



République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la nature et de la vie, et des sciences de la terre et de l'univers

Mémoire élaboré en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER En Sciences Biologique

Option :

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème :

**Inhibition de Vac A dans la prévention des lésions
cancéreuses au cours de l'infection par *Helicobacter
pylori.***

Présenter par :

FAREDEHEB Zakia

GHERBI Meryem

sous la direction de :

Mr. CHERRAK Ahmed Sabri

Soutenu le **29/06/2022** devant le jury composé de :

Présidente **Mme. SAHI-DALI YUCEF Majda** *Université de Tlemcen*

Encadreur **Mr. CHERRAK Ahmed Sabri** *MCA Université de Tlemcen*

Examineur **BERRAHOU Samira** *MAA*

Année universitaire **2021/2022**

Résumé

Introduction : La protéine du gène A liée à la cytotoxine A vacuolée (Vac A) est le principal facteur de virulence d'*Helicobacter pylori*. Cette toxine a été liée à de graves maladies d'estomac. Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes et ont de puissants effets antibactériens. Ce travail vise à étudier l'interaction d'un groupe de flavonoïdes avec la protéine Vac A par Docking moléculaire.

Méthode : Un panel de 26 flavonoïdes a été utilisé dans cette étude. La structure 3D de la protéine (Vac A) a été obtenue à partir de la Protéine Data Bank. L'amarrage moléculaire a été réalisé à l'aide d'un logiciel *AUTODOCK VINA* et les résultats ont été exprimés en énergie de liaison (kcal/mol), l'analyse des interactions protéine-ligand à l'aide du logiciel *Discovery studio*, et les propriétés pharmacocinétiques à l'aide de *swissadme.ch*.

Résultats : Pour la protéine Vac A, les molécules CLIMATIN, DIOSMIN et APIGENINE ont montré l'affinité de liaison la plus faible (-8,8, -8,6 et -8,5 kcal/mol, respectivement). L'interaction de la CLIMATIN, de la DIOSMINE et de l'APIGENINE avec les protéines Vac A impliquent leurs groupements hydroxyles et leurs groupements carbonyles.

Conclusion : Notre étude montre que le composé CLIMATIN est de bon candidat pour contrôler la pathogénicité de *H. pylori*. Par conséquent, des études *in vitro* et *in vivo* sur *H. pylori* sont recommandées pour évaluer ce potentiel.

Mots clés : *Helicobacter pylori*, Vac A, domaine p55, amarrage, flavonoïdes.

Abstract

Introduction: The vacuolated cytotoxin A-related gene A protein (Vac A) is the major virulence factor of *Helicobacter pylori*. This toxin has been linked to severe stomach problems. Flavonoids are secondary metabolites of plants and have potent antibacterial effects. This work aims to study the interaction of a group of flavonoids with the Vac A protein by molecular docking.

Methods: A panel of 26 flavonoids was used in this study. The 3D structure of the protein (Vac A) was obtained from the Protein Data Bank. Molecular docking was performed using AUTODOCK VINA software and results were expressed in binding energy (kcal/mol), protein-ligand interaction analysis using Discovery studio software, and pharmacokinetic properties using swissadme.ch

Results: For Vac A protein, CLIMATIN, DIOSMIN and APIGENINE showed the lowest binding affinity (-8.8, -8.6 and -8.5 kcal/mol, respectively). The interaction of CLIMATIN, Diosmin and APIGENIN with Vac A proteins involved their hydroxyl groups and carbonyl groups.

Conclusion: Our study shows that the compound CLIMATIN is a good candidate to control the pathogenicity of *H. pylori*. Therefore, *in vitro* and *in vivo* studies on *H. pylori* are recommended to evaluate this potential.

Key words: *Helicobacter Pylori*, Vac A, domain p55, docking, flavonoids.

الملخص

مقدمة: بروتين الجين A المرتبط بالسموم الخلوية (Vac A) هو عامل الفوعة الرئيسي لـ *Helicobacter pylori*. تم ربط هذا السم بأمراض المعدة الخطيرة. الفلافونويد هي مستقبلات ثانوية للنباتات ولها تأثيرات قوية مضادة للبكتيريا. يهدف هذا العمل إلى دراسة تفاعل مجموعة من الفلافونويد مع البروتين Vac A عن طريق الالتحام الجزيئي.

الطرق: تم استخدام لوحة من 26 فلافونويد في هذه الدراسة. تم الحصول على البنية ثلاثية الأبعاد للبروتين (Vac A) من بنك بيانات البروتين. تم إجراء الالتحام الجزيئي باستخدام برنامج AUTODOCK VINA وتم التعبير عن النتائج في طاقة الارتباط (kcal/mol) ، وتحليل تفاعل البروتين والرباط باستخدام برنامج Discovery studio ، والخصائص الحركية الدوائية باستخدام swissadme.ch

النتائج: بالنسبة لبروتين Vac A ، أظهرت الجزيئات CLIMATINE وDIOSMIN وAPIGENINE أقل تقارب ارتباط (- 8.8 و - 8.6 و - 8.5 سرعة حرارية/مول، على التوالي). اشتمل تفاعل CLIMATIN وDiosmine وAPIGENINE مع بروتينات Vac A على مجموعات الهيدروكسيل والكربونيل.

الاستنتاج: تظهر دراستنا أن مركب CLIMATIN هو مرشح جيد للتحكم في مسببات أمراض *H. pylori*. لذلك، يوصى بإجراء دراسات في المختبر وفي الجسم الحي على *H. pylori* لتقييم هذه الإمكانيات.

الكلمات المفتاحية: هيليكوباكتريا بيلوري ; فلافونويد المجال p55 الارساب Vac A

Introduction

Introduction

Helicobacter pylori est une bactérie micro-aérophile Gram négatif en forme spirale qui colonise l'estomac humain(Marshall & Warren., 1984). Elle entraîne de nombreuses maladies responsables de différentes pathologies telles que la muqueuse gastroduodénale(Razafimahefa et al., 2012), et constitue un facteur de risque majeur de gastrite, d'ulcère peptique, de cancer gastrique et de lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses(Tombola et al., 2003). L'infection est généralement silencieuse et constitue un réel problème de santé publique, elle touche une grande partie de la population mondiale, près de 50% sont atteints de malignité due à l'implication d'agents infectieux. En effet, dans certains pays africains la prévalence de l'infection à *H. pylori* dépasse 95%. A Madagascar, cette prévalence est de 82% chez l'adulte(Razafimahefa et al.,2012). *H. pylori* est trouvé chez plus de 90% des personnes souffrantes d'un ulcère duodéal et chez environ 80% de celles qui ont un ulcère gastrique(HELICOBACTER,). bien que *H. pylori* est sensible à de nombreux antibiotiques *in vitro*, seuls quelques antibiotiques peuvent être utilisés *in vivo* pour traiter les patients infectés (Ghotaslou, 2015).

Cette bactérie vit dans un milieu particulièrement acide , elle a besoin de 5% d'oxygène et de 5% à 10% de dioxyde de carbone, et se développe le mieux à 37°C(Guerar&Zaoui.,2020).C'est une bactérie micro-aérophile qui réside dans la couche muqueuse et établit un attachement avec les cellules épithéliales gastriques qui conduit à une colonisation persistante dans l'estomac et à l'évasion contre la réponse immunitaire(Chandra Babu et al., 2017).

L'organisation mondiale de la santé a classé *H.pylori* comme cancérogène de classe I en raison de son implication dans le développement du cancer(Lee et al., 2019), qui dépend des caractéristiques immunitaires de l'hôte et la pathogénicité de cette bactérie (Delchier, 2008).

Le cancer gastrique est l'un des types de cancer le plus répandu dans le monde, c'est une maladie agressive avec une faible survie de 5ans en 2012, un million de nouveaux cas de cancer gastrique sont survenus (952 000 cas ou 6.8% du totale), ce qui en fait la cinquième tumeur maligne la plus fréquente dans le monde après les cancers du poumon, du sein, colorectal et de la prostate(Behar et al., 2021) .

Introduction

Le pronostic de la maladie est pauvre, et la prévention primaire est un but. Les causes exactes du cancer gastrique ne sont pas comprises, toutefois, il existe des preuves solides que les adénocarcinomes de l'estomac distal sont en grande partie attribuable aux expositions environnementales tôt dans la vie et une surconsommation des aliments salés et infectés par la bactérie *Helicobacter pylori* (Sivam et al., 1997). En infectant la muqueuse gastrique *H. pylori* produit des protéines adhérentes qui lui permettent de se fixer aux cellules des glandes gastriques. Des études *in vitro* ont examiné la sensibilité de cette bactérie.

(Khulusi et al., 1995). parmi les facteurs de virulence de *H. pylori* quatre ont été particulièrement distingués : CagA, Vac A, OipA et Dup A (Yamaoka, 2010). Ils sont utilisés comme marqueurs de virulence (Cole et al., 2016). Vac A (gène A associé à la vacuole) (Kang & Lee, 2005) a été nommé en référence à sa capacité à provoquer des vésicules membranaires de type « vacuole » dans le cytoplasme des cellules gastriques (Palframan et al., 2012). De surcroît, il est le facteur le plus étudié du génome bactérien (Ly, 2010).

Vac a est aussi une toxine sécrétée qui pénètre dans la membrane cellulaire épithéliale, et induit la formation de vacuoles et affecte les mitochondries conduisant à l'apoptose (Fuccio, 2010); par la voie de signalisation elle est sécrétée à partir de *H. pylori* par le système de sécrétion de type V (T5SS), agit sur la cellule hôte en induisant une vacuolisation et l'apoptose, et augmente également la production d'IL-8 en activant le p38 MAPK par libération intracellulaire de Ca^{2+} , activant ainsi les facteurs de transcription ATF-2, CREB et NF- κ B (González et al., 2021). Et par la voie mitochondriale, l'activation des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2 (B-cell CLL/lymphoma2) (Domańska et al., 2010). Elle inhibe l'activité glyco-gène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) qui intervient dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire (lymphocyte T, cellules tumorales) par la voie de phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt (Ly, 2010). Bien que ce gène soit présent dans toutes les souches, seules quelques-unes ont une fonction vacuolante (Mamoudou & Meriem, 2015).

Vac A provoqué une vacuolisation massive des lignées cellulaires épithéliales *in vitro* et une érosion épithéliale gastrique *in vivo* (Ilver et al., 2004). Elle est impliquée dans diverses fonctions cellulaires, notamment la création de canaux membranaires, la libération du cytochrome c du cytoplasme, et la liaison aux récepteurs membranaire (Razafimahefa et al., 2012), une inhibition de la présentation antigénique, une inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T et la mort cellulaire induite par Vac A *in vitro* (Radin et al., 2014).

Introduction

Ce facteur majeur forme des canaux sélectifs pour les anions dans la membrane de l'endosome qui provoquent le gonflement du compartiment, en soi-disant vacuoles (**Kern et al., 2015**), en conséquence, une réponse pro-inflammatoire est déclenchée (**Razafimahefa et al., 2012**).

L'auto transporteur de cytotoxine vacuolante est une protoxine de 140kDa avec 1287 acides aminés libérés par *H. pylori* dans la lumière de l'intestin. Il subit un clivage N- et C-terminal au cours du processus de sécrétion pour donner une toxine mature de 88kDa constituées (de 1 à 821) résidus de longueur (p88), Le domaine p33N-terminal (résidus 1 à 311) contient des résidus hydrophobes (de 6 à 27) impliqués dans la formation des pores, tandis que les résidus de domaine p55 de 312 à 821 contiennent un ou plusieurs domaines de liaison cellulaire (**Gangwer et al., 2007**) ces deux domaine p33 et p55 sont impliqués dans la formation des canaux ioniques dans la membrane cytoplasmique (**Jouimyi et al., 2020**).

Vac A ne montre aucune homologie significative avec aucune autre protéine connue. La toxine mature, qui peut être transformée en sous-unités p33 N-terminal et p55 C-terminal, est constituée de trois régions présentant une diversité allélique particulière : la région signal N-terminale (avec les allèles s1 et s2), la région intermédiaire dans la p33 domaine (i1, i2, i3) et la région médiane dans le domaine p55 (m1, m2) (**Kern et al., 2015**). le risque de développement d'un adénocarcinome gastrique ou d'un ulcère peptique est augmenté chez les personnes infectées par des souches porteuses d'allèles s1, m1 ou i1 par rapport à celle infectées par des souches s2, m2 ou i2 (**Floch et al., 2017**).

Cette dernière se fixe sur deux types de récepteurs la protéine-tyrosine phosphatase RPTP α et la protéine tyrosine phosphatase β (RPTP β) qui sont des récepteurs tyrosines phosphatases situés dans la membrane épithéliale, cette liaison Vac A-RPTP interfère avec les infections lysosomales et endosomales, entraînant leur perturbation (**Ly, 2010**). Néanmoins plus d'information sur les résidus de liaison de Vac A n'étaient pas claire.

Cependant, les séquences d'acides aminés dans les hélices β du domaine p55 assurent la médiation de la liaison de Vac A aux cellules hôtes. En outre de nombreux groupes de recherche ont indiqué que la région de liaison sur le domaine p55 est considérée comme un site essentiel pour l'attachement aux cellules épithéliales (**Chiranjeevi & Swargam, 2016**). Cette protéine utilise des effets pléiotropes cellulaires qui aggravent le tractus gastro-intestinal vers des maladies incontrôlables graves. Pour éviter de telles conditions, il est donc nécessaire

Introduction

De concevoir de nouveaux inhibiteurs contre Vac A susceptibles de stopper ou de diminuer l'effet délétère de cette protéine.

Les effets antibactériens des flavonoïdes comprennent l'inhibition de l'attachement bactérien aux récepteurs de l'hôte ; l'inhibition de la formation de biofilm et la neutralisation des toxines bactériennes(Oh et al., 2010).

Ainsi, le but du présent travail est l'identification de molécules qui peuvent avoir une valeur potentielle en tant qu'inhibiteurs spécifiques de cette toxine(Tombola et al., 1999). L'évaluation de nouveaux inhibiteurs contre le domaine p55 de la toxine Vac A produite par *H. pylori*(Chiranjeevi & Swargam, 2016) est donc importante afin d'identifier et de caractériser les activités de formation de canaux et de vacuolisation de la toxine, visant à une meilleure compréhension des propriétés de ce nouveau canal fournissant des preuves supplémentaires de la corrélation entre l'activité des canaux et la vacuolisation.

Nous avons fait le choix, dans notre étude de cibler directement Vac A en son domaine p55 qui est le plus essentiel dans l'adhérence que le domaine p33. Le domaine p55 est considéré comme une cible médicamenteuse et sa structure a permis d'étudier et de concevoir de nouveaux inhibiteurs contre la toxine Vac A *in silico*. Notre choix s'est porté sur les molécules ayant comme structure de base un rutoside, molécule naturelle présente dans la structure des flavonoïdes. L'objectif étant d'évaluer le pouvoir inhibiteur de ces molécules et la possibilité de les présenter comme des médicaments potentiellement actifs contre le cancer en utilisant la simulation moléculaire (Docking) ; outil indispensable dans la recherche pharmaceutique de nos jours.

2. Matériel et méthodes :

Matériel et méthodes

2.1. Préparation de la protéine :

La structure cristallisée de la protéine Vac A ayant comme ID PDB 2QV3 a été extraite de la banque de données des protéines <http://www.rcsb.org> (**PROTEIN DATA BANK, Hayashi et al., 2012**). La protéine a été obtenue avec une bonne résolution (2.4 Å) et ne présente aucune mutation.

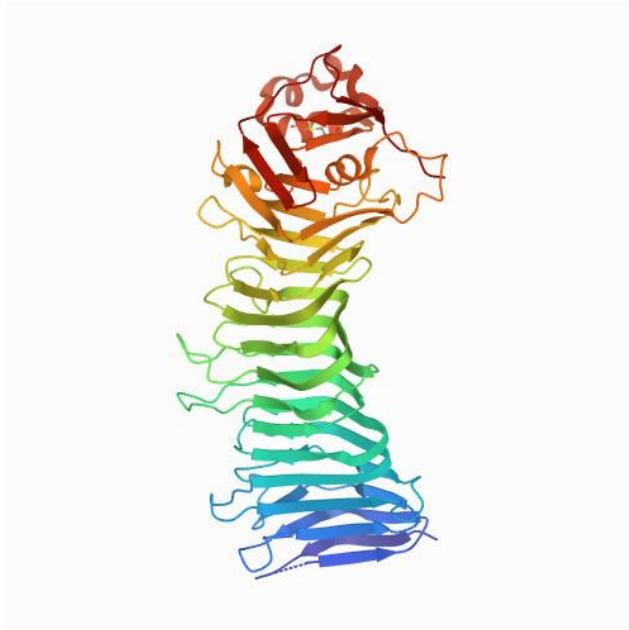


Figure 1: Structure de la cible 2QV3

2.2 Téléchargements des ligands :

Un ensemble de 25 composés contenant comme structure de base un rutoside lié à un flavonoïde ont été obtenus à partir de la base de données PUBCHEM en format sdf (**PubChem**). Cette bibliothèque de molécules a été obtenue en appliquant un filtre sur la masse moléculaire.

2.3. L'amarrage moléculaire :

Le Docking a été réalisé en utilisant la structure identifiée de la protéine Vac A. En utilisant le logiciel "AUTODOCK VINA » connecté à CHIMERA, le programme CHIMERA a été utilisé pour cibler le domaine p55 contenant les résidus 312 à 821 (**Chiranjeevi&Swargam, 2016**) comme site actif.

Le Docking a été effectué composé par composé avec Vac A, en prenant soin d'ajouter des atomes d'hydrogène, des charges, et une énergie minimale G au préalable via l'outil DOCK PREP (ver 1.15) du programme CHIMERA UCS

Matériel et méthodes

Après Docking, les composés présentant les plus faibles énergies de liaison (kcal/mol) sur le site actif ont été sélectionnés.

2.4 Identification des interactions :

Les 25 composés avec la protéine 2QV3 sont importés les uns après les autres dans le programme Discovery studio, permettant de visualiser en 2D les nombreux diagrammes d'interaction, notamment entre le site actif de la protéine et les ligands. En effet, il révèle les liaisons hydrogène et les liaisons hydrophobes formées entre les acides aminés du site actif de la cible 2QV3 et les RUTINOSIDES.

2.5 Détermination des paramètres pharmacocinétique :

Les propriétés physicochimiques et les prédictions de paramètres (ADME) pour les caractéristiques pharmacocinétiques présentant la plus faible énergie de liaison ont été évaluées à l'aide de l'outil en ligne swissadme.ch après le Docking(**Daina et al., 2014**)

3. Résultats et discussion

Résultats et discussions

1.3. L'étude d'amarrage :

La structure cristalline tridimensionnelle de la protéine Vac A (PDB ID :2QV3) est désormais accessible sur le site "RCSB PDB (PROTEIN DATA BANK).

Les énergies de liaison (kcal/mol) obtenues par Docking moléculaire ont été rapportées, et les interactions protéine/ligand ont été étudiées à l'aide de l'outil BIOVIA DISCOVERY.

Plus l'énergie de liaison est faible, plus l'efficacité de la liaison est grande et, par conséquent, plus l'inhibition est importante. La CLEMATIN, une molécule naturelle, présentait l'énergie de liaison la plus faible avec la cible 2QV3 dans cette étude, avec -8,8 kcal/mol (**figure2**), suivie par l'APIGENINE 7-rutinoside, qui présentait une énergie de liaison de -8,6 kcal/mol(**figure3**) et (**tableau01**)

Le tableau 01 illustre les résultats des sites de configuration idéale acquis à partir de l'ensemble des 25 produits chimiques amarrés. La biodisponibilité des 25 composés RUTINOSIDE a été étudiée

Résultats et discussions

Tableau 1: coordonnées et énergie de liaison de vingt-et-cinq ligands RUTINOSIDES amarrés à la protéine Vac A.

Composés	PUBCHEM ID	Formules moléculaire	Masse moléculaires (g/mol)	ΔG (kcal/mol)
HESPIRIDIN	10621	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.5	-8.4
PELARDONIDIN3-O-RUTINOSIDE BETAINE	443918	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	578.5	-8.4
RUTIN	5280805	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	-7.5
DIOSMIN	5281613	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608.5	-8.5
METHYLHESPERIDIN	5284419	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.6	-8.1
LINARIN	5317025	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	592.5	-8.3
ISORHAMNETIN3-O-ALPHA-RHAMNOPYRANOSYL-(1-2)-BETA-GALACTOPYRANOSIDE	5487249	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.5	-8.3
3',4',5,7-TETRAHYDROXY-3-METHOXYFLAVONE-7-O-ALPHA-L-RHAMNOPYRANOSYL-(1-≥6)-BETA-D-GLUCOPYRANOSIDE	5494544	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.5	-8.5
QUERCETIN 3-O-ROBINOBIOSE	10371536	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	-7.6
PECTOLINARIN	12313193	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	622.6	8.5
LUTEOLIN-7-O-GENTIOBIOSE	14032967	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	-8.3
KAEMPFEROL-3-O-ROBINOBIOSE	15944778	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.5	-8.4
ERIOCITRIN ; LMPK12140366	42607972	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596.5	-8.1
CLEMATIN	42608007	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	610.6	-8.8
DELPHINIDIN 3-RUTINOSIDE	44256887	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.5	-7.8
APIGENIN 7-RUTINOSIDE	44257811	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ ⁺	578.5	-8.6
NARCISSIN ; SCHMBL1305421 ; LMPK12110586	44258019	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	624.5	-8.3
TAMARIXETIN 7-RUTINOSIDE ; LMPK12110603	44258036	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.5	-8.3
LUTEOLIN RUTINOSIDE	44258082	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	594.5	-8.3
DATISCIN ; LMPK12111620	44258713	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.5	-8.4
KAEMPFEROL 3-ROBINOBIOSE	44258742	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.5	-8.3
2',4',5-TRIHYDROXY-7-(6-O-(BETA-D-GLUCOPYRANOSYL) - BETA-D-GLUCOPYRANOSYLOXY) ISOFLAVONE	71563063	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	-8.3
GENISTEIN 7-GENTIOBIOSE	90657741	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	549.5	-8.3
PETUNIDIN 3-O-RUTINOSIDE	10194983	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₆	625.6	-8.1
HESPERIDIN ; SW219122-1 ; RBD-K93633846-001-01-7	129010007	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.6	-8.1

Résultats et discussions

Les composés présentant les énergies de liaisons les plus faibles ont été soumis au programme BIOVIA Discovery afin d'en savoir plus sur les nombreuses liaisons formées par ces molécules et les acides aminés du site actif de la cible 2QV3 et d'autre part les ligands de rutinose. L'activité antibactérienne des flavonoïdes dépend de leurs structures (**Joumyi et al., 2020**). De manière générale, les interactions protéine-ligand se caractérisent notamment par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes, qui jouent un rôle majeur dans la prédiction et l'évaluation de la force de liaison entre ligands et protéines (**Mkhelfi, 2021**).

Résultats et discussions

Tableau 2: Interactions des 6 ligands les mieux ancrés contre le site actif de la protéine

Meilleurs composés amarrés	Les acides aminés de Vac A qui interviennent dans les interactions du composé	Types d'interaction	ΔG kcal/mol
HESPIRIDIN	GLU A438	2 liaisons hydrogène conventionnelle	-8.4
	TRH A485	Liaison hydrogène conventionnelle	
	ARG A402	2 liaisons hydrogène conventionnelle Alkyl	
	ASN A436	Liaison hydrogène-carbone	
	SER A434	Liaison hydrogène-carbone	
	PHE A483	Liaison hydrogène-carbone Pi-Pi	
	SER A504	Liaison hydrogène-carbone	
CLEMATIN	ASN A484	Liaison hydrogène conventionnelle	-8.8
	SER A504	Liaison hydrogène conventionnelle Défavorable accepteur-accepteur	
	VAL A526	Liaison hydrogène-carbone	
	LYS A465	Alkyl	
LINARIN	ARG A402	Liaison hydrogène conventionnelle Alkyl	-8.3
	GLU A438	Liaison hydrogène conventionnelle	
	ASN A436	Liaison hydrogène-carbone	
	THR A485	Liaison hydrogène conventionnelle	
	ASN A484	Van der Waals	
	PHE A483	Pi-Pi T-shaped	

Résultats et discussions

	TYR A529	Liaison hydrogène-carbone	
DIOSMIN	ASN A484	Liaison hydrogène conventionnelle	-8.5
	ASN A436	Liaison hydrogène conventionnelle Alkyl	
	ARG A402	Liaison hydrogène conventionnelle Défavorable donateur-donateur Pi-Pi T-shaped	
	SER A504	Liaison hydrogène-carbone	
	PHE A483	Pi-Pi T-shaped	
	THR A485	Liaison hydrogène conventionnelle	
	GLU A	Liaison hydrogène conventionnelle	
QUERCETIN 3-O-ROBINOBIOSIDE	ASN A505	Liaison hydrogène conventionnelle	-7.5
	ASN A463	Liaison hydrogène conventionnelle	
	PHE A483	Liaison hydrogène conventionnelle Liaison hydrogène-carbone Pi-Pi Amide-Pi	
	THR A505	Liaison hydrogène conventionnelle Pi-Pi Amide-Pi	
	TYR A529	Liaison hydrogène-carbone	
	HIS A531	Liaison hydrogène conventionnelle	
	SER A504	Liaison hydrogène conventionnelle	
APIGENIN 7-RUTINOSIDE	ASN A506	Liaison hydrogène conventionnelle	
	THR A505	Liaison hydrogène conventionnelle	

Résultats et discussions

ASN A463	Liaison hydrogène-carbone	-8.6
PHE A483	Liaison hydrogène-carbone	
SER A504	Liaison hydrogène-carbone	
TYR A529	Défavorable donateur-donateur	

De ces résultats, il en ressort que la molécule CLIMATIN fournisse la meilleure énergie de liaisons qui équivalent successivement à **-8.8kcal/mol**. Le composé a établi deux liaisons hydrogènes conventionnelles, une liaison alkyl, une liaison hydrogène-carbone et une liaison défavorable accepteur-accepteur respectivement avec les acides aminés ASN484, SER504, LYS465 et VAL526(**figure02 et tableau 02**).

De même, l'image des différents types de liaisons établies par cette molécule a été produite grâce au logiciel Discovery comme la montre (**figure 02**).

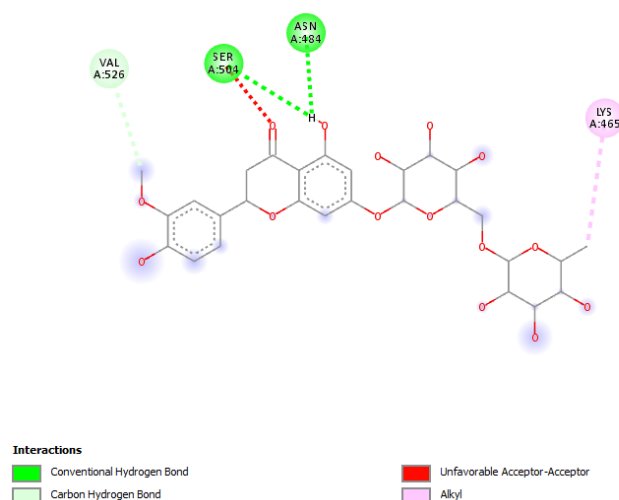


Figure 2: Image 2D de la molécule CLIMATIN

L'APIGENIN 7-RUTINOSIDE est le deuxième composé qui fournit de meilleure énergie de liaison, a présenté un score de liaison de **-8.6kcal/mol** avec la création de 3liaisons

Résultats et discussions

Hydrogènes avec l-----es acides aminés ASN484, ASN506 et THR505, 3 liaisons hydrogène-carbone avec les acide aminés ASN463, PHE483, SER504, et une liaison défavorable donateur-donateur avec l'acide aminé TYR529 (**figure 03 et tableau 02**).

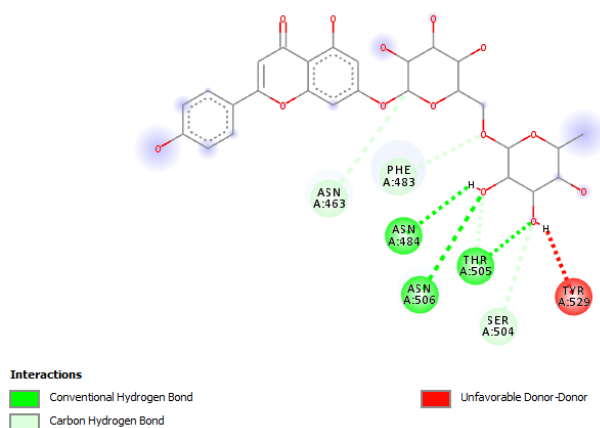


Figure 3 image 2D de la molécule APEGININ 7-RUTINOSIDE

Le QUERCETIN 3-O-ROBINOBIOSE a présenté un score de liaison de **7.5kcal/mol** avec la création d'une liaison hydrogène avec les acides aminés ASN506, ASN463, PHE483, THR505, TYR529, HIS531, une liaison hydrogène-carbone avec l'acide aminé SER504, et une liaison en forme de Pi-Pi et amide-Pi étoilé avec les 2 acides aminés PHE483 et THR505 (**figure 04 et tableau 02**).

Résultats et discussions

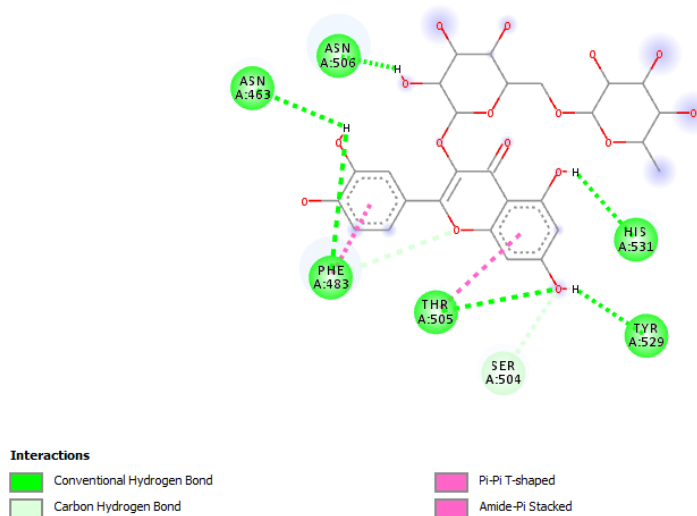


Figure 4 image 2D de la molécule QUERCETIN

Il ressort de ces résultats que la molécule LINARIN a présenté un score de liaison équivalent de **-8.3kcal/mol**. Le composé LINARIN a établi des liaisons hydrogènes avec les acides aminés THR485, GLU438, ARG402, une liaison hydrogène-carbone avec les acides aminés TYR529, ASN436, liaison alkyl et Van der Waals avec l'acide aminé ASN484, et une liaison de forme Pi-Pi T-shaped et amide- Pi stacked avec l'acide aminé PHE483 (**figure 05 et tableau02**).

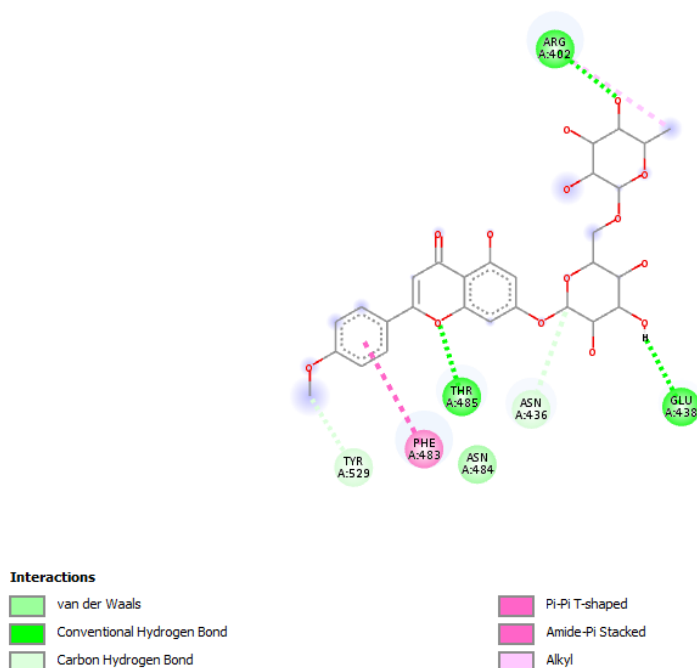


Figure 5 image 2D de la molécule LINARIN

DIOSMIN a présenté

Résultats et discussions

un score de liaison de **-8.5kcal/mol** avec la création d'une liaison hydrogène avec les acides aminés ASN484, ASN436, ARG402, THR485, GLU438, une liaison hydrogène-carbone avec l'acide aminé SER504 et une liaison en forme Pi-Pi T-shaped avec l'acide aminé PHE483, une liaison alkyl et une liaison défavorable donneur-donneur (**figure 06 et tableau 02**).

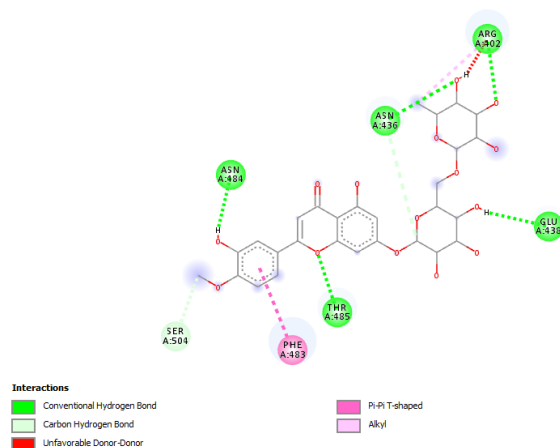


Figure 6: image 2D de DIOSMIN

De ces résultats la molécule HESPIRIDIN a présenté un score de liaison de **-8.4 kcal/mol**, ce composé a établi des liaisons hydrogènes avec les acides aminés ARG402, THR485, GLU438, liaison hydrogène-carbone avec les acides aminées ASN436, SER434, PHE483, SER504, une liaison Pi-Pi T-shaped avec l'acide aminé PHE483, et une liaison alkyl avec l'acide aminé ARG402 (**figure 07 et tableau 02**).

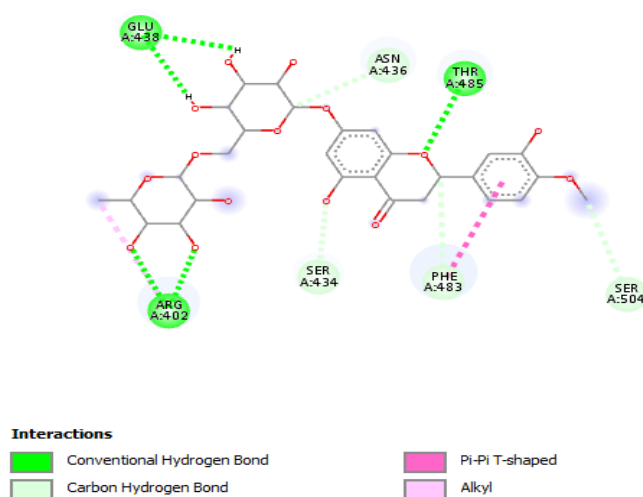


Figure 7 image 2D de HESPIRIDIN

Résultats et discussions

Nous avons constaté que CLIMATIN un composé naturel qui fait partie des flavonoïdes, a présenté la meilleure conformation de liaison avec la cible 2QV3 avec une énergie de liaison de -8.8 kcal/mol, suivi par l'Apigénine 7-rutinoside avec une énergie de liaison de -8.6 kcal/mol(**tableau1**) (**figure2, 3**). Les molécules interagissent avec la protéine VacA par des groupements hydrophobes et de liaisons hydrogènes. Le complexe amarré a montré une stabilité avec un nombre de liaisons hydrogène accrues. En effet Les liaisons hydrogènes jouent un rôle crucial dans la structure et la catalyse des enzymes, et plus le nombre de ces liaisons hydrogènes est élevé, plus l'efficacité de la liaison et de l'inhibition est élevée(**Vennelakanti et al., 2021**). Elles sont indispensables à l'établissement de liaison entre un ligand et une protéine.

Ainsi les ligands interagissent de manière récurrente avec trois acides aminés : Asn484, Ser504 et Phe483. Ces acides aminés sont retrouvés dans la plupart des molécules identifiées ce qui permet de souligner leur importance dans la structure de site de fixation de la protéine Vac A.

La molécule d'Apigénine fait partie des flavonoïdes les plus courants du règne végétal(**Pham, 2020**). On le trouve principalement dans les légumes (persil, céleri, oignons), les fruits (oranges), les herbes (camomille, thym, origan, basilic) et les boissons à base de plantes (thé, bière, vin)(**Hostetler et al., 2017**). Il a été démontré que l'Apigénine possède de multiples propriétés biologiques, notamment des effets anticancéreux, anti-inflammatoires et antioxydants.

De nombreux travaux ont étudié l'interaction de molécules naturelles contre *H. pylori* facteurs de virulence. Dans des études antérieures montrant que parmi les 36 molécules de flavonoïdes qui a passé les règles de Lipinski de 5 les molécules de galangine, de lutéoline et d'Apigénine ont montré l'affinité de liaison la plus élevée avec la protéine VacA, Nous avons également démontré que les interactions de toutes ces molécules avec la protéine VacA impliquaient leurs groupements hydroxyle et/ou carbonyle, indispensables à leur activité antibactérienne.

La molécule d'Apigénine interagit avec la protéine VacA par ses groupements hydroxyle et carbonyle. La puissante activité antibactérienne de l'Apigénine contre un certain nombre de bactéries a été évaluée par plusieurs études comme discuté ci-dessus, l'activité antibactérienne des flavones est dirigée par le nombre et les positions des groupes hydroxyles qu'elles contiennent de ce fait, les groupements hydroxyles de l'Apigénine pourraient être à l'origine de son activité antibactérienne(**Jouimy et al., 2020**).

Résultats et discussions

Les propriétés pharmacocinétiques (ADME) ont été évaluées à l'aide de la règle de **LIPINSKI** et **VEBER** sur le site web swissadme.ch afin d'étudier les caractéristiques pharmacologiques putatives (**tableau03**). Ceci est également valable pour toutes les molécules du (**tableau02**).

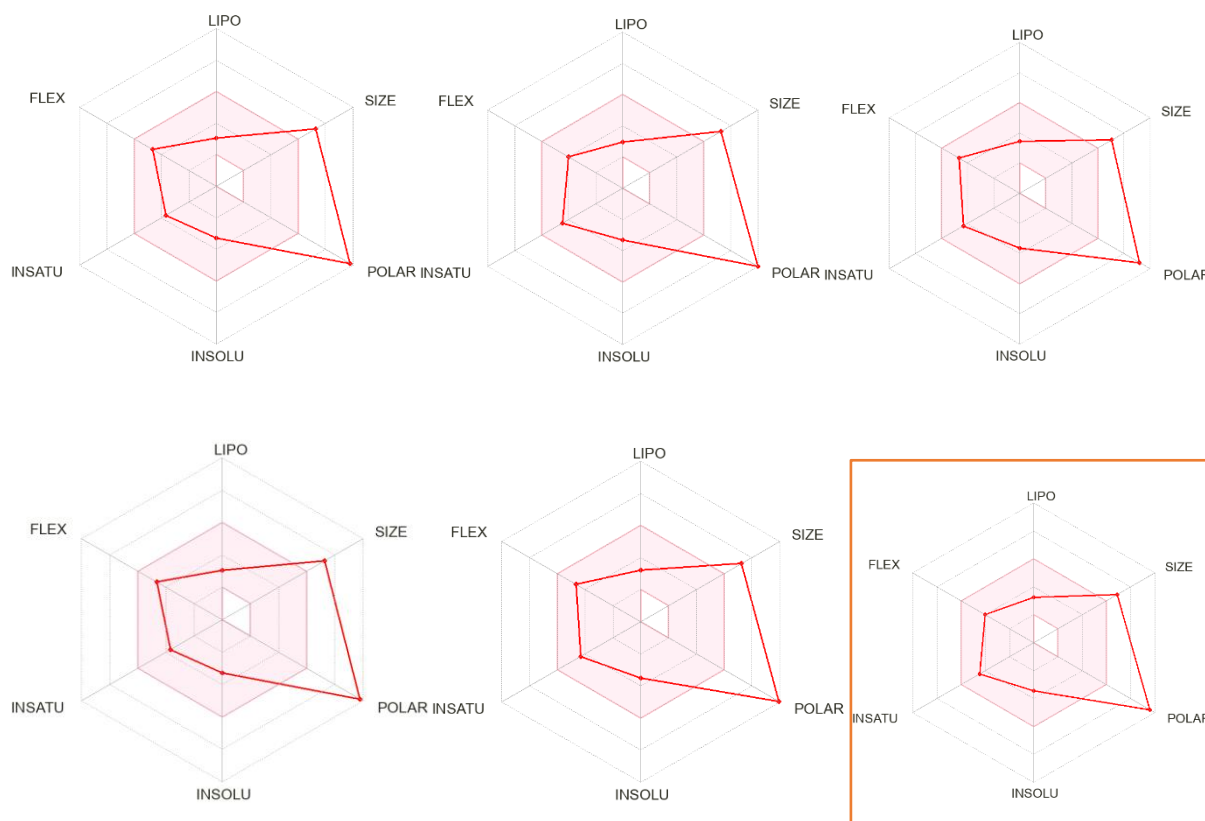


Figure 8 les propriétés ADME des 6 principaux ligands (**HESPIRIDIN, CLEMATIN, LINARIN, DIOSMIN, QUERCETIN ET L'APIGENIN**).

Tableau 3: propriétés pharmacocinétiques des médicaments en voie de réadaptation

Composés	ΔG	XLOGP3 $0.7 \leq XLOG P3 \leq 0.5$	LOGS (ESOL)	CSP3 $0.25 \leq CSP3 \leq 1$	LIPINSKI	VEBER	
						TPSA	NROTB
HESPIRIDIN	-8.4	-0,14	-3.28	0.54	No :3 violations	234.29	7
CLIMATIN	-8.8	-0.14	-3.28	0.54	No :3 violations	234.29	7
LINARIN	-8.3	0.50	-3.65	0.46	No :3 violations	217.97	7
DIOSMAIN	-8.5	0.14	-3.51	0.46	No : 3 violations	238.20	7

Résultats et discussions

QUERCETIN 3-O-ROBINOBIOSIDE	-7.5	-0.33	-3.30	0.44	No : 3 violations	269.43	6
APIGENIN 7-RUTINOSIDE	-8.6	0.17	-3.43	0.44	No :3 violations	228.97	7

MW : masse moléculaire

Csp3 : fraction Csp3

TPSA : topological polar surface Area

Lors de cette étude de Lipinski les six composés ne satisfont pas leurs propriétés en suivant cette règle des cinq critères d'après ce tableau qui contiennent un poids moléculaire (MW) supérieur à 500g/mol. Lipinski n'a pas établi un ensemble des règles destinées à estimer la biodisponibilité par voie orale d'un composé par le biais de sa structure bidimensionnelle (2D).

il suggère que l'absorption sera probablement meilleure si la molécule valide au moins trois de ses conditions ($MW < 500$, $NHs + OHs < 5$, $HBA < 10$, $HBD < 5$, $Un \log P \leq 5,5$)(Lipinski et al., 1997).

En revanche les critères supplémentaires de Veber ont été utilisés pour améliorer les prédictions de la productivité du médicament, nous avons aperçu que tous les composés ont un indice de rotation inférieur à 10 et de ce fait une très bonne biodisponibilité orale du médicament pour l'inhibition de la protéine Vac A. par contre sa surface polaire (PSA) supérieure à 140\AA^2 , de ce fait possèdent une mauvaise corrélation de l'absorption intestinale.

Cependant, dans notre travail on a constaté que la molécule CLIMATIN a présenté des résultats intéressants avec une énergie de liaison de **-8.8kcal/mol** et des caractères

pharmacocinétiques acceptable ; elle se présente donc comme un bon candidat en tant que médicament potentiel pour l'inhibition de la protéine VAC A.

Conclusion :

Conclusion

H. pylori présente une antibiorésistance vis-à-vis des antibiotiques utilisés pour traiter son infection. la présente étude consiste à proposer et développer *in silico* les meilleurs inhibiteurs potentiels qui agissent sur la protéine cible 2QV3 contre la gastrite chronique causée par *H. pylori*. Pour réaliser cette étude nous avons utilisé le Docking moléculaire.

Parmi les 25 flavonoïdes étudiés par Docking moléculaire avec la protéine Vac A, six composés présentaient des capacités de liaison substantielles avec ΔG allant de -8,8 à -7,5 Kcal/mol. Aucun de ces composés n'a satisfait à la règle de LIPINSKI de 5, et par rapport aux critères supplémentaires de VEBER tous les composés ont un indice de rotation inférieur à 10. À cet égard, la molécule CLIMATIN a présenté des résultats encourageants, comme une énergie de liaison de -8,8 kcal/mol. Elle a également formé des liaisons hydrogènes, hydrogène-carbone et donneur-donneur défavorables avec les acides aminés ASN48, ASN506, THR505, ASN463, PHE483, SER504 et TYR519. D'après les données de la règle de VEBER, ces résultats impliquent que le produit chimique pourrait être utilisé pour traiter le cancer gastrique.

Références

Références

- Bank, R. P. D. (s. d.). *RCSB PDB: Homepage*. Consulté 24 juin 2022, à l'adresse <https://www.rcsb.org/>
- Behar, D., Boublenza, L., Chabni, N., Hassaine, H., Dahmani, B., Masdoua, N., Nahet, A., & Meguenni, K. (2021). Retrospective epidemiological study on stomach cancer in a region of western Algeria : About 394 cases between 2011 and 2015. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 52(2), 706- 710. <https://doi.org/10.1007/s12029-020-00459-z>
- Chandra Babu, T. M., Rajesh, S. S., Bhaskar, B. V., Devi, S., Rammohan, A., Sivaraman, T., & Rajendra, W. (2017). Molecular docking, molecular dynamics simulation, biological evaluation and 2D QSAR analysis of flavonoids from *Syzygium alternifolium* as potent anti-*Helicobacter pylori* agents. *RSC Advances*, 7(30), 18277- 18292. <https://doi.org/10.1039/C6RA27872H>
- Chiranjeevi, P., & Swargam, S. (2016a). Inhibitor Design for VacA Toxin of *Helicobacter pylori*. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 9(9). <https://doi.org/10.4172/jpb.1000409>
- Cole, D. K., Bulek, A. M., Dolton, G., Schauenberg, A. J., Szomolay, B., Rittase, W., Trimby, A., Jothikumar, P., Fuller, A., Skowera, A., Rossjohn, J., Zhu, C., Miles, J. J., Peakman, M., Wooldridge, L., Rizkallah, P. J., & Sewell, A. K. (2016). Hotspot autoimmune T cell receptor binding underlies pathogen and insulin peptide cross-reactivity. *Journal of Clinical Investigation*, 126(6), 2191- 2204. <https://doi.org/10.1172/JCI85679>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014). iLOGP : A Simple, Robust, and Efficient Description of *n* -Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(12), 3284- 3301. <https://doi.org/10.1021/ci500467k>

Références

- Delchier, J.-C. (2008). Manifestations digestives de l'infection à *Helicobacter pylori* chez l'adulte : De la gastrite au cancer gastrique. *La Presse Médicale*, 37(3), 519-524.
<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2007.07.031>
- Domańska, G., Motz, C., Meinecke, M., Harsman, A., Papatheodorou, P., Reljic, B., Dian-Lothrop, E. A., Galmiche, A., Kepp, O., Becker, L., Günnewig, K., Wagner, R., & Rassow, J. (2010). *Helicobacter pylori* VacA Toxin/Subunit p34 : Targeting of an Anion Channel to the Inner Mitochondrial Membrane. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000878.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000878>
- Floch, P., Mégraud, F., & Lehours, P. (2017). *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins*, 9(4), 132. <https://doi.org/10.3390/toxins9040132>
- Fuccio, L. (2010). Gastric cancer, *helicobacter pylori* infection and other risk factors. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2(9), 342.
<https://doi.org/10.4251/wjgo.v2.i9.342>
- Gangwer, K. A., Mushrush, D. J., Stauff, D. L., Spiller, B., McClain, M. S., Cover, T. L., & Lacy, D. B. (2007). Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41), 16293-16298.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0707447104>
- Ghotaslou, R. (2015). Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* : A recent literature review. *World Journal of Methodology*, 5(3), 164.
<https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i3.164>
- González, A., Casado, J., & Lanas, Á. (2021). Fighting the Antibiotic Crisis : Flavonoids as Promising Antibacterial Drugs Against *Helicobacter pylori* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 709749.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.709749>

Références

- HELICOBACTER. (s. d.). Consulté 24 juin 2022, à l'adresse http://www.microbes-edu.org/professionel/diag/helicob.html?fbclid=IwAR1VRVGEfae0YfLusXsCiLqWzlytJ_gwesngRQCNT_bq6sOE9wuT1P2STvE
- Hostetler, G. L., Ralston, R. A., & Schwartz, S. J. (2017). Flavones : Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8(3), 423- 435. <https://doi.org/10.3945/an.116.012948>
- Ilver, D., Barone, S., Mercati, D., Lupetti, P., & Telford, J. L. (2004). *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cellular Microbiology*, 6(2), 167- 174. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00349.x>
- Jouimyi, M. R., Bounder, G., Essaidi, I., Boura, H., Zerouali, K., Lebrazi, H., Kettani, A., & Maachi, F. (2020). Molecular docking of a set of flavonoid compounds with *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA. *Journal of Herbed Pharmacology*, 9(4), 412- 419. <https://doi.org/10.34172/jhp.2020.52>
- Kang, J. H., & Lee, M. S. (2005). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by *Enterococcus faecium* GM-1. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(8), 629- 636. <https://doi.org/10.1139/w05-044>
- Kern, B., Jain, U., Utsch, C., Otto, A., Busch, B., Jiménez-Soto, L., Becher, D., & Haas, R. (2015). Characterization of *Helicobacter pylori* VacA-containing vacuoles (VCVs), VacA intracellular trafficking and interference with calcium signalling in T lymphocytes : VacA-containing vacuoles and Ca²⁺ signalling. *Cellular Microbiology*, 17(12), 1811- 1832. <https://doi.org/10.1111/cmi.12474>
- Khulusi, S., Ahmed, H. A., Patel, P., Mendall, M. A., & Northfield, T. C. (1995). The effects of unsaturated fatty acids on *Helicobacter pylori* in vitro. *Journal of Medical Microbiology*, 42(4), 276- 282. <https://doi.org/10.1099/00222615-42-4-276>

Références

- Lee, M., Yang, J., Cho, Y., Woo, H., Kwon, H., Kim, D., Park, M., Moon, C., Yeon, M., Kim, H., Seo, W.-D., Kim, S.-H., & Kim, J.-B. (2019). Inhibitory Effects of Menadione on Helicobacter pylori Growth and Helicobacter pylori-Induced Inflammation via NF- κ B Inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1169. <https://doi.org/10.3390/ijms20051169>
- 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. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1-3), 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Ly, A. (2010). Infections à Helicobacter pylori et oncogénèse. *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer*, 2(4), 213-218. <https://doi.org/10.1007/s12558-010-0123-z>
- Mamoudou, K., & Meriem, M. (s. d.). *Caractérisation et sensibilité aux antibiotiques des souches Helicobacter pylori impliquées dans les pathologies gastroduodénales*. 72.
- Marshall, B., & Warren, J. R. (1984). UNIDENTIFIED CURVED BACILLI IN THE STOMACH OF PATIENTS WITH GASTRITIS AND PEPTIC ULCERATION. *The Lancet*, 323(8390), 1311-1315. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)91816-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)91816-6)
- Oh, D.-R., Kim, J. R., & Kim, Y. R. (2010). Genistein inhibits Vibrio vulnificus adhesion and cytotoxicity to HeLa cells. *Archives of Pharmacal Research*, 33(5), 787-792. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0520-y>
- Palframan, S. L., Kwok, T., & Gabriel, K. (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for Helicobacter pylori pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00092>
- Pham, T. H. (s. d.). *Etude du potentiel des molécules phytochimiques comme adjuvants thérapeutiques dans le cancer du sein*. 211.

Références

- PubChem. (s. d.). *PubChem*. Consulté 24 juin 2022, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Radin, J. N., González-Rivera, C., Frick-Cheng, A. E., Sheng, J., Gaddy, J. A., Rubin, D. H., Algood, H. M. S., McClain, M. S., & Cover, T. L. (2014). Role of Connexin 43 in *Helicobacter pylori* VacA-Induced Cell Death. *Infection and Immunity*, *82*(1), 423- 432. <https://doi.org/10.1128/IAI.00827-13>
- Razafimahefa, S. H., Rabenjanahary, T. H., Rakotoarivelo, R. A., Rakotozafindrabe, R. A. L., Zerbib, F., Ramanampamonjy, R. M., & Rajaona, R. H. (s. d.-a). *Infection à Helicobacter pylori : Revue de la littérature et réalités à Madagascar*. 7.
- Rekia_GUERAR_Aicha_ZAOUI.pdf*. (s. d.). Consulté 23 juin 2022, à l'adresse http://archives.univ-biskra.dz/bitstream/123456789/16557/1/Rekia_GUERAR_Aicha_ZAOUI.pdf
- Sivam, G. P., Lampe, J. W., Ulness, B., Swanzy, S. R., & Potter, J. D. (1997). *Helicobacter pylori*—*In vitro* susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. *Nutrition and Cancer*, *27*(2), 118- 121. <https://doi.org/10.1080/01635589709514512>
- Tombola, F., Campello, S., De Luca, L., Ruggiero, P., Del Giudice, G., Papini, E., & Zoratti, M. (2003). Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters*, *543*(1- 3), 184- 189. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00443-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00443-5)
- Tombola, F., Oregna, F., Brutsche, S., Szabò, I., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., & Zoratti, M. (1999). Inhibition of the vacuolating and anion channel activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters*, *460*(2), 221- 225. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01348-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01348-4)

Références

- Vennelakanti, V., Qi, H. W., Mehmood, R., & Kulik, H. J. (2021). When are two hydrogen bonds better than one? Accurate first-principles models explain the balance of hydrogen bond donors and acceptors found in proteins. *Chemical Science*, 12(3), 1147- 1162. <https://doi.org/10.1039/D0SC05084A>
- Yamaoka, Y. (2010). Mechanisms of disease : Helicobacter pylori virulence factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(11), 629-641.