eau (**Figure 19**). Ils ont tendance à se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'environnement aqueux (**VESELOVSKY A.V et al., 2002**).

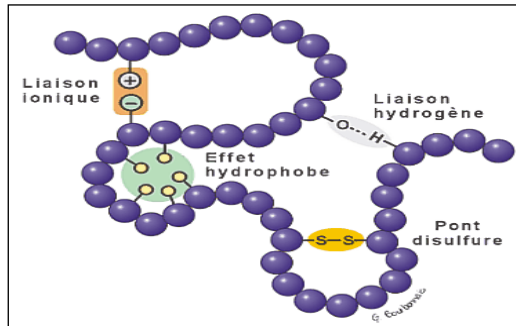


Figure 19: Les interactions hydrophobes

III.3. Principe du docking

Tout programme de docking repose sur la réalisation de deux étapes principales: la première consiste à rechercher toutes les orientations possibles du ligand dans la protéine (searching) et la seconde permet d'évaluer l'énergie de formation du complexe par la fonction de score (scoring) (**HUANG et al., 2010**).

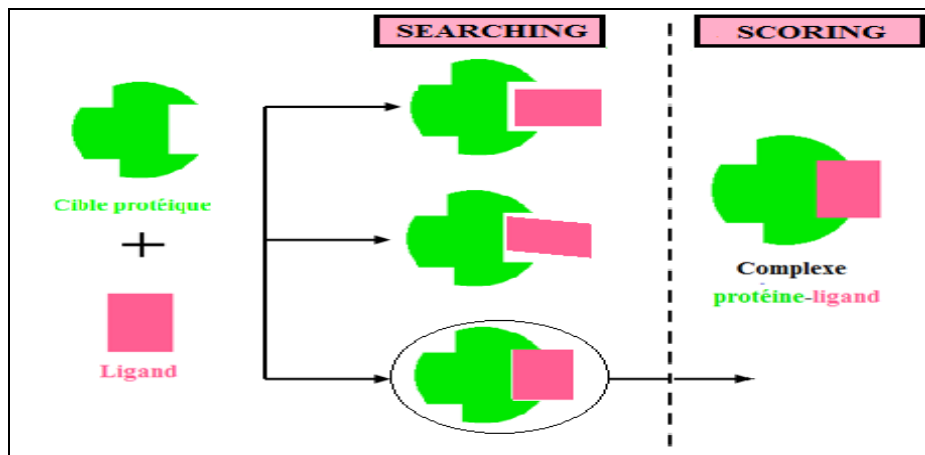


Figure 20: Représentation des étapes du docking.

III.3.1. Le searching

Il sert à trouver et sélectionner les géométries possibles pour le complexe en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine. Il est également utile pour échantillonner les conformations (poses), positions et orientations, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables au sein du site actif de la cible enzymatique. Cette étape, le plus souvent exécutée de manière automatisée à l'aide d'algorithmes de docking, améliore vitesse et précision des simulations.

ArgusLab, le programme utilisé est capable de générer toutes les conformations possibles, en analysant la structure 3D des complexes protéine-ligand. Afin de trouver sa position idéale dans le site actif de la protéine considérée rigide, le ligand flexible subit plusieurs opérations de symétrie (translations, rotations et torsions).

III.3.2. Le scoring

Une fois les meilleures positions du ligand connues, leurs affinités pour la protéine peuvent être évaluées grâce à une fonction de score qui permet de déduire l'énergie minimale compatible à la formation du complexe le plus stable et identifier les modes d'interactions les plus probables (MASSOVA *et al.*, 2000).

Avec le code ArgusLab, les conformations du complexe sont ordonnées selon leurs énergies libres (ΔG_{bind}) croissantes par la fonction de score « Ascore » formulées à partir de l'équation suivante (AKIFUMI *et al.*, 2009):

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{hydrophobique}} + \Delta G_{\text{liaison-H}} + \Delta G_{\text{déformation}} + \Delta G_0 \text{ où :}$$

- ΔG_{vdw} = interactions de Van Der Waals entre le ligand et la protéine
- $\Delta G_{\text{hydrophobique}}$ = interactions hydrophobes
- $\Delta G_{\text{liaison-H}}$ = liaisons hydrogène
- $\Delta G_{\text{déformation}}$ = pénalités de déformation
- ΔG_0 = constante qui exprime la perte d'entropie due à la déformation du complexe

III.4. Interactions FTase/flavonoïdes

Le travail réalisé dans cette partie débute par le criblage d'une trentaine de flavonoïdes toutes classes confondues (§ II.3). Notre choix s'est finalement porté sur 10 flavonols (§

III.4.1) de la série testée. Cette sélection est basée sur la concordance entre nos résultats et ceux de **HYUN** et son équipe qui ont montré que cette catégorie de composés présentait une inhibition plus importante vis-à-vis de la FTase (**KANG et al., 2004**). Pour aller au-delà de cette catégorie, deux autres composés flavoniques: une chalcone et une bis-chalcone sont rajoutées à cette étude.

Afin d'analyser l'interaction de ces ligands avec la farnésyl transférase, deux complexes expérimentaux **1SA4** et **1S63**, tirés de la banque de données (**PDB**)⁸, sont expérimentés.

Nos essais ont révélé que le **1SA4** répond mieux au critère de sélectivité à savoir, son RMSD est inférieur à celui du **1S63**.

Le **1SA4** résulte de la formation du complexe cristallisé de la FTase et le tipifarnib. Ce dernier, inhibiteur déjà commercialisé, est utilisé dans cette étude comme molécule référence avec laquelle les résultats obtenus seront comparés.

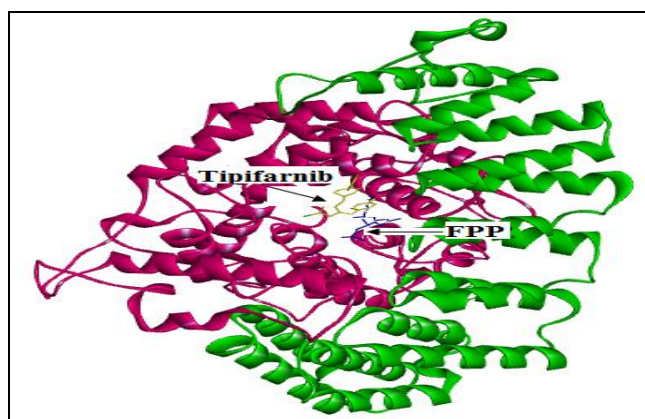


Figure 21: FTase complexée avec le tipifarnib⁸

III.4.1. Descriptif des ligands

Tous les composés utilisés dans cette étude proviennent du répertoire des molécules isolées dans le laboratoire LCMC à l'exception de la bis-chalcone et la chalcone. La plupart des propriétés biologiques de chacun des flavonols sont tirées de la **Duke Data Bank**⁹.

Pour garantir des résultats fiables, une optimisation de la géométrie des ligands est une étape clé qui précède le docking moléculaire. Elle représente le processus par lequel l'état énergétique des différents ligands est minimisé afin de leur conférer la conformation la plus stable. Elle est assurée par le programme **Gaussien 09**¹⁰ qui se base sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) avec la fonctionnelle d'échange-corrélation (B3LYP) et la base des orbitales atomiques 6-31G.

⁸www.PDB.org

⁹<https://phytochem.nal.usda.gov>

¹⁰<http://www.gaussian.com/>

Pour être tête de série, toute molécule doit obéir à un ensemble de propriétés mises au point par les équipes de Lipinski (**LIPINSKI et al., 1997**) et Veber (**VEBER et al., 2002**).

Au nombre de quatre, Les règles de Lipinski permettent d'évaluer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle. Elles sont définies comme suit :

- poids moléculaire ≤ 500
- nombre d'accepteurs de liaison-H ≤ 10
- nombre de donneurs de liaison-H ≤ 5
- log P ≤ 5

Aux règles de Lipinski, Veber a rajouté deux paramètres. L'un des deux, dénommé surface polaire (PSA: polar surface area) va caractériser l'absorption intestinale et le passage de la barrière hématoencéphalique. L'autre appelé nrotb (rotatable bonds) pour 'nombre de liaisons de rotation' sert à mesurer la flexibilité de la molécule. Les deux doivent répondre à des critères, à savoir :

- PSA $\leq 140 \text{ \AA}^2$
- n rotb < 10

Les valeurs des paramètres de chaque ligand sont calculées à partir d'un logiciel en ligne sur le site (www.molinspiration.com).

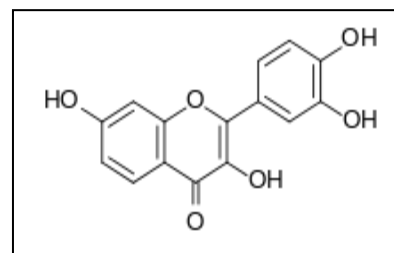
III.4.1.1. La fisétine

Ce composé flavonique est contenu dans les fruits rouges (la fraise). Il a été identifié dans le [fustet](#) ou arbre à perruques (*Cotinus coggygia*, Fisetholz en allemand d'où son nom).

- Formule chimique: C₁₅H₁₀O₆
- Masse moléculaire : 286,236 g/mol

La fisétine possède diverses propriétés:

- Anti inflammatoires

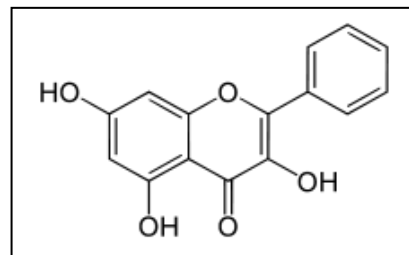


- Antiallergiques
- Inhibitrices de la topoisomérase II avec un IC_{50} de 1,8 $\mu\text{g/ml}$ (MEHTA *et al.*, 1995)
- Antimutagènes
- **III.4.1.2. La galangine**

La galangine est une substance organique présente dans les racines de *galanga* (*Alpinia galangal*) et la propolis.

La galangine est connue pour ses diverses propriétés:

- Anti-inflammatoire avec un IC_{50} de 5,5 μM
- Inhibitrices de la lipo-oxygénase ($IC_{50}=20 \mu\text{M}$)
- Antivirales (AMOROS *et al.*, 1992)
- Anti-tumorales.

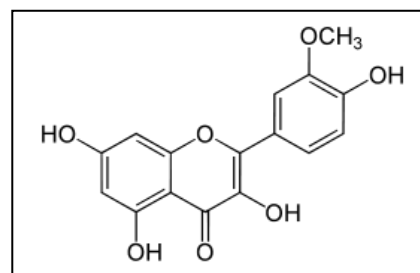


III.4.1.3. L'isorhamnétine

L'isorhamnétine est un flavonol O-méthylé en 3'. Il peut être trouvé dans différentes plantes dont *Ammi visnaga*, une espèce appartenant à la famille des Apiacées (BENCHERAIET *et al.*, 2011).

L'isorhamnétine exerce diverses activités:

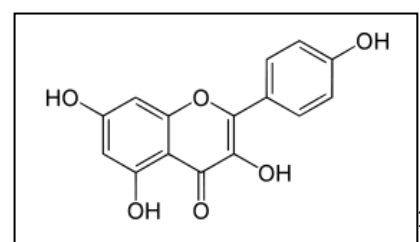
- Anti-inflammatoires (WILLIAMSON *et al.*, 1989)
- Anticancéreuses
- Antibactériennes



III.4.1.4. Le kaempférol

Le kaempférol est un pigment jaune, peu soluble dans l'eau comme la plupart des flavonoïdes. Cette substance est métabolisée par plusieurs plantes: *l'Aloé Véra*, les brocolis, les épinards et les fraises.

Le kaempférol est connu pour plusieurs activités:



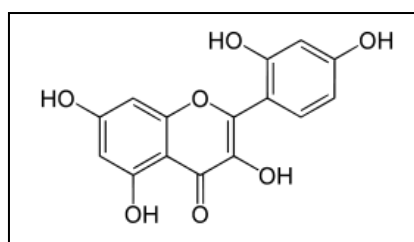
- Anticancéreuses
- Antibactériennes ($IC_{50}=20 \mu M$)
- Inhibitrices de l'aldose-réductase avec un IC_{50} de $100 \mu M$ (**OLIVEIRA et al., 1997**)
- Inhibitrices de la topoisomérase II avec un IC_{50} de $8,2 \mu g/ml$ (**SANTTI et al., 1998**)
- Anti-oxydantes ($IC_{50}=40 pm$)

III.4.1.5. La morine

La morine est un composé organique jaune-orangé, contenu dans le bois jaune (*Morus tinctoria*), ou dans le *goyavier commun*. Elle est principalement utilisée comme colorant jaune en teinturerie et pour l'impression sur tissu.

Cette substance agit comme un agent:

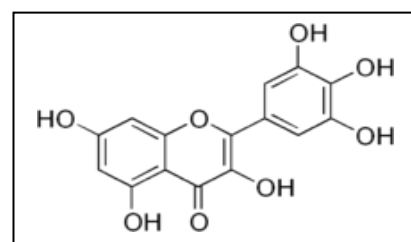
- Antioxydant avec un IC_{50} de $1,73 \mu M$
- Antiviral
- Inhibiteur de la topo-isomérase I et II avec un IC_{50} de $42,1 \mu g/ml$ et $40,8 \mu g/ml$ respectivement (**MEHTA et al., 1995**)
- Inhibiteur de la cyclooxygénase ($IC_{50}=180 \mu M$)



III.4.1.6. La myricétine

La myricétine, est présente dans divers types de végétaux, en particulier le raisin, les oignons et le thé vert.

Cette molécule est également disponible en tant que complément alimentaire sous forme de pilules (**MARTNEZ et al., 2012**).



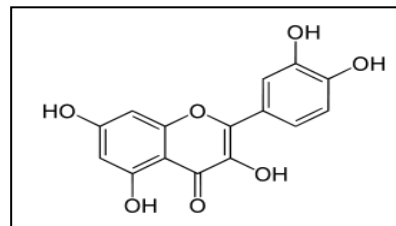
Historiquement la myricétine est utilisée comme traitement de la fièvre et elle peut également être efficace en tant que substance:

- Anti-inflammatoire
- Antioxydante avec un IC_{50} de $3,9 \mu g/ml$ (**MARTNEZ et al., 2012**)
- Préventive du cancer
- Inhibitrice de la topo-isomérase ($IC_{50}=11,9 \mu g/ml$)
- Inhibitrice de la lipooxygénase

III.4.1.7. La quercétine

La quercétine se trouve naturellement dans une grande variété d'aliments et semble avoir de multiples effets bénéfiques, incluant une activité:

- Inhibitrice de l'aldose réductase ($IC_{50} = 4\mu\text{g/ml}$)
- Anticancéreuse (IC_{50} de $120\mu\text{g/ml}$)
- Antivirale avec un IC_{50} de 48-150 $\mu\text{g/ml}$ (**AMOROS et al., 1992**)

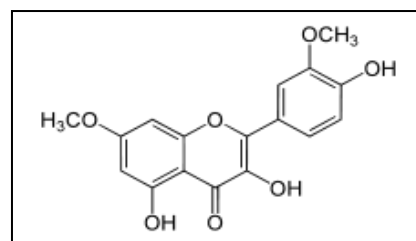


III.4.1.8. La rhamnazine

La rhamnazine est un composé diméthylé qui peut être extrait de la *Rhamnus petiolaris*¹ sous forme d'hétéroside (**NGUYEN et al., 2013**).

Cette molécule présente une puissante activité:

- Anti-tumorale
- Antioxydant (**NGUYEN et al., 2013**)
- Anti-inflammatoire
- Anti-plasmodium ($IC_{50} = 1\mu\text{g/ml}$)

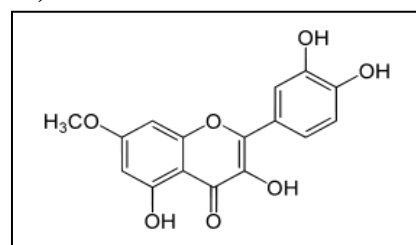


III.4.1.9. La rhamnétine

La rhamnétine est un flavonol O-méthylé en 7 qui peut être extrait à partir de diverses plantes telle *Ammi visnaga* (**BENCHERAÏET R et al., 2011**).

La rhamnétine est prouvée pour sa capacité:

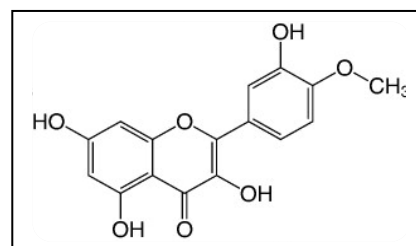
- Antioxydante
- Antibactérienne
- Inhibitrice de l'aldose réductase (**SHIMIZU et al., 1984**)
- Hépto-protectrice ($IC_{50} = 10,29\mu\text{M}$)



III.4.1.10. Tamarixétine

La tamarixétine est un flavonol-O-méthylé en 4', peut être isolé à partir *Bupleurum montanum* (BENAHMED et al., 2008).

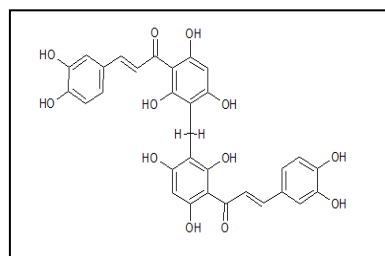
Cette molécule montre un pouvoir antioxydant dont le IC₅₀ est de 1.5µg /ml.



III.4.1.11. Bis-chalcone

Cette molécule (2*E*,2'*E*)-1,1'-(méthylènebis(2,4,6-trihydroxy-3,1-phénylène))bis(3-(4-(benzyloxy)-3-méthoxyphényl)prop-2-èn-1-one) tirée de la littérature fait partie d'une liste de composés flavoniques synthétisés par THEVENIN

dont le travail de recherche vise à développer de nouveaux agents antiparasitaires. L'implication de la FTase dans des processus de maturation de protéines responsable d'infections parasitaires explique le choix de la



bis-chalcone comme potentiel FTi (THEVENIN et al., 2013).

Pour des raisons pratiques nous avons pris une numérotation aléatoire des atomes.

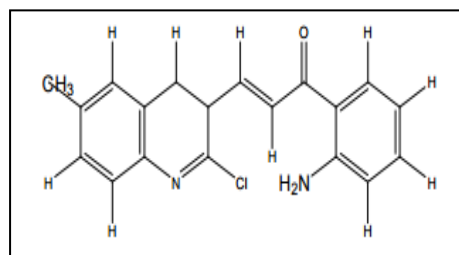
III.4.1.12. La chalcone

La chalcone (1-(2'-amino-phényl)-3-[3-(2-chloro-6-méthyl-quinolyl)] prop-2-èn-1-one) est un composé issu du métabolisme secondaire de diverses plantes: fruits, légumes, soja et thé. Cette molécule peut être également synthétisée comme celle utilisée dans ce travail (BOURAOUI et al., 2009)

La recherche réalisée au sein du **Laboratoire de Chimie des Matériaux Constantine** a révélé que la chalcone était meilleure inhibitrice de la xanthine oxydase que certains composés déjà sur le marché (allopurinol, oxypurinol, colchicine...) (HAMLAOUI., 2014).

La chalcone est connue également pour sa capacité:

- Anti-tumorale (ZHANG et al., 2013).
- Anti-inflammatoire (CHENG et al., 2008).



III.4.2. Validation du modèle de calcul

Pour valider notre modèle de calcul mis en application afin d'assurer fiabilité et reproductibilité aux résultats du docking des différents ligands, une série de composés bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) comme inhibiteurs de la FTase sont utilisés. Leur IC_{50} sont tirés du site Pubchem¹¹. Les données du $\Delta G_{(bind)}$ obtenues sont placées dans le **Tableau 07** :

Composé	IC_{50} (nM)	$\Delta G_{(bind)}$ (Kcal/mol)
FTi-277	0.5	-10,13
BMS-316810	0,7	-9,39
BMS-214662	1,4	-9,30
L-778, 123	2	-9,22
SCH-44342	250	-8,74
FUSIDIENOL	300	-7,64

Tableau 07 : Valeurs des $\Delta G_{(bind)}$ déduits du docking et les IC_{50} tirés de la littérature

L'analyse de ces valeurs révèle l'existence d'une étroite corrélation entre les données expérimentales (IC_{50}) et celles calculées *in silico* ($\Delta G_{(bind)}$). Effectivement, les IC_{50} et les $\Delta G_{(bind)}$ vont dans le même sens et par conséquent, le modèle mis en œuvre peut être considéré comme fiable pour la suite du travail.

III.5. Interactions 1SA4/flavonoïdes

Les énergies libres de formation des différents complexes entre les flavonols, la chalcone, la bis-chalcone et l'enzyme 1SA4 sont obtenues grâce au logiciel libre ArgusLab 4.01. Leurs valeurs sont réunies dans le **Tableau 08**.

¹¹<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Tableau 08 : Valeurs de $\Delta G_{(bind)}$ des complexes 1SA4/flavonoïdes

Ligand	Structure	$\Delta G_{(bind)}$ (Kcal/mol)
Tipifarnib (référence)		-11,02
Fisétine		-8,47
Galangine		-9,49
Isorhamnétine		-7,86
Kaempferol		-8,72
Morine		-8,05
Myricétine		-7,38
Quercétine		-7,27
Rhamnazine		-6,77
Rhamnétine		-8,18
Tamarixétine		-8,36
Bis-chalcone		-10,93
Chalcone		-10,25

III.5.1. Analyse des complexes FLAVONOÏDES/ 1SA4

Le docking moléculaire permet l'analyse des liaisons non covalentes formées entre la FTase tirée du complexe 1SA4 et les différents flavonoïdes. Les types d'interactions formées sont déduits de l'exploitation des données fournies par les deux logiciels :

- **ArgusLab 4.01** (liaisons hydrogène)
- **Discovery studio 4.0** (liaisons hydrophobes et électrostatiques)

Le nombre et le types des liaisons diffèrent d'un complexe à un autre. Ces variations dépendent de la structure chimique, la nature et le nombre de substituants de chaque ligand. Les réseaux des liaisons hydrogène, hydrophobes et électrostatiques établies lors de la formation de chaque complexe sont représentées dans les divers tableaux qui suivent.

III.5.1.1. Analyse du complexe TIPIFARNIB/ 1SA4

Les résultats obtenus suite à l'interaction entre le tipifarnib et l'enzyme 1SA4 servent de modèle de comparaison pour le reste des complexes.

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	-OH	ASP ⁶¹²	2,49
Liaison hydrophobe	Cl	TRP ⁴²¹	4,46
	Cl	TRP ⁴¹⁷	3,77
	-OH	Zn	

Tableau 09 : Types de liaisons établies dans le complexe *TIPIFARNIB/1SA4*

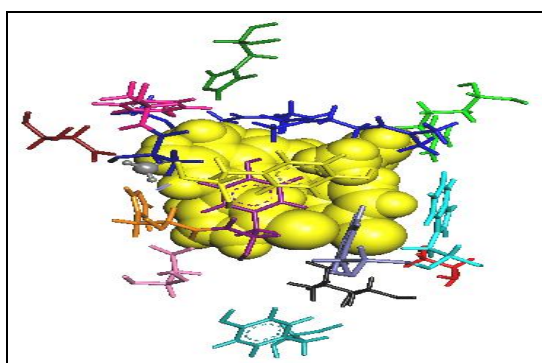


Figure 22: Le tipifarnib dans le site actif de la FTase

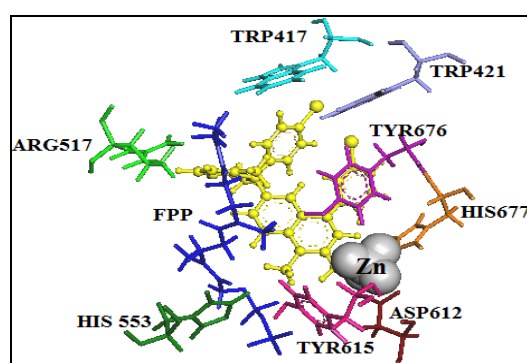


Figure 23: Le tipifarnib avec quelques résidus de la FTase

III.5.1.2. Analyse des complexes FLAVONOLS/ 1SA4

Lors du docking moléculaire, les dix flavonols forment des liaisons non covalentes de type hydrogènes et hydrophobes avec les différents acides aminés faisant partie du site actif de la FTase.

A- Complexe Fisetine/ISA4

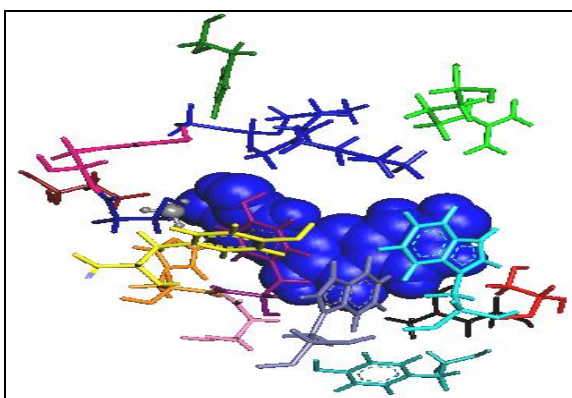
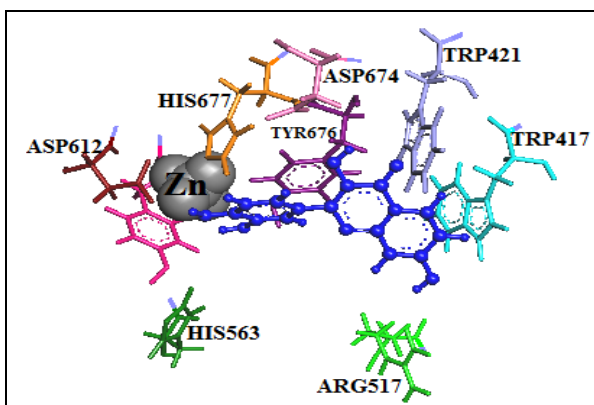


Figure 24 : La fisétine dans le site actif de la FTase

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	3-OH	ASP ⁶⁷⁴	2,89
	4'-OH	ASP ⁶¹²	2,79
	3'-OH	TYR ⁶⁷⁶	2,35
Liaison hydrophobe	Cycle B	CYC ⁶¹⁴	5,22
	Cycle A	TRP ⁴¹⁷	5,17
	4'-OH	Zn	

Tableau 10 : Types de liaisons établies dans le complexe Fisetine /ISA4

Figure 25 : La fisétine avec quelques résidus de la FTase



B- Complexe GALANGINE/ISA4

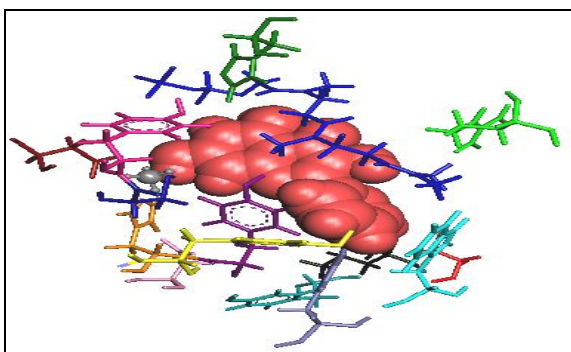
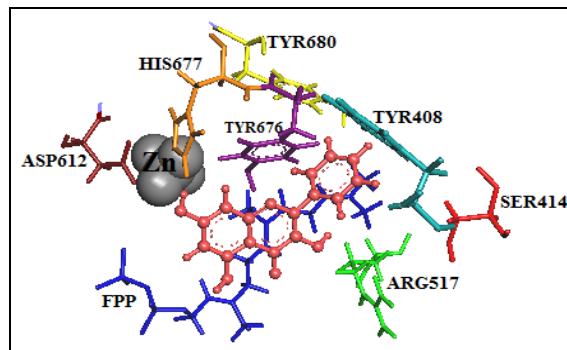


Figure 26 : La galangine dans le site actif de la FTase

Tableau 11 : Types de liaisons établies dans le complexe GALANGINE /ISA4

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	7-OH	ASP ⁶¹²	2,89
	5-OH	FPP	2,88
	1-OH	TYR ⁶⁷⁶	2,44
Liaison hydrophobe	Cycle B	TRP ⁴¹⁷	4,33
	Cycle A/C	FPP	3,64

Figure 27 : La galangine avec quelques résidus de la FTase



C- Complexe ISORHAMNETINE/ISA4

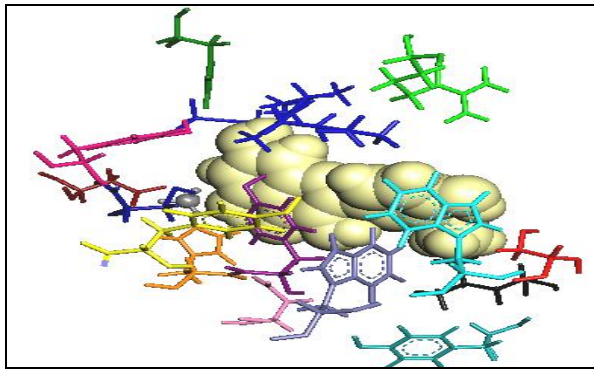
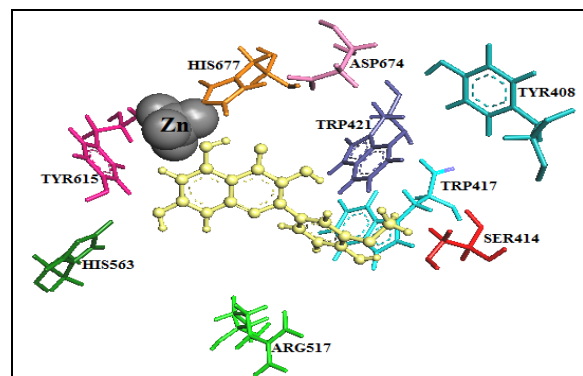


Figure 28 : L'isorhamnétine dans le site actif de la FTase

Tableau 12 : Types de liaisons établies dans le complexe *ISORHAMNETIN /ISA4*

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
* Liaison hydrogène	7-OH	TYR ⁶¹⁵	2,89
	5-OH	HIS ⁶⁷⁷	2,61
	4'-OH	TRP ⁴¹⁷	2,24
Liaison hydrophobe	Cycle B	TRP ⁴²⁴	5,31
	Cycle B	TRP ⁴¹	4,62
	Cycle A	FPP	4
	Cycle C	TYR ⁶⁷⁶	3,10

Figure 29 : L'isorhmanétine avec quelques résidus de la FTase



D- Complexe KAEMPFEROL/ISA4

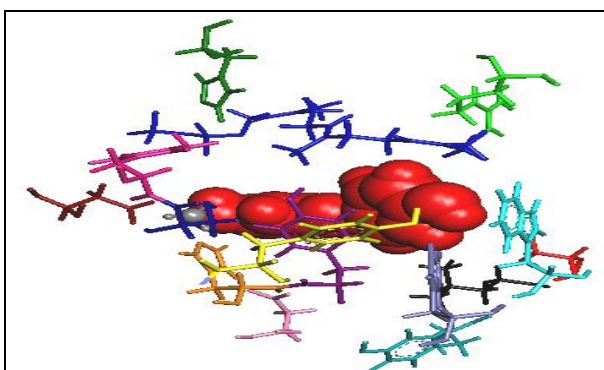
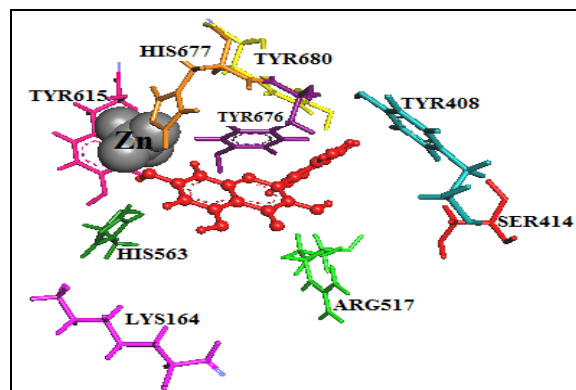


Figure 30 : Le kaempférol dans le site actif de la FTase

Tableau 13 : Types de liaisons établies dans le complexe *KAEMPFEROL/ISA4*

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	7-OH	HIS ⁶⁷⁷	2,99
	1-O	TYR ⁶⁷⁶	2,92
	4'-OH	TYR ⁶⁸⁰	2,53
Liaison hydrophobe	1-O	TYR ⁶⁸⁰	5,20
	Cycle B	FPP	4,87
	cycle B	TRP ⁴¹⁷	4,38

Figure 31 : Le kaempférol avec quelques résidus de la FTase



E- Complexe *MORINE/ISA4*

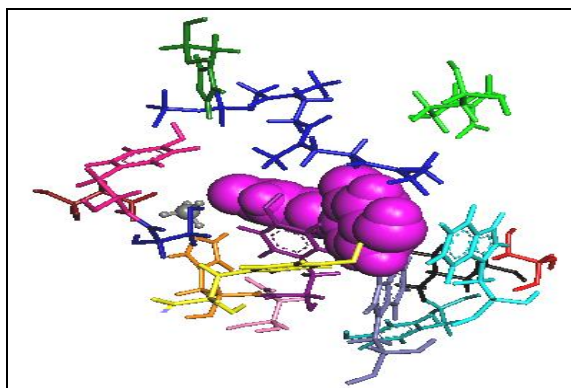
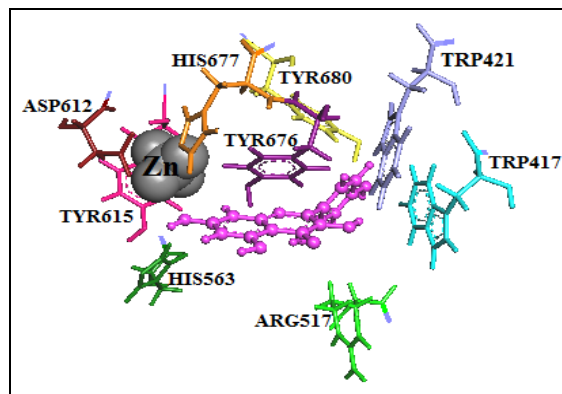


Figure 32 : La morine dans le site actif de la FTase

Tableau 14 : Types de liaisons établies dans le complexe *MORINE /ISA4*

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	4'-OH	TYR ⁶⁸⁰	2,89
Liaison hydrophobe	Cycle B	FPP	4,73

Figure 33 : La morine avec quelques résidus de la FTase



F- Complexe MYRICETINE/ISA4

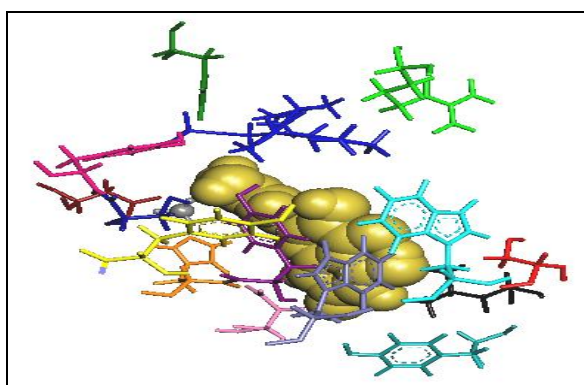
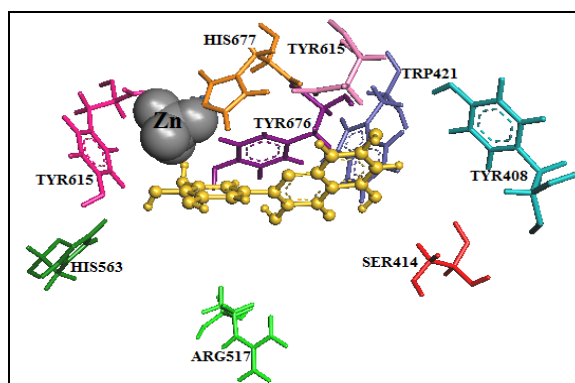


Figure 34 : La myricétine dans le site actif de la FTase

Tableau 15: Types de liaisons établies dans le complexe *MYRICETINE /ISA4*

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	5'-OH	TYR ⁶⁷⁶	2,53
Liaison hydrophobe	Cycle A	LEU ⁴¹¹	4,96
		TYR ⁶⁷⁶	3,93

Figure 35 : La myricétine avec quelques résidus de la FTase



G- Complexe QUERCETINE/ISA4

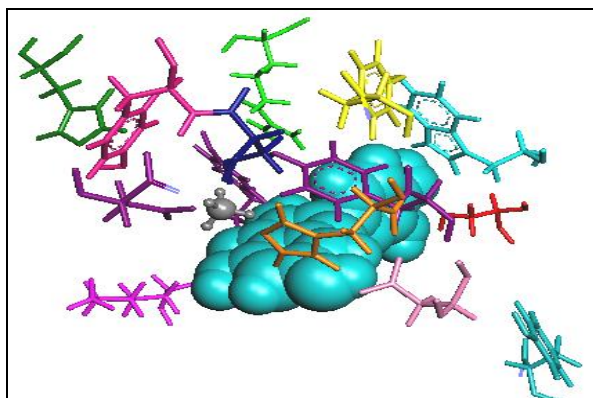
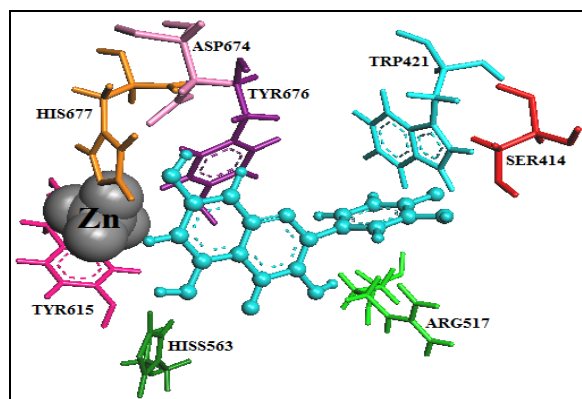


Figure 36 : La quercétine dans le site actif de la FTase

Tableau 16: Types de liaisons établies dans le complexe QUERCETINE /ISA4

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	5'-OH	SER ⁴¹⁴	2,77
	4'-OH	TRP ⁴¹⁷	2,68
	7-OH	HIS ⁶⁷⁷	2,64
	4'-OH	SER ⁴¹⁴	2,50
	7-OH	ASP ⁶⁷⁴	2,25
Liaison hydrophobe	Cycle B	TRP ⁴²¹	5,59
	Cycle B	TRP ⁴¹⁷	5,15

Figure 37 : La quercétine avec quelques résidus de la FTase



H- Complexe RHAMNAZINE/ISA4

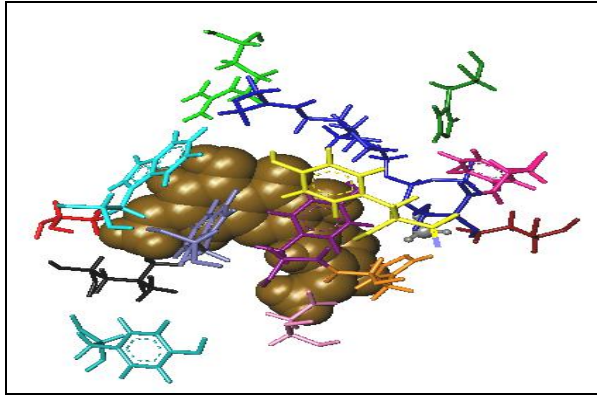
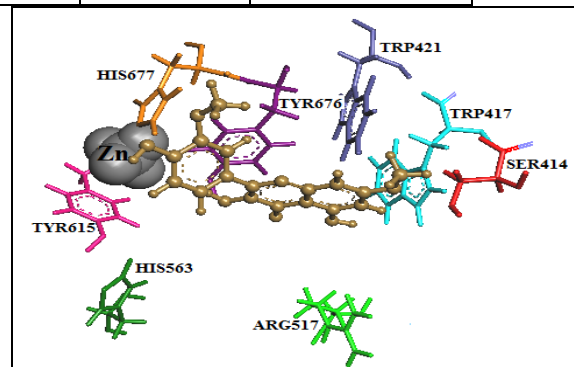


Figure 38 : la Rhamnazine dans le site actif de la FTase

Tableau 17: Types de liaisons établies dans le complexe *RHAMNAZINE /ISA4*

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	3-OH	TYR ⁶⁷⁶	2,76
	7-O	SER ⁴¹⁴	2,63
Liaison hydrophobe	Cycle A	TRP ⁴¹⁷	4,86
	Cycle A	TRP ⁴²¹	4,77
	Cycle C	TYR ⁶⁷⁶	3,89

Figure 39 : La Rhamnazine avec quelques résidus de la FTase



I- Complexe *RHAMNETINE/ISA4*

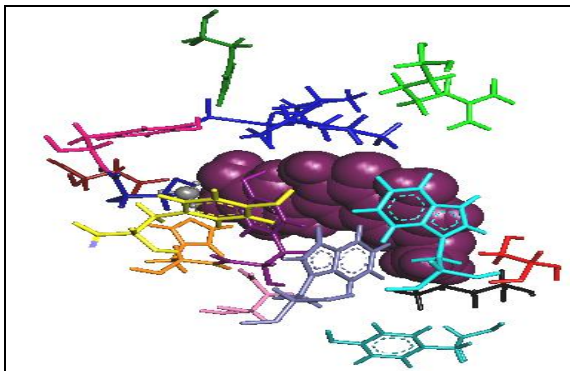
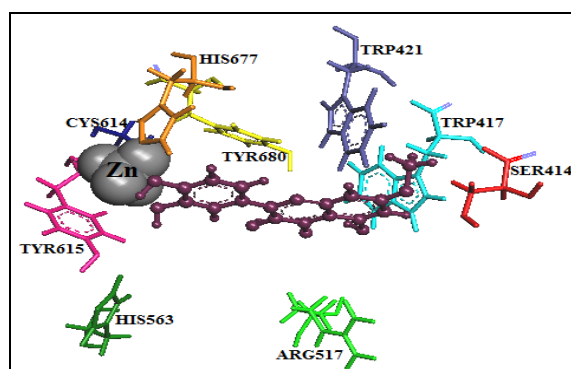


Figure 40: La rhamnétine dans le site actif de la FTase

Tableau 18 : Types de liaisons établies dans le complexe *RHAMNETINE/ISA4*

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	7-O	SER ⁴¹⁴	2,95
	5'-OH	CYS ⁶¹⁴	2,91
	5-OH	TRP ⁴¹⁷	2,68
	4'-OH	HIS ⁶⁷⁷	2,34
Liaison hydrophobe	Cycle B	CYS ⁶¹⁴	5,10
	Cycle A	TRP ⁴²¹	4,59
	Cycle A	TRP ⁴¹⁷	4,35
	Cycle C	TYR ⁶⁷⁶	4,07

Figure 41 : La rhamnétine avec quelques résidus de la FTase



J- Complexe TAMARIXETINE/ISA4

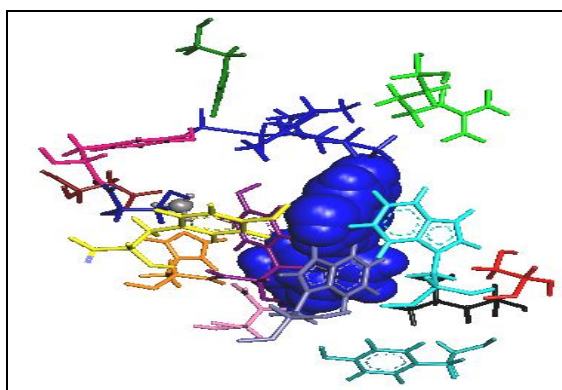
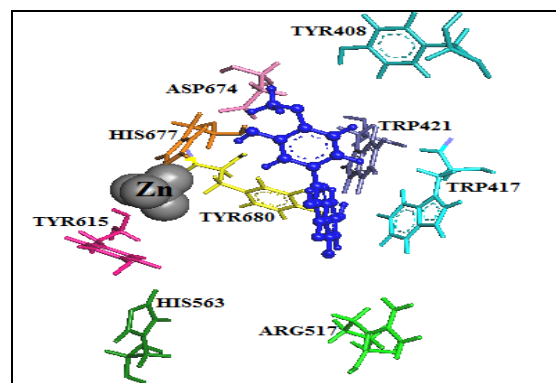


Figure 42 : La tamarixétine dans le site actif de la FTase

Tableau 18 : Types de liaisons établies dans le complexe TAMARIXETINE/ISA4

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	7-OH	TRP ⁴²¹	2,92
	3'-OH	ASP ⁶⁷⁴	2,77
	7-OH	TYR ⁶⁸⁰	2,52
Liaison hydrophobe	Cycle B	LEU ⁴¹¹	5,38
	Cycle B	TYR ⁶⁷⁶	5,18
	Cycle A	FPP	4,96
	7-OH	TRP ⁴²¹	0,86

Figure 43 : La tamarixétine avec quelques résidus de la FTase



III.5.1.3 Analyse des complexes BIS-CHALCONE/ISA4 et CHALCONE/ISA4

Contrairement aux flavonols qui n'ont établi que des liaisons hydrogènes et hydrophobes, la bis-chalcone et la chalcone ont formé un troisième type d'interactions, des liaisons électrostatiques.

A- Le complexe BIS-CHALCONE/ISA4

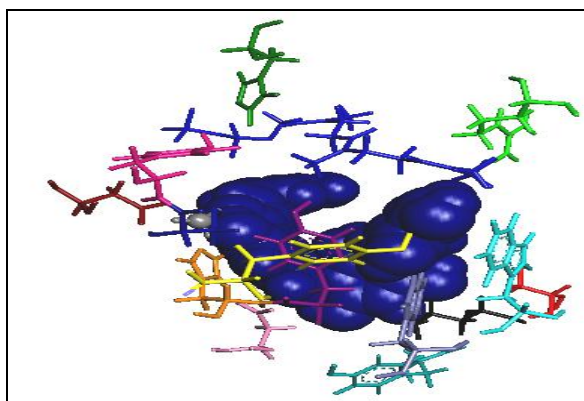


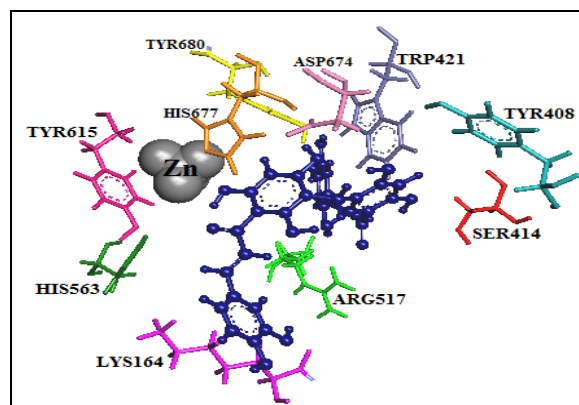
Figure 44 : La bis-chalcone dans le site actif de la FTase

Tableau 20 : Les types de liaisons dans le complexe *BIS-CHALCONE/ISA4*

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaisons hydrogène	4-OH	Lys ¹⁶⁴	2,55
	2-OH	HIS ⁶⁷⁷	2,51
	5'-OH	TRP ⁴²¹	2,27
	13-OH	ASP ⁶⁷⁴	2,27
	3'-OH	TYR ⁶⁸⁰	2,24
Liaisons hydrophobes	Cycle C	Leu ⁴¹¹	4,22
	Cycle D	FPP	4,41

	Cycle A	Lys ¹⁶⁴	3,43
Liaisons électrostatique	Cycle B	HIS ⁶⁷⁷	2,40
	Cycle D	Tyr ⁶⁸⁰	1,59
	Cycle A	Lys ¹⁶⁴	1,49
	Cycle C	Tyr ⁶⁸⁰	1,09
	Cycle D	Tyr ⁶⁷⁶	0,94

Figure 45: La bis-chalcone avec quelques résidus de la FTase



III.5.3. Analyse des complexes CHALCONE/ 1SA4

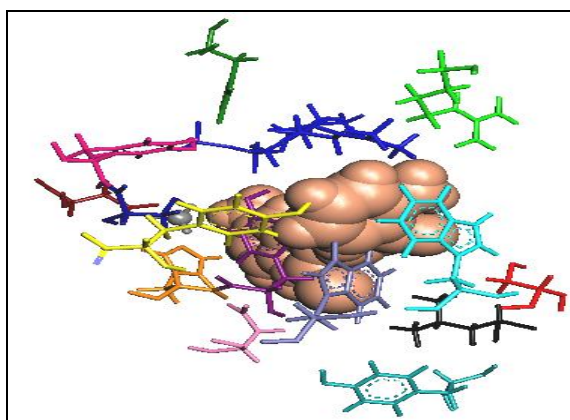
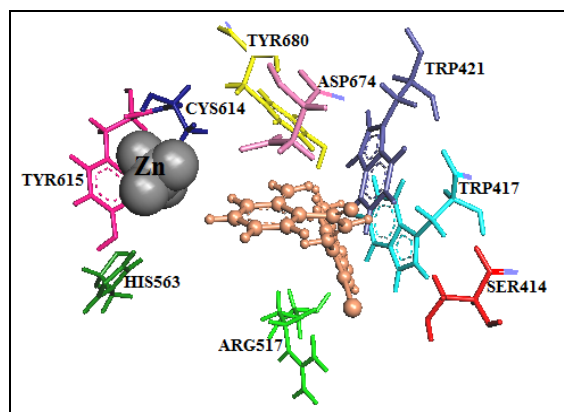


Figure 46 : La chalcone dans le site actif de la FTase

Tableau 21 : Les types des liaisons dans le complexe *CHALCONE/1SA4*

Type de liaison	Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
Liaison hydrogène	6'-N ₁	ASP ⁶⁷⁴	2,55
Liaison hydrophobe	7-CH ₃	TRP ⁶¹⁸	5,42
	7-CH ₃	TYR ⁶⁷⁶	5,09
	7-CH ₃	TYR ⁶⁸⁰	5,05
	7-CH ₃	TRP ⁴²¹	4,76
	7-CH ₃	FPP	4,34
	7-Cl	LEU ⁴¹¹	3,99
Liaison électrostatique	Cycle A	ASP ⁶⁷⁴	3,01

Figure 47: La chalcone avec quelques résidus de la FTase



III.6. Interprétation des résultats

La comparaison des énergies de formation des différents complexes (1SA4/flavonoïdes) avec celle de la molécule référence (1SA4/tipifarnib) a permis de classer les douze ligands par ordre croissant. La bis-chalcone se place en premier avec un ΔG_{bind} de -10,93 Kcal/mol suivie par la chalcone (-10,25 Kcal/mol) alors que le premier des flavonols, qui est la galangine (-9,49 Kcal/mol) se classe au troisième rang.

La position de la bis-chalcone et la chalcone en tête de liste s'expliquerait par la présence des interactions électrostatiques qu'elles ont été les seules à établir avec la FTase.

Pour la catégorie des flavonols, l'inspection visuelle des complexes les plus stables, 1SA4/galangine (-9,49 Kcal/mol), 1SA4/kaempférol (-8,72 Kcal/mol), 1SA4/fisétine (-8,47 Kcal/mol), montre que les ligands pénètrent entièrement dans le site actif de l'enzyme.

L'application des règles de Lipinski et Veber sur les ligands donnent les résultats consignés dans le **Tableau 22**.

Ligand	LogP	PM	Liaison hydrogène (donneur)	Liaison hydrogène (accepteur)	PSA	nrot	n violation
Bis-chalcone	4,49	588,52	10	12	236,42	8	3
Chalcone	4,40	322,80	3	0	51,7	3	0
Galangine	2,65	270,24	3	5	99,89	1	0
Kaempferol	2,17	286,24	4	6	111,12	1	0
Fisétine	1,97	286,24	4	6	111,12	1	0
Tamarixétine	1,88	301,23	4	7	128, 18	2	0
Rhamnétine	1,88	301,23	4	7	128, 18	1	0
Morine	1,88	302,24	5	7	131,35	1	0
Isorhamnétine	1,88	301,23	4	7	128, 18	2	0
Myricétine	1,39	318,24	6	8	151,58	1	1
Quercétine	1,68	302,24	5	7	131,35	1	0
Rhamnazine	2,07	300,22	3	7	125,02	1	0

Tableau 22 : L'application des règles de Lipinski et Veber sur la série des flavonoides

A la lecture de ceux-ci, et au vu des ΔG_{bind} déduits du docking, le constat est clair : tous les composés considérés dans cette étude, possèdent les critères nécessaires pour être inhibiteur potentiel de la farnésyl transférase.

Conclusion générale

Le présent mémoire constitue une contribution à l'étude des interactions protéine-ligands, un axe de recherche développé au sein du Laboratoire de Chimie des Matériaux Constantine (LCMC).

L'étude des interactions entre la cible enzymatique, la farnésyl transférase (1SA4) et une série de flavonoïdes a été réalisée grâce à des techniques de modélisation moléculaire, notamment le docking. Pour réaliser cette tâche, divers logiciels sont utilisés, particulièrement ArgusLab 4.01 et Discovery Studio Client 4.0.

Le tipifarnib, tiré de la structure cristallographique 3D du complexe 1SA4, sert de référence.

Afin d'assurer la fiabilité et la reproductibilité des résultats de ce travail, une série d'inhibiteurs de la FTase déjà commercialisés sont testés. La corrélation trouvée entre leurs IC_{50} et les ΔG_{bind} déduits du docking (effectué dans des conditions analogues à celles qui ont servi pour les flavonoïdes) a validé le modèle du calcul utilisé.

Les énergies de liaison (ΔG_{bind}) ainsi que les liaisons hydrogène, hydrophobes, et électrostatiques formées dans les complexes protéine-ligands sont employées pour analyser les interactions entre les différents flavonoïdes et le site actif de la FTase. Les informations recueillies, après criblage, permettent de déterminer quelles sont les structures les plus stables.

La comparaison des énergies de formation des complexes entre elles, et avec celle de la molécule référence tipifarnib (-11,02 kcal/mol), donnent une classification des ΔG_{bind} selon l'ordre suivant :

- 01) Bis-chalcone (-10, 93 Kcal/mol)
- 02) Chalcone (-10, 25 Kcal/mol)
- 03) Galangine (-9, 49 Kcal/mol)
- 04) Kaempférol (-8, 72 Kcal/mol)
- 05) Fisétine (-8, 47 Kcal/mol)
- 06) Tamarixétine (-8, 36 Kcal/mol)
- 07) Rhamnétine (-8, 18 Kcal/mol)

- 08) Morine (-8,05 Kcal/mol)
- 09) Isorhamnétine (-7,86 Kcal/mol)
- 10) Myricétine (-7,25 Kcal/mol)
- 11) Quercétine (-7,25 Kcal/mol)
- 12) Rhamnazine (-6,77 Kcal/mol)

A notre connaissance l'étude de l'interaction FTase/bis-chalcone, chalcone, tamarixétine, rhamnétine, rhamnazine est réalisée pour la première fois.

D'après les valeurs des ΔG_{bind} obtenues, la catégorie des chalcones (-10,93 Kcal/mol, -10,25 Kcal/mol) se place en tête de liste, comparativement à celle des flavonols (-9,49 Kcal/mol, -8,72 Kcal/mol). En effet, les premiers présentent une meilleure affinité avec l'enzyme ISA4 que les seconds.

L'application de 'la règle des 5' de Lipinski et les deux paramètres, définis par Veber a révélé que toutes les molécules explorées dans ce travail remplissent les exigences requises pour aspirer à être tête de série.

Confrontés avec les molécules utilisées pour la validation du modèle de calcul et dont les ΔG_{bind} varient de -10,13 à -7,64 Kcal/mol, les huit premiers flavonols de la série testée dans le docking rentrent dans cet intervalle, alors que la chalcone et la bis-chalcone présentent un ΔG_{bind} inférieur.

Au vu de tous les résultats auxquels nous sommes parvenus à partir de cette étude *in silico*, nous constatons que la majorité des flavonols d'une part et la bis-chalcone, la chalcone d'autre part, sont en mesure de jouer le rôle d'inhibiteurs potentiels de la FTase. Il reste juste à le confirmer en effectuant des tests *in vitro* et *in vivo*.

Références bibliographiques

AHEARN I.M., HAIGIS K., BAR-SAGI D., PHILIPS M.R., 2012.- Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13: 39-51.

AKIFUMI O , OHGI T., 2009.- Validation de ArgusLab efficacités pour la liaison Calculs Free Energy. *Chem-Bio. Informatique Journal*, 9: 52-61.

AMOROS M., SIMOES C.O., GIRRE L., et al., 1992.- Synergistic Effect Of Flavones And Flavonols Against Herpes Simplex Virus Type 1 In Cell Culture. Comparison With The Antiviral Activity Of Propolis. *J. of Natural Products*, 55(12): 1732-1740.

ASHAR H.R., ARMSTRONG L., JAMES L.J., CARR D.M., GRAY K., TAVERAS A., DOLL R.J., BISHOP W.R., KIRSCHMEIER P.T., 2000.- Biological effects and mechanism of action of farnesyl transferase inhibitors. *Chem. Res. Toxicol*, 13: 949-952.

BAINES A.T., XU D., DER C.J., 2011.- Inhibition of Ras for cancer treatment: The search continues. *Future Med. Chem*, 3: 1787–1808.

BALAJEE R., RAJAN M.S., 2011.- Molecular Docking and Simulation studies of Farnesyl Transferase with the potential inhibitor Theflavin. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1: 141-148.

BARBAR A., CUSSON M., 2014.- La prénylation des protéines chez les insectes : cible prometteuse pour le développement d'insecticides biorationnels ciblant les Lépidoptères ? *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 18(3): 376-382.

BENAHMED M., ELOMRI A., AKKAL S., LAOUAR H., VÉRITÉ P., SEGUIN E., 2008.- Flavonoids from *Bupleurum montanum* Coss (Apiaceae). *Planta Med*, 74: 89.

BENCHERAIET R., KHERRAB A., KABOUCHE A., KABOUCHE Z., JAY M., 2011.- Flavonols and Antioxidant Activity of Ammi visnaga. (Apiaceae). *Rec. Nat. Prod.* 5(1): 52-55.

BONFILI L., CECAVINI V., AMICI M., 2008.- Natural polyphenols as protosome modulators and their role as anti-cancer compound. *The F. E. B. S. Journal.*, 275(22): 5512-26.

BOURAIYOU A., 2009.- Thèse de Doctorat, Université de Constantine1.

BOS J.L., 1989.- RAS oncogenes in human cancer: a review. *Cancer. Res*, 49: 4682–4689.

BRUNETON J., 2009.- Pharmacognosie Phytochimie Plante médicale., *Edition. Médicale. Internationale. (Tec et Doc)*, Paris, 1288 pp.

BUCKNER F.S., BAHIA M.T et al., 2012.- Pharmacological Characterization, Structural Studies, and *In Vivo* Activities of Anti-Chagas Disease Lead Compounds Derived from Tipifarnib *Antimicrob. Agents Chemother*, 56(9): 4914-4921.

CAO H., PAUFF J.M., HILLE R., 2014.- X-ray crystal structure of a xanthine oxidase complex with the flavonoid inhibitor quercetin. *J. Nat. Prod*, 7: 1693–1699.

CALDELARI D., STERNBERG H., CONCEPCION M., GRUISSEM W., YALOVSKY S., 2001.- Efficient prenylation by a plant geranylgeranyltransferase-I requires a functional CaaL box motif and a proximal polybasic domain. *Plant Physiol.* 126: 1416–1429.

CASTELLANO E., SANTOS E., 2011.- Functional Specificity of Ras Isoforms. *Genes Cancer*, 2(3): 216–231.

CAU P., LEVY N., NAVARRO C., GIOVANNOLI A.C., ROLL P., 2013.- Dix ans de recherche translationnelle et valorisation dans la Progeria: du gène aux applications thérapeutiques et à la cosmétique. *Médecine Science Amérique*, 2 : 3.

CHAKRABARTI D., AZAM T., DEL VECCHIO C., QIU Y.L., PARK I., ALLEN C.M., 1998.- Protein prenyltransferase activities of Plasmodium falciparum. *Mol. Biochem. Parasitol*, 94: 175–184.

CHANG H.L., SU J.H., YEH Y.T., LI Y.C., CHEN H.M., WU Y.C., YUAN S.F., 2008.- Protoapigenone a novel flavonoid inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer. Lett*, 267 : 85-95.

CHANETA A., MILENKOVIC D., DEVAL C., POTIER M., CONSTANS J., MAZUR A., 2012.- Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23: 469–477.

CHEN D., DOU Q.P., 2008.- Tea polyphenols and their role in cancer prevention and chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci*, 9: 1196-1206.

CHEN X., MAKAREWICZ J.M., KNAUF J.A., JOHNSON L.K., FAGIN J.A., 2013.- Transformation by HrasG12V is consistently associated with mutant allele copy gains and is reversed by farnesyl transferase inhibition. *Oncogene*, 33: 5442-5449.

CHENG J., HUNG C.F., YANG S., WANG J.P., WON S.J., 2008.- Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxylchalcones as cancer chemo preventive agents. *Bioorganic Medical Chemistry*, 16 (15): 7270-7276.

CUSHNIE T., LAMB A.J., 2005.- Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.

DA COSTA Y., 2003.- Les phyto-nutriments bioactifs. Ed., DACOSTA, Paris, 317 p.

DEMACHY I., PIQUEMAL J.P., 2014.- La surface d'énergie potentielle vue par les champs de forces. *Actualité Chimique*, 388(389): 37-42.

DER C.J., COX A.D., PHILIPS M.R., 2015.-Targeting RAS membrane association: back to the future for anti-RAS drug discovery. *Clin. Cancer. Res*, 21: 1819–1827.

DHAR M.K., KOUL A., KAUL S., 2013.- Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. *New Biotechnology*, 30 (2): 114–123.

EASTMAN R.T., BUCKNER F.S., YOKOYAMA K., GELB M.H., VAN VOORHIS W.C., 2006.- Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation. *Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications*, 47(2): 233-40.

EDENHARDER R., GRUNHAGE D., 2003.- Free radical scavenging abilities of flavonoid as mechanism of protection against mutagenicity induced by terbutyl hydro peroxide or cumene hydro pyroxyde in salmonella typhimurium TA102. *Mutat.Ras.*, 540 : 1-18.

FU Y., CHEN J., LI Y.J., ZHENG Y.F., LI P., 2013.- Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. *Food Chemistry*, 141: 1063–1071.

GARCIA-LAFUENTE A., GUILLAON E., VILLARES A., ROSTAGNO M.A., MARTINEZ J.A., 2009.- Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58: 537-552.

GHASEMI S., GHANBARZADEH S., MOZAFFARI S., DAVARAN S., 2015.- Improved anticancer effect of I-778,123, a farnesyl-transferase inhibitor. *Pharm. Ind*, 77(6): 920-926.

HENDRITCH B.A., 2006.- Flavonoid-membrane interaction: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27 : 27-40.

HAMLAOUI I., 2014.- Etude théorique des réactions enzymatiques : Cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de nouvelles chalcones. Université Constantine 1.

HUANG S.Y., ZOU X., 2010.- Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int.*

J. Mol. Sci, 11: 3016-3030.

JAYASHREE B.S., NIGAM S., PAI A., PATEL H.K., REDDY N.D., KUMAR N., RAO C.M., 2015.-Targets in anticancer research. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53: 489-507.

JEOANG J.H., AN J.K., KWON Y.T., RHEE J.G., LEE Y.J., 2009.-Effects of low dose quercetin :cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of cellular biochemistry*, 106 : 73-82.

KANG H.M., KIM J.H., LEE M.Y., SON K.H., YANG D.C., BAEK N.I., KWON B.M., et al., 2004.- Relationship between flavonoid structure and inhibition of farnesyl protein transferase. *Natural Product Research*, 18 (4): 349–356.

KIM M.J., LEE H.S., KIM J.H., KIM Y.J., KWON J.H., LEE J.O., BANG S.M., PARK K.U., KIM D.W., KANG S.B., et al., 2012.- Different metastatic pattern according to the *KRAS* mutational status and site-specific discordance of *KRAS* status in patients with colorectal cancer. *BMC. Cancer*, 12: 347.

KIMMELMAN A.C., COX A.D., FESIK S.W., LUO J., DER C.J., 2014.- Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13: 828-851.

KUMAR S., PANDEY A. K., 2013.- Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview .*The Scientific World Journal*, 16.

LIN J.P., YANG J.S., LU C.C., WU C.L., LIN H.L., CHUNG J.G., ET AL., 2009.- Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response in vivo. *Leuk. Res*, 33: 823-828.

LIN S., ZHANG G., LIAO Y., PAN J., GONG D., 2015.- Dietary Flavonoids as Xanthine Oxidase Inhibitors: Structure–Affinity and Structure–Activity Relationships. *J. Agric. Food Chem*, 63: 7784–7794.

LIPINSKI C.A., LOMBARDO F., DOMINY B.W., FEENEY P.J., 1997.- Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Delivery Rev*, 23: 4-25.

LI-WEBER M., 2009.- New therapeutic aspects of flavones : the anticancer properties of scutellaria and its mains active constituents wognin baicalein and baicalin. *Cancer tread Ref.*, 35: 57-68.

LONG S.B., CASEY P.J., BEESE L.S., 1998.-Co-crystal structure of protein farnesyl transferase with a farnesyl diphosphate substrate. *Biochemistry*, 37 (27): 9612–9618.

LONG S.B., CASEY P.J., BEESE L.S., 2002.- Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution. *Nature*, p: 419-645.

LUGASI A., HOVARI J., SAGI K.V., ET BIRO L., 2003.- The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedientsis*, 1(4): 119-125.

MAHMOUD A.M., AHMED O.M., ASHOUR M.B., ABDEL-MONEIM A., 2015.- In vivo and in vitro antidiabetic effects of citrus flavonoids: a study on the mechanism of action. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 35: 250-263.

MARTNEZ M.C., SANTIAGO J.L., et al., 2012.- Reconnaissance des formes de trois *Vitis vinifera* L. raisins rouges variétés en fonction des profils d'anthocyanine et flavonols, avec des corrélations entre leurs voies de biosynthèse. *Chimie alimentaire*, 130(1) : 9-19.

MASSOVA I., KOLLMAN P.A., REYES C., KUHN B., et al., 2000.- Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models, *Acc. Chem. Res.*, 33: 889-897.

MARKHAM K.R., 1982.-Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London, 1–60 p.

MAURER-STROH S et al., 2007.- Towards complete sets of farnesylated and geranyl geranylated proteins. *PLoS Comput. Biol*, 3: 66.

Mc CORMICK F., 2016. - K-Ras protein as a drug target. *Journal of Molecular Medicine*, 94(3): 253-258.

Mc TAGGART S.J., 2006.- Isoprenylated proteins. *Cellular and molecular life sciences. Cell. mol. life. Sci*, 63 (3) : 255-267.

MEDIC-SARIC M., VESNA R., MIMZA B., RASTIJA V., BOJIC M., 2009.- From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolic from propolis and wine. *Nutrition. J.*, 8: 33.

MEHTA R., CONSTANTINOU A., RUNYAN C., RAO K., VAUGHAN A., MOON R., 1995.- Flavonoids as DNA Topoisomerase Antagonists and Poisons: Structure-Activity Relationships *J. Natural Products*, 58: 217-225.

MERCADER A.G., DUCHOWICZ P.R., FERNÁNDEZ F.M., CASTRO E.A., BENNARDI D.O., AUTINO J.C., ROMANELLI G.P., 2008.- QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 7470–7476.

MI OH H., KWON B.M., BAEK N.I., KIM S.H., CHUNG I.S., PARK M.H., LEE J.H., PARK H.W., 2005.- Inhibitory activity of Isorhamnetin from *Persicaria thunbergii* on Farnesyl protein transferase. *Archives of Pharmacal Research*, 28: 169-171.

MOORTHY N. S., SOUSA S.F., RAMOS M.J., FERNANDES P.A., 2016.- Binding mode of conformations and structure-based pharmacophore development for farnesyl transferase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*. 1-18.

NAKAGAWA K., KAWAGOE M., YOSHIMURA M., ARATA H., et al., 2000.- Differential Effects of Flavonoid: Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice. *Journal of Health Science*, 46: 509-512.

NGUYEN X., PHAN V., CHAU V., et al., 2013.- Diarylheptanoïdes et flavonoïdes de, *Viscum album* Inhibition LPS-Stimulé production de cytokines pro-inflammatoires dans la moelle osseuse des cellules dendritiques dérivées. *J. Nat. Prod.* , 76 (4): 495-502.

NIJVELDT J.R., VAN NOOD E., VAN HOORN D., BOELENS P.G., VAN NORREN K., VAN LEEUWEN P., 2001.-Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74: 418–25.

OLIVEIRA T.T., NAGEM T.J., MIRANDA C.G., PAULA V.F., TEIXEIRA M.A., 1997.- Inhibitory Action on Aldose Reductase by Soybean Flavonoids. *J. Braz. Chem. Soc.*, 8(3): 211-213.

OSZMIANSKI J., LEE C.Y., 1990.- Inhibitory effect of phenolics on Carotene Bleaching in Vegetables. *J. Agric. Food Chem*, 38: 688-690.

PARK H.W., BODULURI S.R., MOOMAW J.F., CASEY P.J., BEESE L.S., 1997.- Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution. *Science Microbiology*, 150: 1925–1935.

PETERSON J., DWYER J., 1998.- Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18: 1995–2018.

PLOCHMANN K., KORTE G., KOUTSILIERI E., RICHLING E., RIEDERER P., RETHWILM A., SCHREIER P., SCHELLER C., 2007.- Structure–activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460: 1–9.

PRIOR I.A., LEWIS P.D., MATTOS C., 2012. - A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*, 72(10): 2457-67.

PYLAYEVA Y., GRABOCKA E., 2014.- Wild-type H- and N-Ras promote mutant K-Ras-driven tumorigenesis by modulating the DNA damage response. *Cancer Cell*, 25(2): 243–256.

QIAN D., ZHOU D., JU R., CRAMER C.L., YANG Z., 1996.- Protein farnesyl transferase in plants: molecular characterization and involvement in cell cycle control. *Plant Cell*, 8:

2381–2394.

QIAN Y., EDWINA C., ZHANG T., et al., 1997.- Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyl transferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines. *Bio Chemistry*, 15: 1283 -1288.

RAPONI M., JEFFREY E., HONGTAO F., LESLEY D., et al., 2008.- A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia. *blood*, 111: 5.

REISS Y., GOLDSTEIN J.L., SEABRA M.C., CASEY P.J., BROWN MS., 1990.- Inhibition of purified p21Ras farnesyl: protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell*, 62: 81–88.

RODRIGUEZ J.B., SZAJNMAN S.H., 2012.- New antibacterials for the treatment of toxoplasmosis; a patent review. *Expert. Opin. Ther. Pat*, 22(3):311-33.

SANTTI R., MAKELA S., STRAUSS L., KORMAN J., KOSTIAN M.L., 1998.- Phytoestrogens: Potential Endocrine Disruptors in Males. *Toxicol Ind Health*, 14: 223-237.

SHARMA B., VISWANATH G., SALUNKE R., ROY P., 2008.- Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry*, 110: 697–705.

SHEN M., PAN P., LI Y., LI D., YU H., HOU T., 2015.- Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling. *Drug Discovery Today*, 20(2): 267–276.

SHIEH A., WARD A.F., DONLAN K.L., HARDING-THEOBALD E.R., XU J., MULLIGHAN C.G., ZHANG C., CHEN S.C., SU X., DOWNING J.R et al., 2013.- Defective K-Ras oncoproteins overcome impaired effector activation to initiate leukemia in vivo. *Blood*, 121(24): 4884-4893.

SHIMIZU M., ITO T., TERASHIMA S., HAYASHI T., ARISAWA M., MORITA N.,

KUROKAWA S., 1984.- Inhibition of Lens Aldose Reductase by Flavonoids. *Phytochemistry*, 23: 1885-1888.

SILVERMAN K.C., KIM L., GRAHAM S.L., BERGSTROM J., KOHL N.E., 1998.- Clavarinic Acid and Steroidal Analogues as Ras- and FPP-Directed Inhibitors of Human Farnesyl-Protein Transferase. *J. Med. Chem.*, 41 (23): 4492 – 4501.

SINENSKY M., 2000.- Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochem. Biophys. Acta*, 1484: 93.

SINGH S., VIJAYA PRABHU S., SURYANARAYANAN V., BHARDWAJ R., SINGH S.K., DUBEY V.K. 2016.- Molecular docking and structure-based virtual screening studies of potential drug target, CAAX prenyl proteases, of *Leishmania donovani*. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 6:1-20.

SONG M.C., 2008.- Bioactive Flavonoids from *Trapa pseudoincisa*. *Journal of the Korean society for applied biological chemistry*, 51: 334-337.

SONI R., SHARMA D., PATEL S., SHARMA B., BHATT T.K., 2016.- Structure-based binding between protein farnesyl transferase and PRL-PTP of malaria parasite: an interaction study of prenylation process in *Plasmodium*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p: 1-12.

SOUSA S. F., FERNANDES P.A., RAMOS M.J., 2008.-Farnesyltransferase inhibitors: a detailed chemical view on an elusive biological problem. *Current Medicinal Chemistry*, 15(15): 1478-1492.

SPANOU C., VESKOUKIS A.S., KERASIOTI T., KONTOU M., ANGELIS A., ALIGIANNIS N., KOURETAS D., 2012.- Flavonoid glycosides isolated from unique legume plant extracts as novel inhibitors of xanthine oxidase. *PLoS ONE*, 7(3): e32214.

SUSANTI D., SIRAT H.M., AHMED F., ALI R.M., AIMI N., KITAJIMI M., 2007.- Antioxidant and cytotoxic flavonoid from the flowers of *Melastoma malabathricum*. *Food. Chem.*, 103: 710-716.

TANIGUCHI Y., HIDAKA M., MITANI H., TOYODA A., SAKAKI Y., 2006.- Génération de modèles knock-out du gène de medaka par mutagenèse cible sélectionnée. *bio. med. central*, 7 (12): 116.

THEVENIN M., 2013.- Développement de nouveaux agents antiparasitaires : vers la synthèse totale de la cissampeloflavone et de dérivés, thèse doctorat. Université de PARIS-SUD.

TOBIN D.A., PICKETT J.S., HARTMAN H.L., FIERKE C.A., PENNER-HAHN J.E., 2003.- Structural characterization of the zinc site in protein farnesyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 9962-9969.

TSIMOGIANNINS D.I., 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: 140-146.

VALLIM M.A., FERNANDES L., ALSPAUGH J.A., 2004.- The RAM1 gene encoding a protein farnesyl transferase b-subunit homologue is essential in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 150:1925-1935.

VAN VOORHIS W.C., GELB M.H., BRUNSVELD L., HRYCZYNA C.A., MICHAELIS S., TAMANOI F., WALDMANN H., 2006.- Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications. *Nature Chemical Biology*, 2: 518 – 528.

VEBER D.F., JOHNSON S.R., CHENG H.Y., SMITH B.R., WARD K.W., KOPPLE K.D., 2002.- Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem*, 45: 2615-2623.

VESELOVSKY A.V., IVANOV Y.D., IVANOV A.S., ARCHAKOV A.I., LEWI P., JANSSEN P., 2002.- "Protein-protein interactions: mechanisms and modification by drugs". *Pub. Med.*, 15(6): 405-22.

WESTON L.A., MATHESIUS U., 2013.- Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 283-297.

WEN L., WU D., JIANG Y., 2014.- Identification of flavonoids in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and evaluation of anticancer activities. *Journal of Functional Foods*, 6 : 555–563.

WILLIAMSON E. M., EVANS F.J., et al., 1989.- Potter's New Cyclopaedia of Botanical Drugs and Preparations, *Revised*, Ed(362), pp: 1988.

WITHERS S.T., KEASLING J.D., 2007.- Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73: 980–990.

WU T., MENGYING H., ZANG X., ZHOU Y., 2013.- A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1828: 2751–2756.

XIE J.H., DONG C.J., NIE S.P., LI F., WANG Z.J., SHEN M.Y., XIE M.Y., 2015.- Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves. *Food Chemistry*, 186: 97–105.

YANG Y., CHAKRAVORTY D.K., MERZ K.M., 2010.- Finding a Needle in the Haystack: Computational Modeling of Mg²⁺ Binding in the Active Site of Protein Farnesyltransferase. *Biochemistry*, 49: 9658-9666.

YAO L.H., JIANG Y.M., SHI J., TOMAS-BARBERAN F.A., DATTA N., SINGANUSONG R., CHEN S.S., 2004.- Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.*, 59: 113-122.

YOKOYAMA K., GELB M.H., 1993.- Purification of a mammalian protein geranyl geranyltransferase: formation and catalytic properties of an enzyme–geranylgeranyl diphosphate complex. *J. Biol. Chem*, 268: 4055–4060.

YU J., ZHOU Y., TANAKA I., YAO M., 2010.- Un nouvel algorithme pour la détection des poches de protéines et des cavités avec une sonde sphère de roulement. *Bioinformatics*, 26 (1): 46 -52.

ZANDI K., TEOH B., SAM S., WONG P., SAZALY A., 2011.- Antiviral activity of four types of bioflavonoïde against dengue virus type 2. *Virology Journal*, 8 : 560.

ZHANG E.H., WANG R.F., GUO S.Z., LIU B., 2013.- An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 22.

ZHOU Y., LU N., ZHANG H., WEI L., 2013.- HQS-3, a newly synthesized flavonoid, possesses potent anti-tumor effect *in vivo* and *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49 : 649–658.

ZIAEE A., ZAMANSOLTANI F., NASSIRI M., ABBASI E., 2009.- Effects of rutin on lipid profile in hyper cholesterolemic rats. *Basic Clin. Pharmacol toxicol*, 104 : 253-258.

Résumé

Le présent travail s'articule autour de la modélisation des interactions protéine-ligands. Cette étude « *in silico* » par le biais du docking moléculaire vise à prédire la structure 3D d'un complexe formé à partir de petites molécules et d'une enzyme afin d'évaluer le mode d'interactions établies entre les deux entités.

Dans ce contexte, ArgusLab 4.01 et discovery 4.0, logiciels libres, sont utilisés pour estimer l'affinité de certains flavonoïdes vis-à-vis de la farnésyl transférase (FTase), une enzyme impliquée dans diverses pathologies dont le processus tumoral.

La modélisation moléculaire par le biais du docking a permis de quantifier l'énergie libre de formation (ΔG_{bind}) de la FTase avec dix flavonols, une chalcone et une bis-chalcone.

D'après les résultats obtenus et comparativement à la molécule référence tipifarnib dont le pouvoir inhibiteur est très important ($IC_{50} = 7,9$ nM), toutes les molécules testées présentent des capacités d'inhibition vis-à-vis de la farnésyl transférase. La bis-chalcone se classe en première position.

ملخص

هذا العمل يتمحور حول نمذجة التفاعلات بين بروتين-مستقبل البروتين للتنبؤ بطريقة رسو الجزيئة. من خلال دراسة *in silico* و باستخدام الدوكينغ يقوم هذا الأخير بتقييم طريقة رسو الانزيم و تقديم البنية ثلاثية الابعاد للمركب و إظهار كيفية التساق الانزيم مع جميع مكونات المستقبل الجزيئي لتوضيح مختلف التفاعلات الموجودة بين المركبين.

في هذا السياق، قمنا باستخدام برمجيات حاسوبية 4.0 Discovery و ArgusLab 4.01 الاول مكن من تقدير التقارب الموجود بين بعض المستقبلات (flavonoides) و الانزيم (farnesyl transférase (FTase). هذا الاخير مسؤول عن نضج بعض البروتينات المتدخلة في ظهور بعض الاورام السرطانية. كبح هذا الانزيم من بين التقنيات

الحديثة المستخدمة في تطوير علاج مرض السرطان.

اذن نمذجة التفاعلات عن طريق الدوكينغ سمح لنا بتقدير نسبة الطاقة الحرة لالتحام المركب FTase مع ال10 chalcone flavonols و bis-chalcone .

من خلال النتائج المتحصل عليها و بالمقارنة مع الجزيئة النمذجية tipifarnib " كل الجزيئات المختبرة اظهرت قدرة على كبح الانزيم خاصة la bis-chalcone التي احتلت المرتبة الاولى.

Abstract

This work is articulated around the modeling of the interactions protein-ligands. This study “*in silico*” by the means of the molecular docking aims at predicting the structure 3D of a complex formed starting from small molecules and of an enzyme in order to evaluate the mode of fixing of the various interactions established between the two entities.

In this context, 2 free are used: softwares ArgusLab 4.01 and discovery 4.0. the first is used to estimate the affinity of some flavonoïdes with farnesyl transferase (FTase), an enzyme implicated in a variety of disease including cancer. The second is used to visualise the types of interactions.

Modeling by the means of the molecular docking made it possible to quantify the free energy of formation (ΔG_{bind}) of the FTase with 10 flavonols, a chalcone and a bis-chalcone.

According to the got results and compared to the molecule reference tipifarnic whose the anticancer property is very important ($IC_{50} = 7.9 \text{ nM}$), all the substances tested presented a powerful inhibition against the FTase with bis-chalcone at first position.

**INTERACTION PROTÉINE-LIGANDS : CAS DE LA FARNÉSYL
TRANSFÉRASE ET DES FLAVONOÏDES**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

Résumé

Le présent travail s'articule autour de la modélisation des interactions protéine-ligands. Cette étude «*in silico*» par le biais du docking moléculaire vise à prédire la structure 3D d'un complexe formé à partir de petites molécules et d'une enzyme afin d'évaluer le mode d'interactions établies entre les deux entités.

Dans ce contexte, ArgusLab 4.01 et Discovery 4.0, logiciels libres, sont utilisés pour estimer l'affinité de certains flavonoïdes vis-à-vis de la farnésyl transférase (FTase), une enzyme impliquée dans diverses pathologies dont le processus tumoral.

La modélisation moléculaire par le biais du docking a permis de quantifier l'énergie libre de formation (ΔG_{bind}) de la FTase avec dix flavonols, une chalcone et une bis-chalcone.

D'après les résultats obtenus et comparativement à la molécule référence tipifarnib dont le pouvoir inhibiteur est très important ($IC_{50} = 7,9 \text{ nM}$), toutes les molécules testées présentent des capacités d'inhibition vis-à-vis de la farnésyl transférase. La bis-chalcone se classe en première position.

Mots clés : Farnésyl transférase, cancer, inhibition, flavonoïdes, docking.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de chimie des Matériaux Constantine (LCMC)

Jury d'évaluation :

Président du jury: SATTA D (PR - UFM Constantine),
Rapporteur : BENCHERAIET R (MCA - UFM Constantine),
Examinatrice : HAMLAUOI I (MCB - UFM Constantine).

Date de soutenance : 15/06/2016