

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 – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



MÉMOIRE

Présenté par

TOTO Komlan Dieu-Donné

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences Biologiques

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

**Inhibiteurs de la fixation de la protéine de CagA à l'intégrine
 $\alpha 5\beta 1$. Cas du lymphome gastrique**

Soutenu le 24/05/2022, devant le jury composé de :

Présidente	Mme DENNOUNI-MEDJATI Nouria	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	Mr. CHERRAK Ahmed Sabri	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme GUERMOUCHE Baya	Professeur	Université de Tlemcen

Titre et résumé en arabe

حالة سرطان الغدد الليمفاوية في المعدة $\alpha 5\beta 1$ المرتبط بإنتجرين CagA مثبطات بروتين

ملخص

أحد العوامل الرئيسية وراء ظهور سرطان الغدد الليمفاوية في المعدة. عن *Helicobacter pylori* لـ CagA يعد البروتين الورمي طريق إصابة الخلايا الليمفاوية ، تحقق هيليكوباكتر بيلوري هذا البروتين من خلال نظام الإفراز من النوع 4. وهكذا ، بمجرد دخول هذه هو CagA الخلايا ، يعطل البروتين مسارات الإشارات ويمنع التعبير عن الجينات الكابتة للورم. بسبب هذه الخصائص المسرطنة ، فإن هدف ذو صلة في مكافحة سرطان الغدد الليمفاوية في المعدة. هدفت دراستنا إلى منع انتقال البروتين في الخلايا باستخدام نظائرها الهيكلية وهما جزيءان معروفان بخصائصهما المضادة للجراثيم والمضادة للسرطان. للقيام بذلك ، تم الحصول ، A من الكركمين وليكوكالكون من قاعدة بيانات بنك بيانات البروتين. ثم أجريت CagA وتم تنزيل الهيكل الثلاثي المتبلور لـ Zinc15 على النظائر من قاعدة بيانات على التوالي. نتيجة لذلك ، أظهر GROMACS 5.1.5 و UCSF Chimera دراسات الإرساء والديناميات الجزيئية باستخدام برنامج وأعطى التناظرية Licochalcone A بين نظائر kcal / mol أفضل طاقة ربط مقدرة بـ -8.2 Zinc45299095 المركب الكركمين. علاوة على ذلك Licochalcone A كأفضل طاقة ربط فيما يتعلق بتلك الموجودة في -8.0 Kcal / mol ZINC5543044 المركب ، ثباتاً جيداً على مستوى النظام أثناء الديناميكيات الجزيئية. لذلك ، يمكن أن يكون بديلاً علاجياً في Zinc45299095 أظهر المركب ، مكافحة سرطان الغدد الليمفاوية في المعدة.

Mots clés : النظير Licochalcone A ، نظائر الكركمين ، CagA ، العلامات: سرطان الغدد الليمفاوية المعدية :

Titre et résumé en français

Titre : Inhibiteurs de la fixation de la protéine de CagA à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Cas du lymphome gastrique

Résumé :

L'oncoprotéine CagA de *Helicobacter pylori* est l'un des principaux facteurs à l'origine de l'émergence du lymphome gastrique. En infectant les lymphocytes, *Helicobacter pylori* injecte cette protéine par le biais du système de sécrétion de type 4. Ainsi, une fois dans ces cellules, la protéine entraîne une perturbation des voies de signalisation et inhibe l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. En raison de ces propriétés oncogéniques, CagA est une cible pertinente dans la lutte contre le lymphome gastrique. Notre étude s'est fixée pour objectif d'inhiber la translocation de la protéine dans les cellules en utilisant des analogues structuraux de la curcumine et de la licochalcone A, deux molécules étant connues pour leurs propriétés bactériostatiques et anticancéreuses. Pour ce faire, les analogues ont été obtenus depuis la base de données Zinc15 et la structure tertiaire cristallisée de CagA a été téléchargée depuis la base de données Protein Data Bank. Ensuite des études de Docking et de dynamique moléculaire ont été réalisées en utilisant respectivement le logiciel UCSF Chimera et GROMACS 5.1.5. Comme résultat, le composé Zinc45299095 a montré la meilleure énergie de liaison estimée à -8.2 kcal/mol parmi les analogues de licochalcone A et l'analogue ZINC5543044 a donné -8.0 Kcal/mol comme meilleure énergie de liaison en ce qui concerne ceux de la curcumine. Par ailleurs, le composé Zinc45299095 a montré une bonne stabilité au niveau du système durant la dynamique moléculaire. Par conséquent, il peut être une alternative thérapeutique dans la lutte contre le lymphome gastrique.

Mots clés : Lymphome gastrique, CagA, analogues curcumine, analogues licochalcone A

Titre et résumé en anglais

Title: Inhibitors of CagA protein binding to integrin $\alpha 5\beta 1$. Case of gastric lymphoma

Abstract:

The CagA oncoprotein of *Helicobacter pylori* is one of the main factors behind the emergence of gastric lymphoma. By infecting lymphocytes, *Helicobacter pylori* injects this protein through the type 4 secretion system. Thus, once in these cells, the protein disrupts signaling pathways and inhibits the expression of tumor suppressor genes. Due to these oncogenic properties, CagA is a relevant target in the fight against gastric lymphoma. Our study aimed to inhibit the translocation of the protein into cells using structural analogs of curcumin and licochalcone A, two molecules known for their bacteriostatic and anticancer properties. To do this, the analogs were obtained from the Zinc15 database and the crystallized tertiary structure of CagA was downloaded from the Protein Data Bank database. Then Docking and molecular dynamics studies were carried out using the UCSF Chimera and GROMACS 5.1.5 software respectively. As a result, the compound Zinc45299095 showed the best binding energy estimated at -8.2 kcal/mol among the licochalcone A analogs and the analog ZINC5543044 gave -8.0 Kcal/mol as the best binding energy with respect to those of curcumin. Furthermore, the compound Zinc45299095 showed good stability at the system level during molecular dynamics. Therefore, it can be a therapeutic alternative in the fight against gastric lymphoma.

Keywords: Gastric lymphoma, CagA, curcumin analogs, licochalcone A analogs.

Introduction

Le lymphome gastrique est un lymphome extranodal non hodgkinien se manifestant par une prolifération des cellules du système lymphatique entraînant un néoplasie lymphoïde au niveau de la muqueuse gastrique (Herlevic and Morris, 2022). Les cellules les plus souvent impliquées peuvent être les cellules B de la zone marginale de type MALT, les grandes cellules B, et les cellules T (Herlevic and Morris, 2022). La plupart des facteurs étiologiques du lymphome gastrique sont d'origine bactérienne ou virale parmi lesquels le virus de l'hépatite B, du VIH, le virus T lymphotrope humain de type 1, le virus d'Epstein-Bar mais surtout l'infection par *Helicobacter pylori*. (Juárez-Salcedo et al., 2018).

H. pylori est une bactérie gram négatif micro-aérophile (Venerito et al., 2018). On estime de 60 à 70% le taux mondial de cancer gastrique dans lequel est impliqué *H. pylori* (Fock, 2014). Près de 50% de la population mondiale présente une muqueuse gastrique colonisée par *H. pylori* (Peek and Blaser, 2002). En infectant la muqueuse gastrique, *H. pylori* produit des protéines adhérentes à l'instar de BabA (Ilver et al., 1998), OipA (Yamaoka et al., 2000), Alpha/B (Odenbreit et al., 1999), Hopz (Peck et al., 1999) qui lui permettent de se fixer aux cellules des glandes gastriques surtout celles de l'antrum (Wizenty et al., 2020). Parmi les différentes souches de *H. pylori* existantes les plus virulentes sont celles qui possèdent dans leur génome l'îlot de pathogénicité (Cag.PAI). Cet îlot de pathogénicité code pour des cytotoxines comme l'oncoprotéine CagA et le système de sécrétion de type IV qui est une sorte de seringue moléculaire permettant la translocation de CagA dans la cellule (Ohnishi et al., 2008). Suite à sa fixation à la muqueuse gastrique, *H. pylori* utilise le T4SS composé de protéines telles que Cag L et Cag Y formant un complexe protéique qui vont manager le transport de la protéine CagA jusqu'à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Jiménez-Soto et al., 2009). En ce sens, Le feuillet SLB (a.a 303-456) contenu dans la moitié proximale du domaine II de la structure de CagA est le site d'interaction spécifique de CagA avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ utilisé comme récepteur pour sa translocation dans la partie cytosolique de la membrane plasmique de la cellule (Kaplan-Türköz et Terradot, 2013). Après translocation, l'oncoprotéine CagA interagit avec une pléiade de molécules impliquées dans des voies de signalisation (Oliveira et al., 2009). CagA interfère avec les adhérences cellulaires en formant un complexe avec la E-cadhérine entraînant une perturbation du cytosquelette cellulaire (Murata-Kamiya et al., 2007). De ces interactions résulte une dérégulation des voies de signalisation de la cellule cible avec pour conséquences, entre autres, la perte d'adhésion et une transition épithélio-mésenchymateuse conférant à ces cellules une grande capacité migratoire (Katoh, 2007) ; ((Hatakeyama, 2008). Dans les cellules polarisées l'oncoprotéine CagA induit une inhibition de PAR1b, une kinase essentielle dans la polarisation cellulaire engendrant une perte de polarité (Saadat et al., 2007).

Ces diverses interactions induisent des réponses immunitaires se traduisant par la mobilisation des lymphocytes depuis les ganglions lymphatiques vers le site de l'infection. Parce que l'oncoprotéine Cag A est alors présente dans l'épithélium gastrique, elle peut alors interagir directement et se transloquer dans le lymphocyte B (Umehara et al., 2003) ; (Lin et al., 2010). Une fois dans le lymphocyte B, CagA présente son motif EPIYA qui est phosphorylé par les kinases Src et Abl. (Odenbreit et al., 2001). Une telle phosphorylation entraîne de diverses interactions avec les protéines possédant le domaine SH2 parmi lesquelles la protéine SHP2. Cette interaction lui permet d'activer les protéines ERK et P38 ayant pour conséquence une activation de l'activité transcriptionnelle des gènes Bcl-2 et Bcl-XL dont les produits présentent des effets anti-apoptotiques. En outre, dans les lymphocytes B, CagA a la capacité d'induire une baisse de l'expression du gène P53 et un contrôle négatif de la prolifération monoclonale des lymphocytes B à travers la suppression de la voie JAK-STAT. Donc pas de réponse humorale spécifique contre *H. pylori* (Lin et al., 2010) ; (Lee et al., 2010). Par conséquent, la cellule B devient résistante à l'apoptose et sujette à plusieurs mutations génétiques induisant un processus prolifératif dont l'aboutissement final engendre le lymphome gastrique.

Pour toutes ces raisons susmentionnées et en raison du taux de résistance de *H.pylori* aux divers traitements actuels (Alba et al., 2017), il s'avère intéressant de trouver de nouveaux inhibiteurs de l'activité de la bactérie afin de mieux prendre en charge les lymphomes gastriques dont *H. pylori* en est l'agent étiologique. Ainsi, les molécules d'adhérences, les diverses toxines, le système de sécrétion de type IV et la protéine CagA dont est dotée *H. pylori* et ses multiples interactions peuvent être, de façon non exhaustive, des cibles potentiels. Et ce, afin d'empêcher soit l'établissement et la survie de la bactérie dans la muqueuse gastrique soit la translocation et les diverses interactions intracytoplasmiques de CagA en particulier avec la protéine SHP2, nécessaire dans l'avènement du lymphome gastrique.

Nous avons fait le choix, dans notre étude, de cibler directement CagA en raison de toutes ses propriétés oncogéniques. Pour ce faire, parce que beaucoup plus de travaux, allant dans ce sens, sont abordés dans le repositionnement d'antibiotiques pré-existants, nous avons opté pour des analogues de molécules issues de systèmes particuliers en l'occurrence des plantes. Il s'agit notamment d'analogues structurales de la curcumine et de licochalcone A qui ont, tous deux, montré des effets inhibiteurs *in silico* suite à leurs interactions avec CagA dans des études précédentes (Srivastava et al., 2015), (Jouimyi et al., 2020). L'objectif est de déterminer si les analogues de ces deux molécules pouvaient montrer des propriétés pharmacologiques supérieures et susceptibles d'empêcher la translocation de CagA dans les lymphocytes en utilisant le docking et la dynamique moléculaire qui sont devenus de nos jours des outils incontournables dans la recherche pharmaceutique.

Matériels et méthodes

Préparation de la protéine et téléchargement des ligands

En amont, du docking proprement dit, la structure tertiaire cristallisée de CagA avec pour PDB ID 4DVZ a été téléchargée à partir de Protein Data Bank (Hayashi et al., 2012). Elle a présenté une résolution de 3,19 Å et ne possédait aucune mutation. Cependant, elle comportait des parties indéterminées en résidus. Et donc, pour un résultat optimal, nous avons résolu puis enregistré sous format PDB sa structure en utilisant l'outil en ligne MODELLER qui permet de modéliser les parties non résolues.

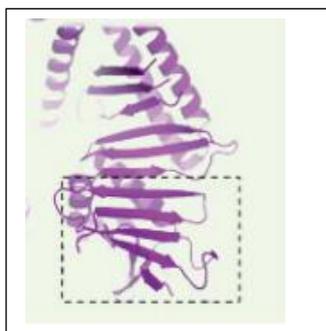


Figure 1 : Structure de la protéine CagA avec le fragment SLB mis en exergue. (Kaplan-Türköz and Terradot, 2013)

En ce qui concerne les composés analogues (similarité 40%), ceux partageant le même squelette carboné avec la curcumine (21 molécules) et ceux partageant celui de la molécule de licochalcone A (18 molécules) ont été obtenus à partir de Zinc15 et téléchargés sous format .sdf (<https://zinc15.docking.org>)

Exécution du docking

Le docking a été réalisé avec la structure résolue de la protéine CagA en utilisant le logiciel Chimera 1.15, reconnu efficace. Et le fragment SLB contenant les résidus 303 à 456 a été ciblé comme

site actif grâce à l'outil DockPrep de Chimera. Le docking a été réalisé composé par composé couplé à CagA tout en prenant soin d'y ajouter des atomes d'hydrogène au préalable.

Après exécution du docking, les meilleurs composés dont les énergies de liaison sont les plus faibles ont été sélectionnés. Ceux-ci ont été un à un ensuite passé sur BIOVIA Discovery studio 2017 version 17.2 afin d'étudier la nature des différentes interactions avec la protéine. Ces diverses interactions ont été enregistrées pour chaque composé sous forme de diagramme 2D.

Détermination des paramètres pharmacocinétiques

Aussi, les propriétés pharmacocinétiques (ADMET) pour les composés ayant présenté les plus faibles énergies de liaison, après docking, ont été vérifiées grâce à l'outil en ligne swissADME (<http://swissadme.ch/index.php>)

Simulation de la dynamique moléculaire

L'analogue de la molécule de licochalcone A ayant présenté la plus faible énergie de liaison à la suite du docking a été choisi en vue de réalisation de la dynamique moléculaire. Dans un premier temps, la topologie en format mol2 du composé est générée par le biais du serveur swissparam. (<https://www.swissparam.ch>). Quant à la topologie de la protéine, elle a été obtenue grâce à l'outil pdb2gmx du logiciel **GROMACS version 5.1.5** (Abraham et al., 2015) ; (Kutzner et al., 2019) utilisé pour réaliser la simulation de la dynamique moléculaire. 11 molécules de chlore ont été utilisés pour neutraliser le système et le modèle d'eau TIP3 sollicité pour la solvation dans un box dodécaédrique. Nous avons fait appel au champ de force CHARMM36 (Abraham et al., 2015) ; (Kutzner et al., 2019) et le système présentait un écart minimum de 1 angstrom représentant la marge entre les atomes et les bords. De même, l'outil steepest descent algorithm (Benson and Daggett, 2012) a permis de minimiser l'énergie du système. Une dynamique moléculaire de 20 ns a été lancée tout en maintenant la température du système à 300K et à 1 bar dans le but de le stabiliser. Elle a été réalisée pour le complexe CagA- Zinc45299095 et pour la protéine seule.

Enfin, une analyse de la trajectoire et de l'énergie de l'interaction protéine-ligand a été menée grâce aux outils gmx rms et gmx rmsf de GROMACS qui ont rendu possible l'appréciation du RMSD et du RMSF permettant d'évaluer avec précision la stabilité et les variations de notre complexe. En ce qui concerne l'étude des liaisons hydrogènes, nous avons disposé de l'outil gmx hbond et gmx gyrate pour l'évaluation des rayons de gyrations. Le logiciel Grace a permis la visualisation des graphes.

Résultats et discussion

Docking moléculaire

La structure de la protéine de CagA a été téléchargée depuis la base de données Protein Data Bank sous l'ID 4DVZ. Les diverses molécules analogues de la curcumin et de la licochalcone A ont, quant à elles, été téléchargées à partir du serveur Zinc15 (<https://zinc15.docking.org>). Le docking a été réalisé au moyen du module Vina intégré à Chiméra. Le feuillet SLB a été ciblé.

Les résultats des meilleures positions configurationnelles obtenues de tous les composés soumis au docking sont présentés dans **les tableau 1 et 2**.

Tableau 1 : résultats des analogues Curcumine dockés avec la protéine CagA avec le logiciel Chiméra

Composé	Formule brute moléculaire	Masse moléculaire (g/mol)	ΔG (-kcal /mol)
Zinc100067274(curcumin)	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-8,3
Zinc100007120	$C_{23}H_{24}O_6$	396.439	-7,5
Zinc104896565	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-6,8
Zinc100022630	$C_{23}H_{24}O_6$	396.439	-7,2
Zinc471270188	$C_{21}H_{22}O_6$	370.401	-7,9
Zinc899824 (Turméric)	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-7,7
Zinc17255287	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-6,7
Zinc31261437	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-7,3
Zinc5543044	$C_{20}H_{18}O_6$	354.358	-8,0
Zinc5115722	$C_{20}H_{18}O_6$	338.359	-7,3
Zinc5999071	$C_{20}H_{20}O_6$	356.374	-7,5
Zinc31430198	$C_{20}H_{18}O_5$	338.359	-6,3
Zinc31430201	$C_{20}H_{18}O_5$	338.359	-7,3
Zinc31430204	$C_{20}H_{18}O_5$	338.359	-7,5
Zinc85473528	$C_{20}H_{20}O_6$	356.374	-7,0
Zinc13412576	$C_{21}H_{22}O_6$	370.401	-7,6
Zinc13415009	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-4,8
Zinc13415038	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-5,1
Zinc224125052	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-6,9
Zinc224125108	$C_{21}H_{20}O_6$	368.385	-7,3
Zinc13781298	$C_{23}H_{24}O_6$	396.439	-7,5

Tableau 2 : Résultats analogues de Licochalcone A dockés avec la protéine CagA avec le logiciel Chiméra

Composé	Formule moléculaire	Masse moléculaire	ΔG (-kcal /mol)
Zinc3873122 (Licochalcone A)	$C_{21}H_{22}O_4$	338.403	-6,8
Zinc3873123	$C_{21}H_{22}O_4$	338.403	-8,1
Zinc45245681	$C_{22}H_{24}O_4$	352.43	-7,6
Zinc45299095	$C_{22}H_{24}O_4$	352.43	-8,2
Zinc1772653245	$C_{21}H_{22}O_5$	354.402	-7,7
Zinc28975193	$C_{21}H_{21}ClO_3$	356.849	-8,1
Zinc66259029	$C_{21}H_{22}O_5$	354.402	-7,9
Zinc31167012	$C_{21}H_{22}O_4$	338.403	-7,3
Zinc31167205	$C_{21}H_{22}O_5$	354.402	-7,7
Zinc139975666	$C_{21}H_{22}O_3$	322.404	-8,1
Zinc213812410	$C_{21}H_{22}O_3$	322.404	-6,4
Zinc216106044	$C_{21}H_{22}O_5$	354.402	-6,5
Zinc45302883	$C_{23}H_{26}O_4$	366.457	-7,6
Zinc102240971	$C_{19}H_{18}O_4$	310.349	-7,3
Zinc27552965	$C_{19}H_{20}O_4$	312.365	-7,5
Zinc38342864	$C_{21}H_{22}O_4$	338.403	-7,5
Zinc38342865	$C_{21}H_{22}O_4$	338.403	-8,1
Zinc95912838	$C_{21}H_{22}O_4$	338.403	-6,9

Les molécules ayant présenté les plus faibles énergies de liaisons ont été soumises au logiciel BIOVIA Discovery afin d'élucider la nature des diverses interactions entre les ligands et la protéine. Un aperçu de ces liaisons est donné dans le **tableau 3 et 4**.

Tableau 3 : Interactions entre les analogues de Licochalcone A présentant les meilleures ΔG et CagA

Analogues de licochalcone A avec les meilleures energies de liaison	Acides aminés de CagA engagés dans les interactions avec le composé	Types d'interaction
Zinc3873122 (Licochalcone A) -6,8	Asn375	Conventional hydrogen bond
	Lys382	2 liaisons alkyl
Zinc3873123 -8,1	Glu397	Conventional hydrogen bond
	Lys401	Pi-cation
	Glu429	Pi-anion
	Lys382	Carbon hydrogen bond et pi-alkyl
	Glu383	Conventional hydrogen bond
	Asp432	Pi-anion
	Lys435	alkyl
Zinc45299095 -8,2	Asp432	Carbon hydrogen bond, pi-anion
	Ala439	Alkyl
	Phe378	Pi-alkyl
Zinc28975193 -8,1	Ala439	alkyl
	Phe378	alkyl
	Asp432	Pi-anion
	Glu397	Conventional hydrogen bond
	Lys401	Pi-cation
	Glu429	Pi-anion
	Lys 382	Pi-alkyl
Zinc139975666 -8,1	Lys435	2 liaisons alkyl
	Asp432	Pi-anion
	Glu429	Conventional hydrogen bond
	Glu383	Conventional hydrogen bond
	Lys382	Carbon hydrogen bond
Zinc38342865 -8,1	Glu397	Conventional hydrogen bond
	Lys382	Pi-alkyl
	Lys401	Pi-alkyl
	Glu429	Pi-anion
	Ala439	alkyl
	Phe378	alkyl
	Asp432	Conventional hydrogen bond

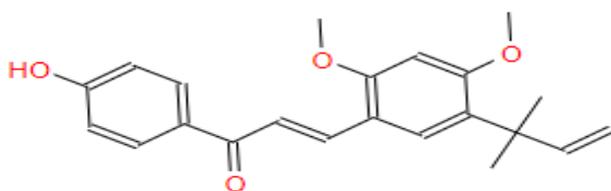
Tableau 4 : Interactions entre les analogues de curcumine présentant les meilleures ΔG et CagA

Analogues de curcumine avec les meilleures énergies de liaison	Acides aminés de CagA engagés dans les interactions avec le composé	Types d'interaction
Zinc100067274(curcumin) -8,3	Glu429	Conventional hydrogen bond, carbon hydrogen bond, pi-anion
	Lys382	Pi-alkyl
	Asp432	Conventional hydrogen bond, pi-anion
	Asp436	Conventional hydrogen bond
Zinc5543044 -8,0	Glu397	Conventional hydrogen bond
	Glu429	Pi-anion
	Lys382	Pi-alkyl
	Asp432	Conventional hydrogen bond, pi-anion
	Phe378	Conventional hydrogen bond
	Glu383	Pi-donor hydrogen bond
Zinc471270188 -7,9	Lys382	Pi-alkyl
	Glu429	Pi-anion
	Glu397	Conventional hydrogen bond
	Leu393	Pi-alkyl
	Glu383	Conventional hydrogen bond
	Asp432	Conventional hydrogen bond, pi-anion
Zinc899824 -7,7	Lys382	Pi-alkyl
	Asp432	Pi-anion
	Tyr440	Conventional hydrogen bond
	Lys401	Unfavorable donor-donor

De ces résultats, il en ressort que les molécules **Zinc45299095** et **Zinc5543044** fournissent de meilleures énergies de liaisons qui équivalent successivement à -8.2 Kcal/mol et -8,0 Kcal/mol. Le composé Zinc45299095 a établi des liaisons hydrogène, alkyl et pi alkyl respectivement avec les acides aminés Asp432, Ala439 et Phe378 tandis que le composé Zinc5543044 a réalisé des liaisons avec les acides aminés Glu397, Glu429, Lys382, Asp432, Phe378 et Glu383. Comparés aux résultats obtenus pour la licochalcone A, qui étaient de -8,0 Kcal/mol (Jouimy et al., 2020), la molécule Zinc45299095 a présenté une meilleure énergie de liaison. Le contraire est observé pour le composé Zinc5543044 qui a une énergie relativement plus faible comparée à celle obtenue pour la curcumine. (Srivastava et al., 2015)

La **figure 2** représente les structures tridimensionnelles de ces molécules et la **figure 3** est représentative des positions adoptées par ces molécules dans le site actif. Ces images ont été obtenues grâce à Chiméra.

A/



B/

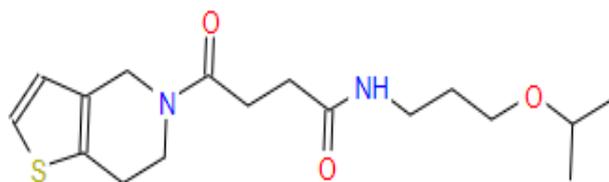
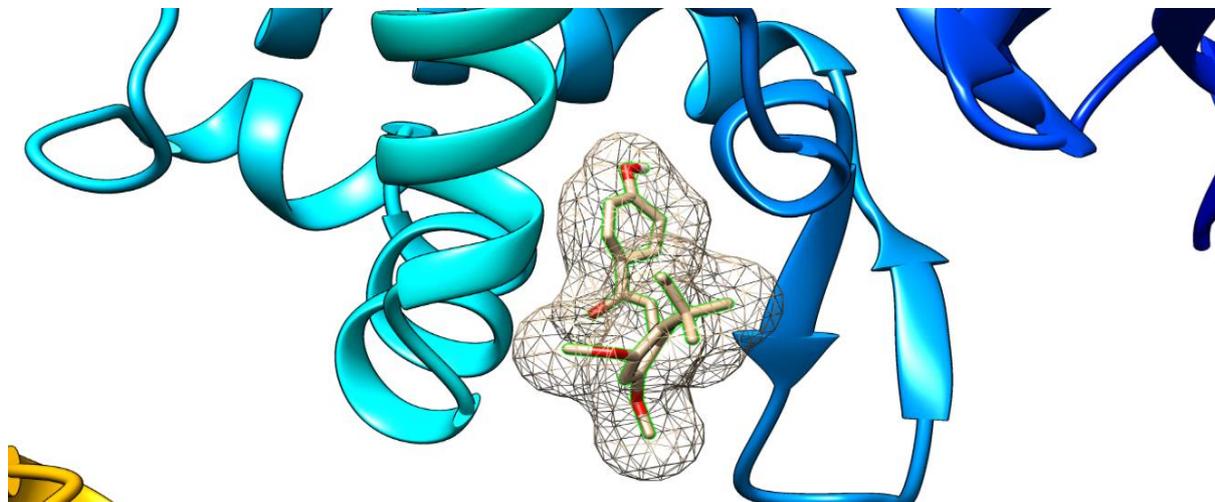
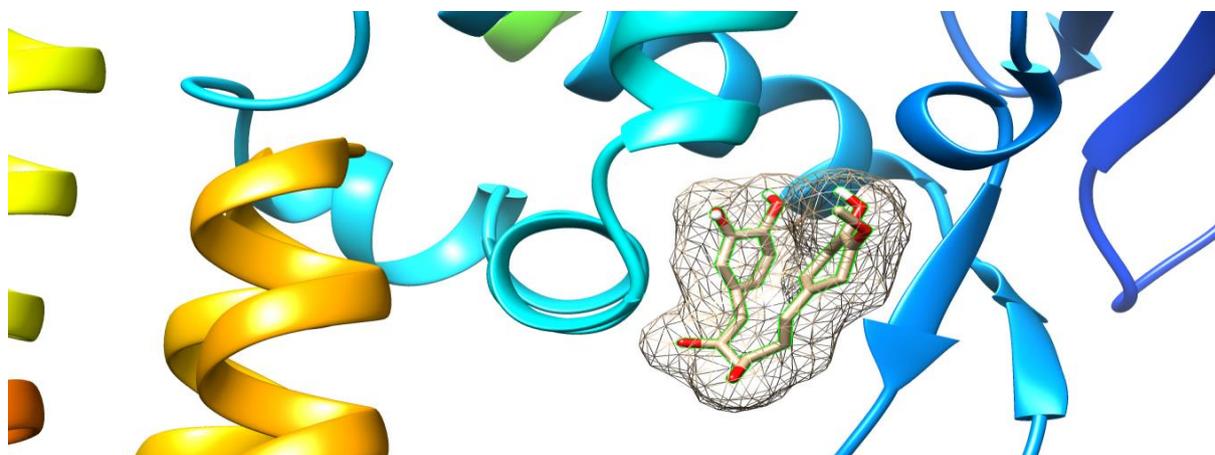


Figure 2 : A/ ZINC45299095 ; B/ ZINC55430448

A



B

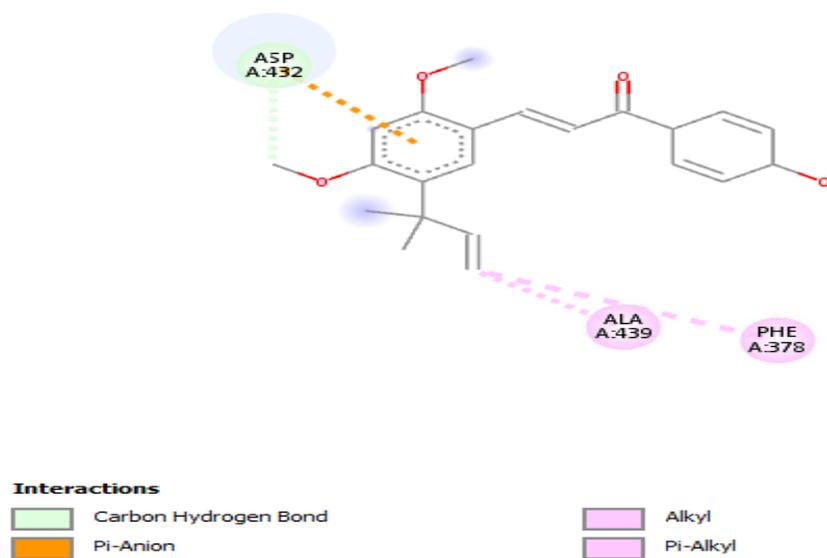


B

Figure 3: Poses des ligands Zinc45299095 (A) et Zinc5543044 (B) sur leurs sites de fixation

De même, les images des différents types d'interaction établies par ces deux molécules ont été produites grâce au logiciel Discovery comme le montre la **figure 4**

A



B

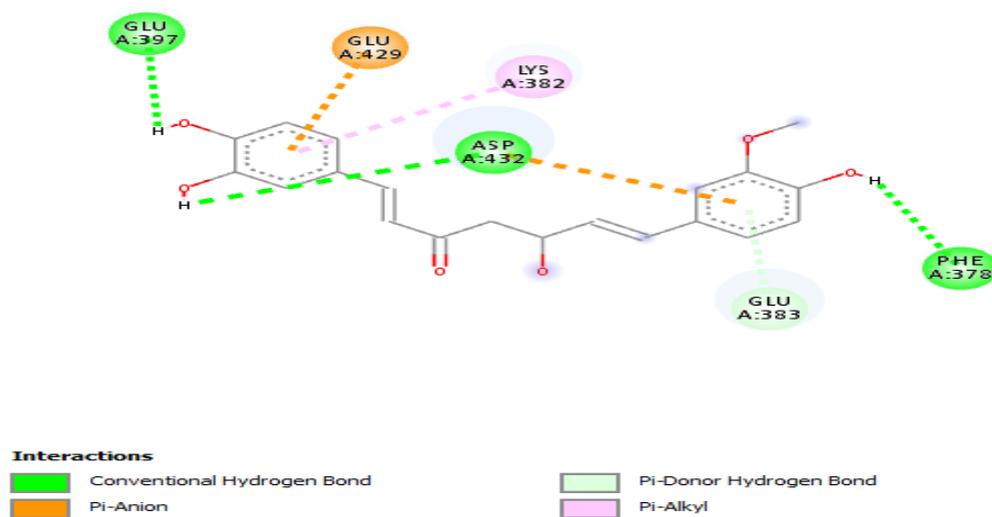


figure 4 : Diagramme 2D des interactions entre les ligands Zinc45299095 (A), Zinc5543044 (B) et la protéine CagA.

Propriétés pharmacodynamiques

En vue d'étudier d'éventuelles propriétés pharmacologiques, le site swissadme.ch a été utilisé pour évaluer les propriétés pharmacocinétiques (ADME) et vérifier la règle de Lipinski (**Tableau 5 et 6**). Et ce, pour toutes les molécules présentées dans les **tableaux 3 et 4**.

Tableau 5 : ADME des analogues de licochalcone A avec les ΔG les plus faibles

Composés	ΔG	LogP	MW	CSP3	WS	Veber	
						TPSA	NROTB
Zinc3873122 (Licochalcone A)	-6,8	4,90	338,40	0,19	-4,98	66,76	6
Zinc3873123 (Licoagrochalcone A)	-8,1	4,90	338,40	0,19	-4,98	66,76	6
Zinc45299095	-8,2	5,22	352,42	0,23	-5,19	55,76	7
Zinc28975193	-8,1	5,88	356,84	0,19	-5,72	46,53	6
Zinc139975666	-8,1	5,25	322,40	0,19	-5,12	46,53	6
Zinc38342865 (licochalcone E)	-8,1	4,97	338,40	0,19	-5,03	66,76	6

Tableau 6 : ADME des analogues de curcumine avec les ΔG les plus faibles

Composés	ΔG	LogP	MW	CSP3	WS	Veber	
						TPSA	NROTB
Zinc100067274 (curcumin)	-8,3	3,98	368,38	0,10	-4,50	96,22	7
Zinc5543044	-8,0	2,87	354,35	0,10	-3,72	104,06	7
Zinc471270188	-7,9	3,79	370,40	0,19	-4,33	96,22	8
Zinc899824 (Turmeric)	-7,7	3,20	368,38	0,14	-3,94	93,06	8

MW= Molecular weight; CSP3= Fraction Csp3 ; WS= Water solubility ; TPSA= Topological Polar Surface Area ; NROTB= Number of rotatable bonds ; LogP= $\text{Log}(C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}})$

De ce tableau, on déduit que toutes les molécules qui y sont présentées répondent à la règle des 5 de Lipinski. Il est toutefois intéressant de préciser que le composé **Zinc45299095** est un phénol de la

famille des chalcones qui sont des métabolites secondaires retrouvés dans les racines de plantes. La molécule présente une solubilité modérée (WS= -5,19). Ceci pourrait éventuellement induire la nécessité d'une molécule de transport dans l'organisme.

La figure 5 ci-dessous expose certaines caractéristiques des composés **Zinc5543044** et **Zinc45299095**.

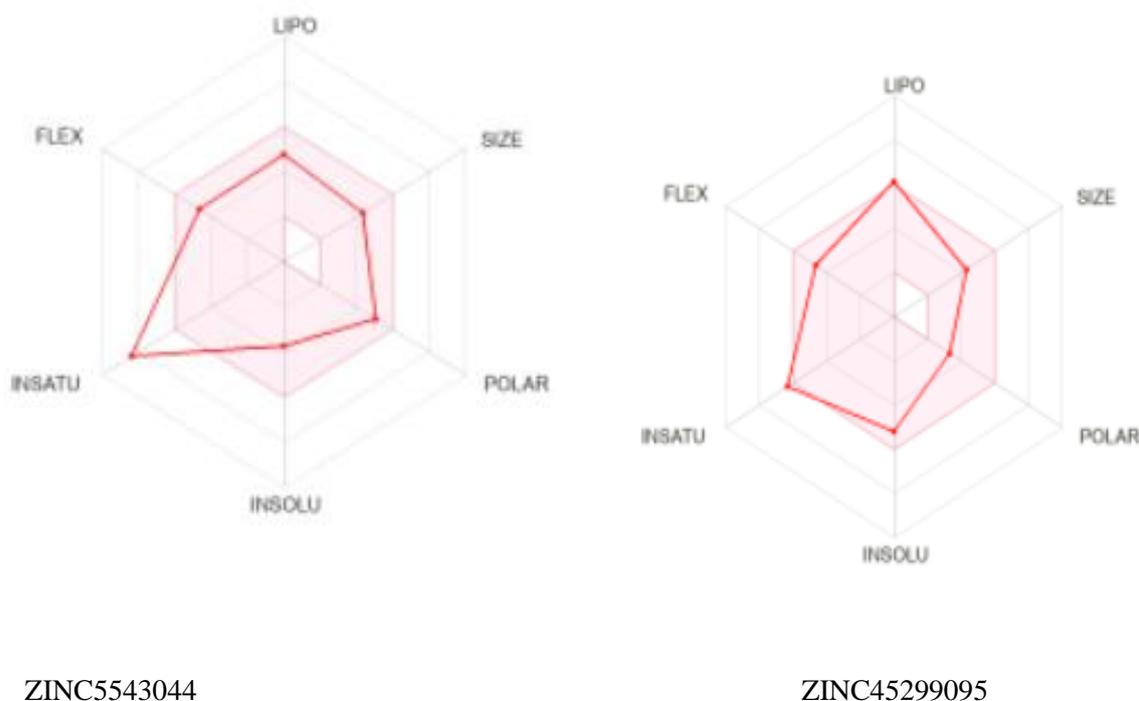


Figure 5: Diagramme de biodisponibilité des molécules les plus actives selon swissadme.ch

Le composé ZINC5543044 présente plus d'insaturation que le composé ZINC45299095. L'analyse de la polarité et de la solubilité montre que le composé ZINC5543044 est plus soluble que le composé ZINC45299095.

Simulation de la dynamique moléculaire.

Dans le but de renforcer notre étude, une simulation de la dynamique moléculaire a été faite avec le composé ZINC45299095. Elle permet d'émettre des hypothèses plus avérées quant au comportement du système protéine-ligand in silico par l'analyse du RMSD, du RMSF, du rayon de giration et des liaisons hydrogènes permettant de prédire le comportement in vivo. La Dynamique moléculaire est reconnue efficace dans l'étude de la modélisation d'un système donné en fonction du temps.

Le RMSD (Root-Mean-Square Deviation) a pour but de se prononcer sur la stabilité d'un système.

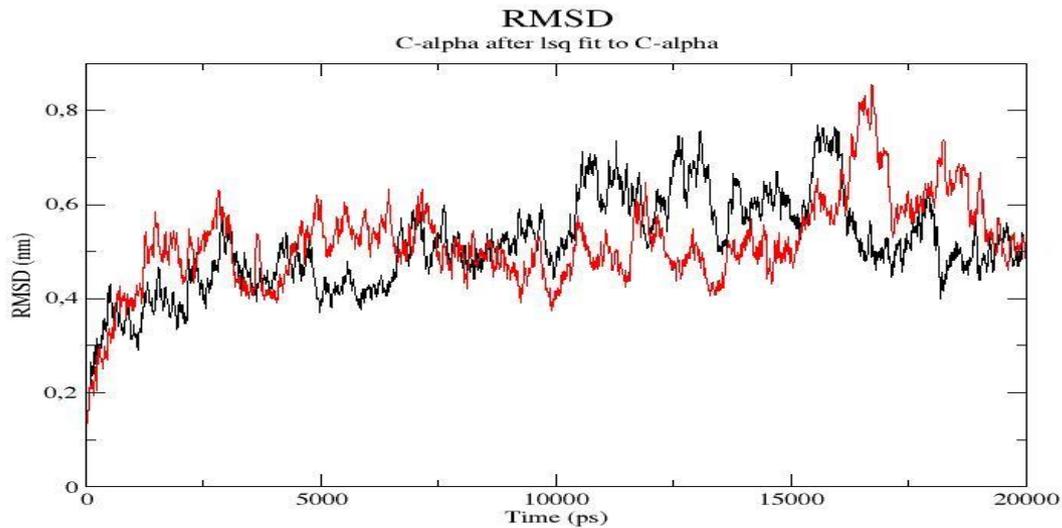


Figure 6: Illustration du RMSD CagA (noir) et du RMSD CagA-Zinc45299095 (rouge)

Le résultat du RMSD de notre système (**figure 6**) montre une stabilité durant les premières nanosecondes avec cependant un pic maximal atteignant les 0,83 nm à environ 17 ns. Ceci pourrait être dû à des changements conformationnels au niveau du système. Nonobstant, on remarque globalement une stabilité aux alentours de 0,5 nm durant toute la longueur de la simulation. Un tel constat nous permet de suggérer qu'avec un temps de dynamique moléculaire plus long on pourrait confirmer une bonne stabilité au niveau du complexe.

L'étude du degré de fluctuation entre les résidus de notre système a été faite grâce à l'analyse du RMSF (**figure 7**). A cet effet, on observe des courbes possédant à peu près les mêmes allures tout au long des 20 ns avec de faibles fluctuations la plupart du temps (en dessous de 0,53 nm). On en déduit alors que le système présente moins de déformations et donc une bonne stabilité.

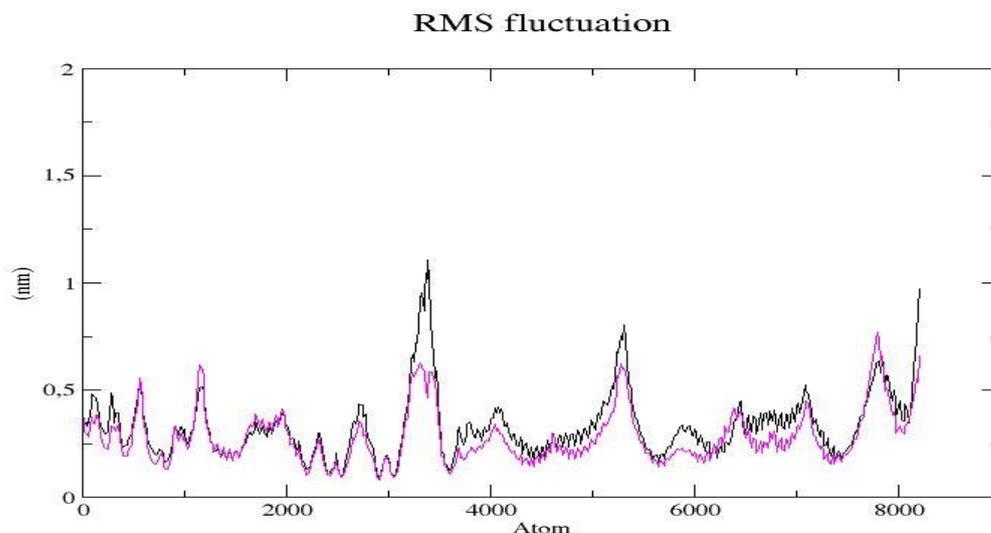


Figure 7: RMSF de CagA (en noir) et RMSF de CagA- Zinc45299095 (Magenta)

De plus, la **figure 8** illustre le rendu du rayon de giration (R_g) nous permettant d'appréhender la compaction au niveau du système. La valeur du R_g maximale de notre système s'établissant à environ 3,23 nm avec très peu de variations illustre une bonne compaction au niveau du système. Cette observation indique, par ricochet, une bonne stabilité.

L'analyse des liaisons hydrogènes (**figure 9**) établies entre le composé **Zinc45299095** et le CagA sous-tend un nombre faible de liaisons hydrogènes qui sont essentiellement compris entre 0 et 1. Ceci suggère que l'interaction entre les deux molécules serait beaucoup plus stabilisée par les interactions d'ordre hydrophobique. Ces observations sont en concordance avec les diverses interactions du composé exposées à la **figure 4**.

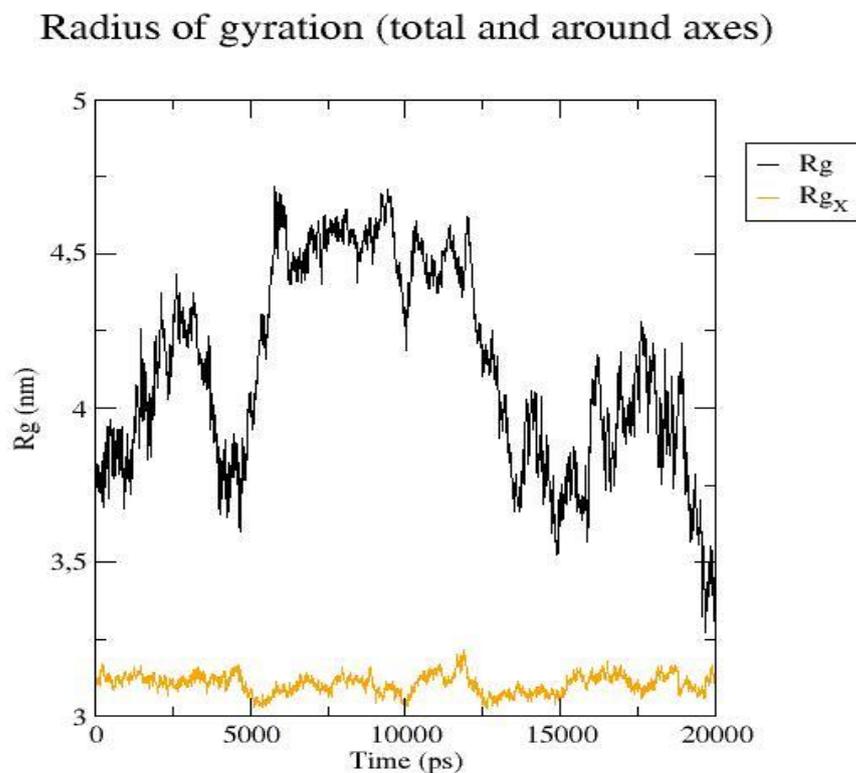


Figure 8 : Rayon de giration : CagA seul (Noir) et CagA- Zinc45299095 (Orange)

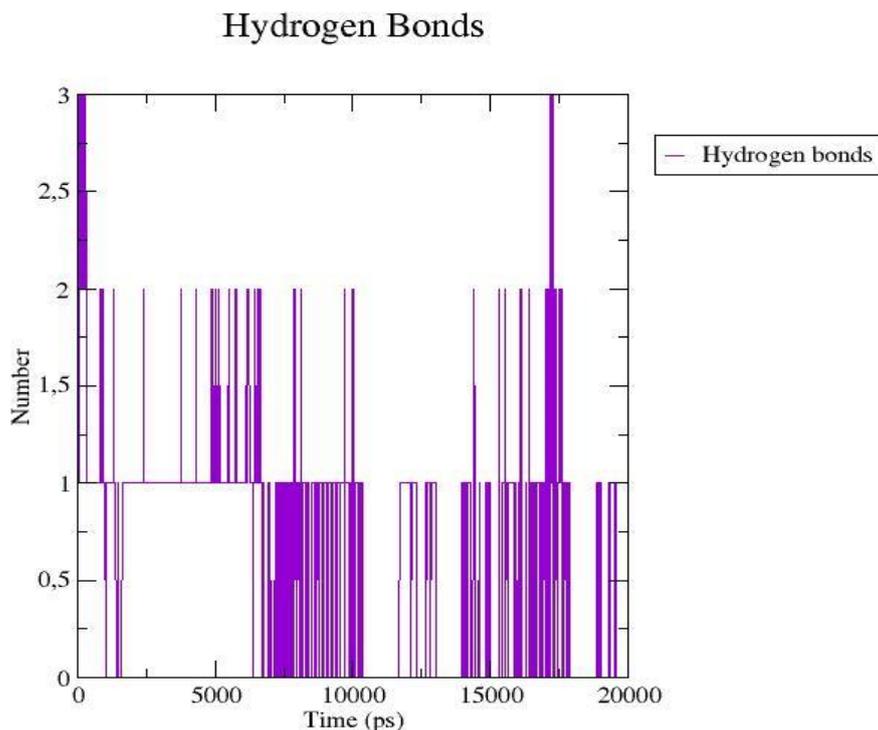


Figure 9 : Liaisons hydrogènes entre CagA-- Zinc45299095

À la lumière de toutes les informations exposées ci-dessus, nous pouvons suggérer que le composé **Zinc45299095** peut constituer une alternative pharmacologique dans la lutte contre le lymphome gastrique en inhibant l'interaction de CagA avec le intégrine $\alpha 5\beta 1$.

Conclusion :

H.Pylori présente une antibiorésistance vis-à-vis des antibiotiques utilisés pour traiter son infection. De plus, l'émergence du lymphome gastrique est corrélée aux activités de la protéine CagA de ladite bactérie. Ceci a orienté la présente étude de docking et de dynamique moléculaire à étudier les effets inhibiteurs d'analogues de licochalone A et de curcumines sur la protéine CagA.

A cet effet, la molécule **Zinc45299095** a présenté des résultats prometteurs dont une énergie de liaison de -8,2 kcal/mol. De même, elle a établi des liaisons hydrogène, alkyl et pi alkyl respectivement avec les acides aminés Asp432, Ala439 et Phe378. Au regard des données de la dynamique moléculaire, celles-ci stipulent ainsi que le composé pourrait constituer une alternative dans la prise en charge du lymphome gastrique.

Références

1. Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
2. Alba, C., Blanco, A., and Alarcón, T. (2017). Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 30, 489–497. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000396>.
3. Benson, N.C., and Daggett, V. (2012). A comparison of multiscale methods for the analysis of molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* 116, 8722–8731. <https://doi.org/10.1021/jp302103t>.
4. Fock, K.M. (2014). Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 40, 250–260. <https://doi.org/10.1111/apt.12814>.
5. Hatakeyama, M. (2008). Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene* 27, 7047–7054. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.353>.
6. Hayashi, T., Senda, M., Morohashi, H., Higashi, H., Horio, M., Kashiba, Y., Nagase, L., Sasaya, D., Shimizu, T., Venugopalan, N., et al. (2012). Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. *Cell Host Microbe* 12, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.010>.
7. Herlevic, V., and Morris, J.D. (2022). Gastric Lymphoma. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
8. Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., and Borén, T. (1998). *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279, 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.373>.
9. Jiménez-Soto, L.F., Kutter, S., Sewald, X., Ertl, C., Weiss, E., Kapp, U., Rohde, M., Pirch, T., Jung, K., Retta, S.F., et al. (2009). *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog.* 5, e1000684. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000684>.
10. Jouimyi, M.R., Bounder, G., Essaidi, I., Boura, H., Zerouali, K., Lebrazi, H., Kettani, A., and Maachi, F. (2020). Molecular docking of a set of flavonoid compounds with *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA. *J. Herbmed Pharmacol.* 9, 412–419. <https://doi.org/10.34172/jhp.2020.52>.
11. Juárez-Salcedo, L.M., Sokol, L., Chavez, J.C., and Dalia, S. (2018). Primary Gastric Lymphoma, Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Treatment. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* 25, 1073274818778256. <https://doi.org/10.1177/1073274818778256>.
12. Kaplan-Türköz, B., and Terradot, L. (2013). [Structure and mode of injection of the oncoprotein CagA of *Helicobacter pylori*]. *Med. Sci. MS* 29, 33–36. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013291011>.

13. Katoh, M. (2007). Dysregulation of stem cell signaling network due to germline mutation, SNP, *Helicobacter pylori* infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer. *Cancer Biol. Ther.* 6, 832–839. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.6.4196>.
14. Kutzner, C., Páll, S., Fechner, M., Esztermann, A., de Groot, B.L., and Grubmüller, H. (2019). More bang for your buck: Improved use of GPU nodes for GROMACS 2018. *J. Comput. Chem.* 40, 2418–2431. <https://doi.org/10.1002/jcc.26011>.
15. Lee, I.O., Kim, J.H., Choi, Y.J., Pillinger, M.H., Kim, S.-Y., Blaser, M.J., and Lee, Y.C. (2010). *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation status determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT signal transduction pathways in gastric epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 285, 16042–16050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111054>.
16. Lin, W.-C., Tsai, H.-F., Kuo, S.-H., Wu, M.-S., Lin, C.-W., Hsu, P.-I., Cheng, A.-L., and Hsu, P.-N. (2010). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res.* 70, 5740–5748. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4690>.
17. Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R.M., Azuma, T., et al. (2007). *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 26, 4617–4626. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210251>.
18. Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G., and Haas, R. (1999). Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol.* 31, 1537–1548. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01300.x>.
19. Odenbreit, S., Gebert, B., Püls, J., Fischer, W., and Haas, R. (2001). Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell. Microbiol.* 3, 21–31. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00088.x>.
20. Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., et al. (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1003–1008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711183105>.
21. Oliveira, M.J., Costa, A.M., Costa, A.C., Ferreira, R.M., Sampaio, P., Machado, J.C., Seruca, R., Mareel, M., and Figueiredo, C. (2009). CagA associates with c-Met, E-cadherin, and p120-catenin in a multiproteic complex that suppresses *Helicobacter pylori*-induced cell-invasive phenotype. *J. Infect. Dis.* 200, 745–755. <https://doi.org/10.1086/604727>.
22. Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K.D., Hundt, E., and Knapp, B. (1999). Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* 27, 3325–3333. <https://doi.org/10.1093/nar/27.16.3325>.
23. Peek, R.M., and Blaser, M.J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer* 2, 28–37. <https://doi.org/10.1038/nrc703>.

24. Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., et al. (2007). *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447, 330–333. <https://doi.org/10.1038/nature05765>.
25. Srivastava, A.K., Tewari, M., Shukla, H.S., and Roy, B.K. (2015). In Silico Profiling of the Potentiality of Curcumin and Conventional Drugs for CagA Oncoprotein Inactivation. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 348, 548–555. <https://doi.org/10.1002/ardp.201400438>.
26. Umehara, S., Higashi, H., Ohnishi, N., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2003). Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* 22, 8337–8342. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207028>.
27. Venerito, M., Vasapolli, R., Rokkas, T., and Malfertheiner, P. (2018). Gastric cancer: epidemiology, prevention, and therapy. *Helicobacter* 23 Suppl 1, e12518. <https://doi.org/10.1111/hel.12518>.
28. Wizenty, J., Tacke, F., and Sigal, M. (2020). Responses of gastric epithelial stem cells and their niche to *Helicobacter pylori* infection. *Ann. Transl. Med.* 8, 568. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.178>.
29. Yamaoka, Y., Kwon, D.H., and Graham, D.Y. (2000). A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7533–7538. <https://doi.org/10.1073/pnas.130079797>.
30. Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., et al. (2000). *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* 191, 593–602.
31. Bardonnnet, P.-L., Faivre, V., Boullanger, P., Piffaretti, J.-C., and Falson, F. (2008). Pre-formulation of liposomes against *Helicobacter pylori*: characterization and interaction with the bacteria. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* 69, 908–922.
32. Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Davidkov, L., Kamburov, V., Jelev, C., and Mitov, I. (2008). Prevalence and evolution of *Helicobacter pylori* resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 409–415.
33. Cellini, L., and Donelli, G. (2000). Virulence Factors of *Helicobacter pylori*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12.
34. Chichirau, B.E., Scheidt, T., Diechler, S., Neuper, T., Horejs-Hoeck, J., Huber, C.G., Posselt, G., and Wessler, S. (2020). Dissecting the *Helicobacter pylori*-regulated transcriptome of B cells. *Pathog. Dis.* 78, ftaa049.
35. Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T.F., Birchmeier, W., and Naumann, M. (2003). *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J. Cell Biol.* 161, 249–255.
36. Floch, P., Mégraud, F., and Lehours, P. (2017). *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins* 9, E132.

37. Hatakeyama, M. (2008a). [Oncogenic mechanism of *Helicobacter pylori*]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* *31*, 132–140.
38. Imani-Saber, Z., and Ghafouri-Fard, S. (2015). In Silico Interaction and Docking Studies Indicate a New Mechanism for PML Dysfunction in Gastric Cancer and Suggest Imatinib as a Drug to Restore Function. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* *16*, 5005–5006.
39. Kaplan-Türköz, B., Jiménez-Soto, L.F., Dian, C., Ertl, C., Remaut, H., Louche, A., Tosi, T., Haas, R., and Terradot, L. (2012). Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with $\beta 1$ integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 14640–14645.
40. Klesiewicz, K., Karczewska, E., Budak, A., Marona, H., and Szkaradek, N. (2016). Anti-*Helicobacter pylori* activity of some newly synthesized derivatives of xanthone. *J. Antibiot. (Tokyo)* *69*, 825–834.
41. Koelblen, T., Bergé, C., Cherrier, M.V., Brillet, K., Jimenez-Soto, L., Ballut, L., Takagi, J., Montserret, R., Rousselle, P., Fischer, W., et al. (2017). Molecular dissection of protein-protein interactions between integrin $\alpha 5\beta 1$ and the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system. *FEBS J.* *284*, 4143–4157.
42. Kuo, S.-H., Chen, L.-T., Lin, C.-W., Yeh, K.-H., Shun, C.-T., Tzeng, Y.-S., Liou, J.-M., Wu, M.-S., Hsu, P.-N., and Cheng, A.-L. (2017). Expressions of the CagA protein and CagA-signaling molecules predict *Helicobacter pylori* dependence of early-stage gastric DLBCL. *Blood* *129*, 188–198.
43. Lettl, C., Haas, R., and Fischer, W. (2021). Kinetics of CagA type IV secretion by *Helicobacter pylori* and the requirement for substrate unfolding. *Mol. Microbiol.* *116*, 794–807.
44. Li, J., and Perez Perez, G.I. (2018). Is There a Role for the Non-*Helicobacter pylori* Bacteria in the Risk of Developing Gastric Cancer? *Int. J. Mol. Sci.* *19*, E1353.
45. Mishra, J.P., Cohen, D., Zamperone, A., Nesic, D., Muesch, A., and Stein, M. (2015). CagA of *Helicobacter pylori* interacts with and inhibits the serine-threonine kinase PRK2. *Cell. Microbiol.* *17*, 1670–1682.
46. Nesić, D., Miller, M.C., Quinkert, Z.T., Stein, M., Chait, B.T., and Stebbins, C.E. (2010). *Helicobacter pylori* CagA inhibits PAR1-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 130–132.
47. Nešić, D., Buti, L., Lu, X., and Stebbins, C.E. (2014). Structure of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein bound to the human tumor suppressor ASPP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1562–1567.
48. Peng, H., Ranaldi, R., Diss, T.C., Isaacson, P.G., Bearzi, I., and Pan, L. (1998). High frequency of CagA+ *Helicobacter pylori* infection in high-grade gastric MALT B-cell lymphomas. *J. Pathol.* *185*, 409–412.

49. Psyrris, A., Papageorgiou, S., and Economopoulos, T. (2008). Primary extranodal lymphomas of stomach: clinical presentation, diagnostic pitfalls and management. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 19, 1992–1999.
50. Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C.R., Meyer, T.F., and Backert, S. (2003). The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* 22, 515–528.
51. Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M., and Hatakeyama, M. (2003). Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 3664–3670.
52. Tsutsumi, R., Takahashi, A., Azuma, T., Higashi, H., and Hatakeyama, M. (2006). Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol. Cell. Biol.* 26, 261–276.
53. Wueppenhorst, N., Stueger, H.-P., Kist, M., and Glocker, E. (2009). Identification and molecular characterization of triple- and quadruple-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 648–653.