

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Aboubakr Belkaïd - Tlemcen -

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

Département de Biologie

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE
APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE

MEMOIRE

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En : Biologie

Spécialité : Immunologie

Thème :

**Effet de la vitamine «C» sur les molécules FnBPs et
 $\alpha 5\beta 1$ impliquées dans l'interaction indirect**

S. aureus-cellules endothéliales

Présenté par :

Ammouche Nasreddine Abdelkader

Soutenue le : 29/09/2022

L'encadrant : Pr Aribi Mourad

Co-encadreur : Dr Miliani Meroua

Dr Hadjidj Zeyneb

Devant le jury composé de :

Présidente : Dr Benmansour Souheila (MAA)

Examinatrice : Dr Hadj Merabet Djahida (MCB)

Année Universitaire 2021-2022

Remerciements :

*Avant tout je remercie Allah
tout puissant de m'avoir guidé
vers le chemin du savoir et de
m'avoir donné le courage et la
volonté pour réaliser ce modeste
travail*

Ce mémoire de Master a été réalisé au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM, W0414100), Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI.

J'adresse tout d'abord mes vifs remerciements et ma vive reconnaissance à mon encadreur Pr. Mourad ARIBI et mon Co-encadreur Dr. Miliani Meroua et Dr. Hadjidj Zeyneb, pour m'avoir encadré, pour sa disponibilité et pour tout leur soutien et conseils durant mon Master et mes travaux de mémoire.

Je tiens à gratifier aussi les membres de jury présidente Dr. Benmansour Souheila et Examinatrice Dr. Hadj Merabet Djahida pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Enfin, on adresse nos sincères sentiments de gratitude et de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace :

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

- A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureux, et ma considération pour les sacrifices qu'elle est consenti pour mon instruction et mon bien être : mon adorable mère Rahmouna.

A LA MEMOIRE DE MON PERE Nassraddine

Ce travail est dédié à mon père décidé trop tôt qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études.

J'espère que du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours pré pour le salut de son père.
Puisse Dieu, le tout puissent féliciter en sa sainte miséricorde

- A ma chère sœur Meriem et mon chère frère Abdelillah qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

Une dédicace spéciale pour mes meilleurs amis Oussama et Aissa et Imad et Anas pour leur présence et leur soutien dans les moments difficiles.

Sommaire

Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre I : vitamine c	
1.la vitamine C	03
1.1 Définition	03
1.2 structure de l'acide ascorbique	04
1.3 Sources de la vitamine C	05
1.4 Les rôles physiologiques et avantages de l'acide ascorbique	05
1.4.1 Rôle d'hydroxylation	06
1.4.2 Rôle antioxydant	06
1.5 Toxicité de la vitamine C	07
Chapitre II : <i>staphylococcus aureus</i>	
2. <i>staphylococcus aureus</i>	09
2.1 Historique	09
2.2 Généralité	09
2.3 Caractéristique bactériologiques	10
2.3.1 Morphologie	10
2.3.2 Caractéristiques biochimiques	11
2.4 Taxinomie	12
2.5 Pouvoir pathogène de <i>S. aureus</i>	13
2.6 facteurs de virulence	13
2.7 Les toxines	15
2.8 Interaction de <i>s. aureus</i> avec la fibronectine	16
2.8.1 La structure de la fibronectine	16
2.8.2 Structure et propriétés des adhésines à la fibronectine (fibronectine-binding protéines : FnBPs)	17
Chapitre III : Effet de la vitamine c sur les molécules fnBPs et $\alpha 5\beta 1$	
1. Régulation de l'expression des FnBPs	20
2. Structure et organisation des FnBPs	20
3. Fibronectine	21
4. Le rôle biologique du FnBPA/FnBPB dans les infections staphylococciques	22
5. Propriétés immunologiques du FnBPA/FnBPB	23
6. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$	24
Chapitre IV : Le docking	
1. Définition	27
2. Types de docking moléculaire	28
2.1 Docking rigide	28
2.2 Docking flexible	28
2.3 Docking semi-flexible	29
3. Outils de docking moléculaire	29
3.1 Récepteur 3D	29
3.2 Ligands 3D	30

3.3 Programmes		30
	Matériels et méthodes	
1. Matériels		33
1.1 Micro-ordinateur		33
1.2 Logiciels		33
1.2.1 argusLab		33
1.2.2 ChemSketch		33
1.2.3 Chem3D		33
1.2.4 Discovery Studio		34
1.3 Banques de données		34
1.3.1. « PDB » (Protein Data Bank)		34
1.3.2 PubChem		34
2. Méthodes		34
2.1 Préparation de la protéine		34
2.2 Préparation du ligand		35
3. Le docking moléculaire		35
Résultats et discussion		38
1. Les Règles de LIPINSKI		39
2. Docking moléculaire		42
3. Interaction entre la vitamine C et la protéine FnBPs		42
Conclusion		46
Références		48

Résumé

Staphylococcus aureus est classiquement considéré comme un agent pathogène extracellulaire, ces bactéries sont également capables d'être absorbées par les cellules hôtes, y compris les phagocytes non professionnels tels que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales ou les ostéoblastes. Le mode de vie intracellulaire de *S. aureus* contribue au développement de l'infection. La voie prédominante de reconnaissance et d'internalisation semble être la liaison de la bactérie via un pont de fibronectine à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la membrane de la cellule hôte, suivie d'une phagocytose. Bien que les ostéoblastes aient montré une expression élevée d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de fibronectine, et que les bactéries adhèrent aux ostéoblastes dans une proportion élevée, La fibronectine a été la première protéine adhésive impliquée dans la formation d'un tel pont entre les protéines de liaison Fn (FnBP) A et B sur la surface staphylococcique et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la surface des cellules endothéliales.

Par ailleurs la vitamine C possède des propriétés antimicrobiennes ainsi que des effets immun-modulateurs, elle contribue à la réduction des risques d'infection.

Dans ce travail, nous avons étudié par Docking moléculaire l'effet de la vitamine C sur les molécules FnBPs et $\alpha 5\beta 1$ Staphylococcique. L'étude de Docking a été réalisée par le programme ArgusLab et visualisée par Discovery studio. Les protéines et les ligands utilisés ont été téléchargé à partir des banques des données PDB et Pubchem.

Les résultats de la simulation ont déterminé que la vitamine C à une forte affinité pour la protéine FnBPs avec une énergie de liaison très faible ce qui signifie qu'il y a eu des interactions qui stabilisent le complexe. La vitamine C est donc bloqué l'entrée de la bactérie en se lie avec son récepteur.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, fibronectine binding protéine, Vitamine C, Docking moléculaire

Abstract

Staphylococcus aureus is classically considered an extracellular pathogen, these bacteria are also able to be taken up by host cells including non-professional phagocytes such as endothelial cells, epithelial cells or osteoblasts. The intracellular lifestyle of *S. aureus* contributes to the development of the infection. The predominant pathway for recognition and internalization appears to be binding of the bacterium via a fibronectin bridge to the $\alpha 5\beta 1$ integrin on the host cell membrane, followed by phagocytosis. Although osteoblasts showed high expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ and fibronectin, and bacteria adhered to osteoblasts in a high proportion, fibronectin was the first adhesive protein involved in the formation of such a bridge between proteins of binding Fn (FnBP) A and B on the staphylococcal surface and integrin $\alpha 5\beta 1$ on the surface of endothelial cells.

In addition, vitamin C has antimicrobial properties as well as immune-modulating effects, it contributes to reducing the risk of infection.

In this work, we studied by molecular docking the effect of vitamin C on FnBPs and $\alpha 5\beta 1$ Staphylococcal molecules. The Docking study was carried out by the ArgusLab program and visualized by Discovery studio. The proteins and ligands used were downloaded from the PDB and Pubchem databases.

The simulation results determined that vitamin C has a high affinity for the FnBPs protein with a very low binding energy which means that there were interactions that stabilize the complex. Vitamin C therefore blocks the entry of the bacteria by binding with its receptor.

Keywords : Staphylococcus aureus, fibronectin binding protein, Vitamin C, molecular docking

ملخص

تعتبر المكورات العنقودية الذهبية تقليدياً من مسببات الأمراض خارج الخلية، وهذه البكتيريا قادرة أيضاً على امتصاصها من قبل الخلايا المضيفة، بما في ذلك الخلايا البلعمة غير المهنية مثل الخلايا البطانية أو الخلايا الظهارية أو الخلايا في تطور العدوى. يبدو أن الطريق السائد للتعرف والاستيعاب *S. aureus* العظمية. يساهم نمط الحياة داخل الخلايا لـ على غشاء الخلية المضيفة، يليه البلعمة. على $\alpha 5 \beta 1$ هو ربط البكتيريا عبر جسر من الفيبرونيكتين إلى إنتغرين الرغم من أن أرومات العظام أظهرت تعبيراً عاليًا عن الإنتغرين 1 5 والفيبرونيكتين، والبكتيريا تلتصق بأرومات العظام بنسبة عالية، إلا أن الفيبرونيكتين كان أول بروتين لاصق يشارك في تكوين مثل هذا الجسر بين البروتينات على العنقودية B و A (FnBP) المرتبطة بالفولط

بالإضافة إلى ذلك، يتمتع فيتامين ج بخصائص مضادة للميكروبات بالإضافة إلى تأثيرات تعديل المناعة، مما يساعد على تقليل مخاطر الإصابة

Docking بواسطة $\alpha 5 \beta 1$ Staphylococcal FnBPs في هذا العمل، درسنا تأثير فيتامين سي على جزيئات تم تنزيل Discovery. وشاهدها استوديو ArgusLab بواسطة برنامج Docking الجزيئي. تم إجراء دراسة Pubchem و PDB البروتينات والربيطات المستخدمة من قواعد بيانات

مع طاقة ارتباط منخفضة جداً مما يعني أنه كانت FnBPs حددت نتائج المحاكاة أن فيتامين سي له صلة عالية ببروتين هناك تفاعلات تعمل على استقرار المركب. لذلك فإن فيتامين سي يسد مدخل البكتيريا عن طريق الارتباط بجهاز الاستقبال.

الكلمات الرئيسية: المكورات العنقودية الذهبية، بروتين ربط الفيبرونيكتين، فيتامين سي، الالتحام الجزيئي

Liste des figures

Figure 1. Structure de la vitamine C

Figure 2. Structure chimique de l'Acide Ascorbique, du L-Ascorbate, du monodéshydro-L-Ascorbate, du déhydro-L-Ascorbate et du déhydro-L-Ascorbatehydraté

Figure 3. Expression des facteurs de virulence chez le *S. aureus*

Figure 4. Structure de la fibronectine

Figure 5. Homologies entre les protéines FnBP A et FnBP B

Figure 6. Organisation des domaines des protéines A et B de liaison à la fibronectine (FnBPA et FnBPB)

Figure 7. Représentation schématique du docking moléculaire

Figure 8. Utilisation des différents logiciels de docking en 2010-2011

Figure 9. Binding site sur ArgusLab

Figure 10. Binding site Bounding Box

Figure 11. : Interaction du ligand avec la protéine

Figure 12. Interaction hydrogène classique

Figure 13. : Interaction hydrogène non classique

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales caractéristiques des Staphylocoques

Tableau 2. Caractéristiques biochimiques du S. aureus

Tableau 3. Classification du S.aureus selon Bergey's (1994)

Tableau 4. Principaux programmes de docking moléculaire.

Tableau 5. L'application des règles de LIPINSKI sur la vitamine C

Tableau 6. : Les poses de ligand

Tableau 7. : Calcul de docking protéine- ligand

Tableau 8. Types de liaisons établies entre la protéine et le ligand

Liste des abréviations

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

S.epidermidis : *Staphylococcus Epidermis*

EI : endocardite infectieuse

Vit C : vitamine c

FnBPs : fibronectin-binding proteins

FnBPA : fibronectine-binding proteins A

FnBPB : fibronectine-binding proteins B

Fn : fibronectine

AA : acide ascorbique

MDHA : monodéhydroascorbate

DHA : déhydroascorbate

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail

SARM : *staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

MSCRAMM : microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

SCN : staphylocoques coagulase négative

GC : guanine -cytosine

PSM : phenol-soluble modulins

LPV : leucocidine de panton valentine

CHIPS : chemotaxis inhibitory proteins of staphylococci

TSST1 : toxine du choc toxique staphylococcique

PDP : Protein Data Bank

3D : trois dimensions

Introduction

I. Introduction

Staphylococcus aureus est à la fois une bactérie commensale et un pathogène humain. Environ 30 % de la population humaine est colonisée par *S. aureus*. Simultanément, il s'agit d'une cause majeure de bactériémie et d'endocardite infectieuse (EI) ainsi que d'infections ostéoarticulaires, cutanées et des tissus mous, pleuropulmonaires et liées au dispositif.

Par ailleurs les vitamines sont des substances organiques actives dans l'organisme à faible dose et participent à maintenir l'équilibre de vie. Les carences en vitamines peuvent entraîner plus ou plus de perturbations métaboliques pas trop grave. Chaque vitamine joue un rôle spécifique et ne peut être remplacée par une autre. La vitamine C joue un rôle vital dans le métabolisme chez l'homme et certaines espèces animales. De plus, elle possède des propriétés biologiques intéressantes qui sont exploitées dans des produits cosmétiques. La vitamine C (acide ascorbique) est indispensable à la formation, la croissance et la réparation du tissu osseux, de la peau et du tissu conjonctif (qui lie les différents tissus et organes et comprend les tendons, les ligaments et les vaisseaux sanguins). Elle est également essentielle au bon fonctionnement des vaisseaux sanguins. La vitamine C aide à garder des dents et des gencives saines. Elle aide l'organisme à absorber le fer, qui est nécessaire à la fabrication des globules rouges. La vitamine C aide aussi à la cicatrisation des brûlures et des blessures.

Dans cette optique, notre travail a pour objectif de réaliser une simulation bioinformatique par dockig moléculaire, afin d'étudier l'effet de la vitamine C sur les molécules FnBPs et $\alpha 5\beta 1$ impliquées dans l'interaction *S.aures*-cellules endothéliales.

Chapitre I :

vitamine C

1. La vitamine C

1.1 Définition

La vitamine C (aussi connue sous le nom d'acide ascorbique) est un constituant normal des tissus animaux et végétaux. Cette substance s'est avéré essentielle pour le corps humain puisque l'homme est incapable de la produire ou de l'emmagasiner. Son absence totale dans l'alimentation donne le scorbut caractérisé par l'apparition de purpura, des hémorragies et la chute des dents dans les cas les plus graves [2].

Albert Szent-Györgyi de Nagyrápolt, un scientifique hongrois, a pu extraire l'acide ascorbique des plantes ou capsules de glande surrénale, Il est actuellement préparé par synthèse, et les propriétés du produit synthétique sont les mêmes que celles du produit naturel. C'est une poudre blanche avec un point de fusion à 190°C, facilement soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et insoluble dans d'autres solvants de matière organique commune. Il se décompose facilement lorsqu'on le chauffe vers 170°C. Son poids moléculaire est de 176 g/mol, correspondant à la formule globale $C_6H_8O_6$ [2].

Chimiquement, c'est la lactone de l'acide céto-2-gulonique sous la forme éolique.

Il a certaines relations de structure avec les sucres[2].

Ses principales propriétés chimiques sont des agents réducteurs puissants. État stable

Après cristallisation, il s'oxyde rapidement en solution, en particulier dans les solutions diluées. L'oxydation Il est spécifiquement catalysé par le cuivre et certaines enzymes.

Un milieu alcalin, l'élévation de la température favorisent aussi l'oxydation ; Le premier produit d'oxydation est l'acide déhydroascorbiq a également une activité vitaminique, alors l'oxydation se poursuit plus ou moins rapidement suivant le milieu réactionnel pour aboutir à la destruction de la vitamine [2].

1.2 Structure de la vitamine C

La structure chimique de l'acide ascorbique (AA) fut établie par Haworth en 1932. La vitamine C est un acide organique dont la structure est apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone 8 atomes d'hydrogènes et 6 atomes d'oxygènes (C₆H₈O₆). Il possède une fonction lactone, une fonction ène-diol (HO-C=C-OH) et deux fonctions alcool. Chimiquement, la vitamine C est un donneur d'électrons ou un agent réducteur, et les électrons de l'ascorbate expliquent tous ses effets physiologiques connus [3].

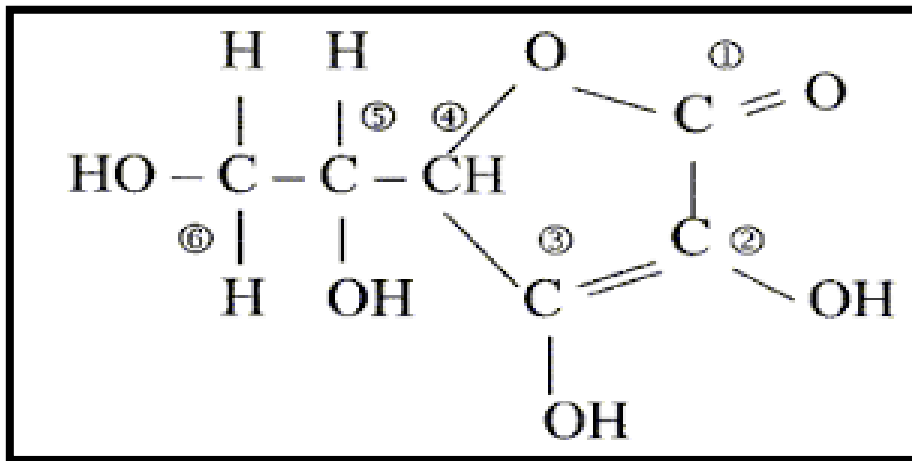


Figure N°01 : Structure de la vitamine C

Dans plantes, l'acide ascorbique est principalement présent sous sa base conjuguée : L-Ascorbate (L-AA, Figure 2). L'ascorbate ou l'acide ascorbique constitue la forme réduite de la vitamine C. Par ailleurs, l'ascorbate peut être oxydé en monodéhydroascorbate (MDHA) qui se dissocie rapidement de nouveau en ascorbate et en déhydroascorbate (DHA) ; le DHA est ensuite dégradé ou réduit à nouveau [4].

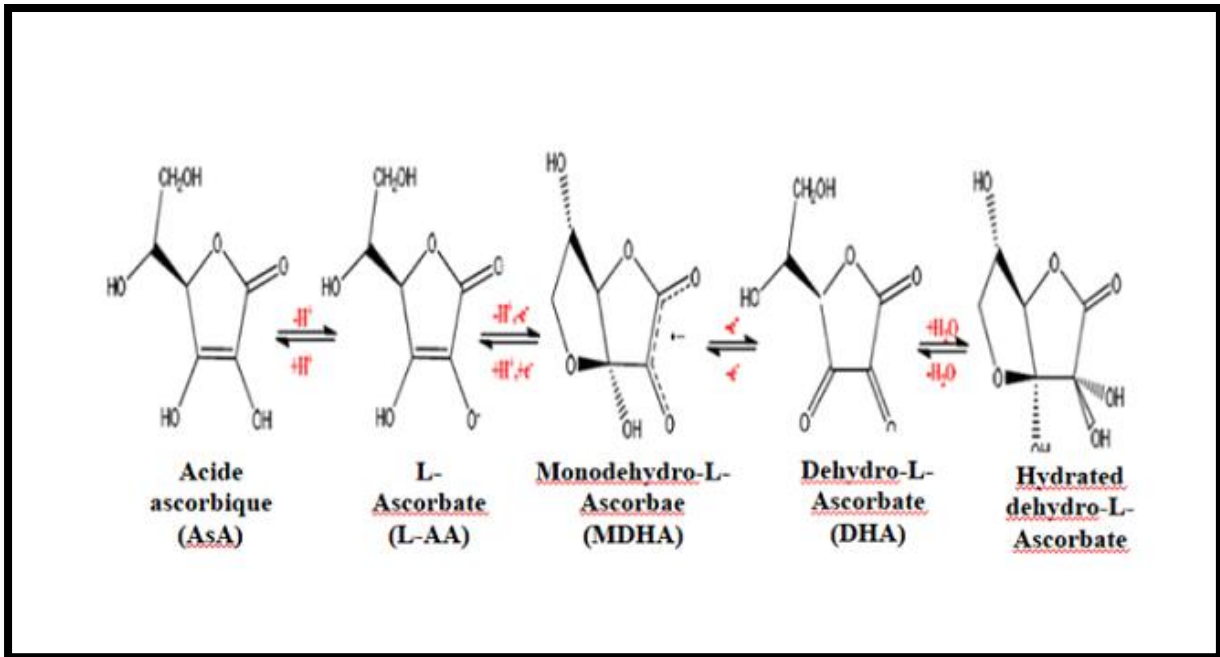


Figure N°02 : Structure chimique de l'Acide Ascorbique, du L-Ascorbate, du monodéshydro-L-Ascorbate, du déhydro-L-Ascorbate et du déhydro-L-Ascorbatehydraté

1.3 Sources de la vitamine C

La vitamine C n'est pas naturellement synthétisée par le corps humain et donc un apport alimentaire adéquat est pour un nécessaire dans un régime alimentaire sain. Les sources naturelles les plus riches en acide ascorbique sont principalement les légumes frais, les agrumes, les fruits frais et les légumes verts. Un bon apport alimentaire (fruits frais) doit suffire à couvrir les besoins quotidiens [5].

1.4 Rôles physiologique et avantages de la vitamine C

L'acide ascorbique joue divers rôles dans l'organisme, notamment en raison de ses propriétés antioxydantes et hydroxylantes. Il participe à la synthèse du collagène, de la Tyrosine, de la carnitine, du cholestérol et des acides biliaires. Il est aussi nécessaire aux défenses immunitaires. La vitamine C est abondante dans les cellules immunitaires et accélère leur mobilité. Elle intervient également dans le métabolisme du fer et a un rôle dans l'élimination des carcinogènes et des nitrosamines cancérigènes [6].

1.4.1 Rôle d'hydroxylation

▪ *Métabolisme du collagène*

Le collagène est un peptide essentiel pour la construction du tissu conjonctif, le soutien des tissus des vaisseaux sanguins et des organes. Il est présent dans la composition de la peau et des phanères, dans La matière organique des os et des dents, située dans les disques intervertébraux et cristalline. L'acide ascorbique est un cofacteur de l'hydroxylase. Sa carence est responsable du dysfonctionnement du collagène, qui peut être altéré les parois vasculaires entraînant un syndrome hémorragique. Les lésions des muqueuses, la gingivite, les changements cutanés et une mauvaise cicatrisation sont les principaux symptômes du scorbut [6].

▪ *Métabolisme de la carnitine*

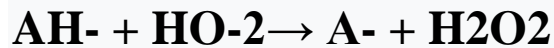
La carnitine est une substance retrouvée dans le muscle cardiaque, et squelettique ou encore dans le foie. Elle est impliquée dans le transport des acides gras jusqu'aux mitochondries où ils sont oxydés. Elle est synthétisée à partir de la lysine et de la méthionine grâce à deux hydroxylases à fer ferreux et dont un des cofacteurs essentiels est l'acide ascorbique [6].

▪ *Métabolisme des catécholamines*

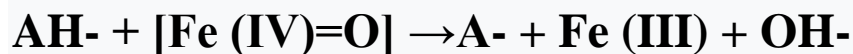
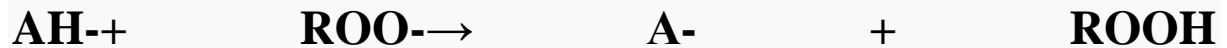
L'acide ascorbique est un cofacteur de la dopamine hydroxylase. Par conséquent, il permet la conversion de dopamine en norépinephrine. Cela pourrait expliquer le problème de Maladie émotionnelle et même mentale décrite dans le scorbut [6].

1.4.2 Le rôle antioxydant

L'effet antioxydant de l'acide ascorbique provient de ses propriétés réductrices. C'est le plus Puissant antioxydant soluble dans l'eau. Il est capable de réagir directement avec les espèce réactives de l'oxygène et les espèces réactive de l'azote. Il réduit l'anion superoxyde sous forme acide ou basique [6] :



Il limite la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux peroxyde et les complexes soxoferryle :



Il est impliqué dans de nombreuses réactions enzymatiques fer-dépendantes telles que l'émission d'électrons. Il aide également à la régénération de la vitamine E. son pouvoir Il a été démontré que les antioxydants sont impliqués dans les mécanismes de défense contre diverses maladies [6].

1.5 Toxicité de la vitamine C

La toxicité de la vitamine C est très faible et sans danger, car la molécule étant hydrosoluble, elle est spontanément éliminée dans les urines lorsque sa concentration plasmatique atteint ou dépasse 12 mg/L [7].

Aucune étude n'a montré que l'acide ascorbique est cancérigène ou tératogène ou qu'il cause des effets néfastes sur la reproduction. Les apports élevés en vitamine C sont considérés comme responsables d'une faible toxicité. Des effets indésirables ont été rapportés principalement après de très fortes doses (supérieures à 3 g/jour).

Les effets indésirables associés à une consommation très élevée sont : la diarrhée et d'autres troubles gastro-intestinaux, l'augmentation de l'excrétion d'oxalate et la formation de calculs rénaux, l'excrétion d'acide urique, les effets pro-oxydants, le conditionnement systémique (rebond scorbut) entraînant une surcharge en fer, une réduction de la vitamine B12 et du cuivre, une augmentation de la demande en oxygène et une érosion de l'émail dentaire [2].

L'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail) estime que 1g d'acide ascorbique semble être la limite supérieure recommandée de l'apport alimentaire lors d'une cure en vitamine C [8].

Chapitre II :
staphylococcus
aureus

2. *staphylococcus aureus*

2.1 Historique

En 1878, Lewis Pasteur et ses collaborateurs ont observé *Staphylococcus* pour la première fois au microscope sous forme « d'amas de grains » dans des pus de furoncles et d'ostéomyélites. Les premiers isolats et cultures *in vitro* ont été réalisés par Sir Alexander Ogston en 1881 (Ogston, 1881). Il décrivit un an plus tard, la première espèce de staphylocoque : *Staphylococcus aureus*, en raison de sa pigmentation jaune. Le staphylocoque blanc, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), fut découvert par la suite [9]

- La pénicilline (Fleming, 1929) a été utilisée pour la première fois en 1941 pour traiter un patient atteint d'une septicémie à staphylocoque.
- En 1947, les premières souches de staphylocoque résistantes à la pénicilline ont été identifiées (Barber, 1947).
- L'arrivée de la méticilline dans les années 60 a mis fin à cette épidémie.
- Cependant, la résistance à ce nouvel antibiotique a été décrite dès 1961 au Royaume-Uni (Barber, 1961).
- Les SARM (*Staphylococcus aureus* Résistant à la Méticilline) sont alors devenus l'une des premières causes d'infections nosocomiales.
- Depuis 2002, de nombreux cas de résistance à la vancomycine ont été reportés entre autres aux Etats-Unis (Chang et al., 2003).
- Aujourd'hui, ces multi-résistances font du *S. aureus* un enjeu majeur en santé publique [9].

2.2. Généralités

Les Staphylocoques sont des bactéries à Gram positif inconstamment encapsulées, aéroanaérobies facultatives, ubiquitaires. Ils se présentent généralement sous forme de coquillages Ils sont regroupés en grappes irrégulières, parfois isolés, par paires ou en chaînes très courtes. Les critères de virulence de la bactérie *in vitro* sont directement corrélés à un équipement enzymatique complexe avec en premier lieu la capacité ou non de produire une enzyme de type coagulase [10].

On distingue l'espèce *Staphylococcus aureus* à coagulase positive appelée également staphylocoque doré (élaboration d'un pigment caroténoïde donnant une

couleur dorée à la colonie), d'autres espèces de staphylocoques à coagulase négative (SCN) ont été regroupées aussi sous le nom de Staphylocoques blancs (par opposition au doré) : *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, etc [10].

2.3 Caractéristique bactériologiques

2.3.1 Morphologie

D'après les tests biochimiques et la forme des colonies le genre *Staphylococcus* et l'espèce *S. aureus* peuvent être identifiés selon les critères suivants [11].

- ❖ Les staphylocoques sont des cocci sphériques à Gram positif de 0,5 à 2,5 μm [11].
- ❖ Isolées ou groupées en amas de plusieurs éléments réalisant la disposition en grappe de raisin
- ❖ Ce sont des cocci qui mesurent 0,8 à 1 μm de diamètre
- ❖ Immobiles, asporulés, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule
- ❖ Les staphylocoques sont généralement divisés en deux groupes en fonction de leurs capacités à produire une coagulase libre
- ❖ Les staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus*) ont un pouvoir pathogène bien démontré par rapport au groupe des staphylocoques à coagulase négative qui sont considérés comme pas ou peu pathogènes [12].

Tableau 1 : Principales caractéristiques des Staphylocoques

Morphologie.	-Cocci sphérique de 0,5 à 1µm de diamètre : -en amas (grappes de raisin) : <i>S.aureus</i> ; -en paires, amas irréguliers : autre espèce.
Coloration de Gram	Gram+
Mobilité	Immobiles (mouvements browniens).
Type respiratoire	Anaérobies facultatifs en général.
Oxydase	Positive.
Catalase	Positive.
Conditions de culture	-Température optimale à 37°C : croissance à 10°C et à 45°C selon les espèces. - Ph optimale de 7,2 à 7,4.
Caractères spécifiques	Halotolérants : 6,5% de NaCl
Milieux de culture d'usage Courant	Gélose nutritive, gélose trypticase soja ...
Milieux d'isolement sélectifs	Gélose de Baird-Parker : Milieu de Chapman...
Milieux d'enrichissements sélectifs	Bouillon de Giolitti-Canton

2.3.2 Caractéristiques biochimiques

La meilleure caractéristique de *S. aureus* est la production de coagulase staphylococcique, une enzyme Facile à démontrer en laboratoire[12]. *Staphylococcus aureus* produit une variété d'enzymes : protéase, lipase, coagulase apparentée Ou "facteur d'agrégation", coagulase libre. Les substances biochimiques sont résumées dans le tableau ci-dessous : [12]

Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques du *S. aureus*

Caractère	<i>S. aureus</i>
Oxydase	-
Catalase	+
Coagulase	+
Fermentation du glucose sans production de gaz	+
Fermentation du mannitol	+
Production d'indole	+
Uréase	+
Nitrate réductase	+
Réduction de tellurite de potassium en tellure	+

2.4 Taxonomie

Selon la 9ème édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à coloration Gram positive pauvres en GC (guanine-cytosine), dans le phylum des firmicutes : [13]

Tableau 3 : Classification du *S. aureus* selon Bergey's (1994) [13].

Domaine	Bactérie ou Eubactérie
Phylum XIII	Firmicutes
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

2.5 Pouvoir pathogène de *S.aureus*

Staphylococcus aureus est un enjeu de santé publique du fait de la variété des infections et de sa gravité, dont la fréquence est également due à l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques. Il est responsable de nombreuses infections hospitalières et communautaires. Sa pathogénicité est causée par des enzymes (catalase, coagulase, désoxyribonucléase, phosphatase, hyaluronidase, plasmine, lipase et hémolysine) et des toxines (hémolysine, leucolysine, entérotoxines, exfoliants) qui lui confèrent respectivement son pouvoir invasif et toxigène. Cette bactérie est, avant tout, une bactérie pyogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses. Les principales staphylococcies cutanées sont dues à la pénétration et la multiplication de la bactérie dans les annexes de la peau qui provoquent un large panel d'infections : folliculites, furoncles, anthrax, orgelets, panaris, impétigo ou abcès. Les infections toxiques, quant à elles, sont dues à la diffusion dans les tissus de toxines spécifiques qui provoquent plusieurs types d'infections : le choc toxique staphylococcique, le syndrome d'exfoliation, l'impétigo bulleux ou encore des toxi-infections alimentaires [14]. *S. aureus* : Il est responsable d'infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que de syndromes liés à l'action de toxines.

2.6 Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence de *S. aureus* sont à l'origine de l'établissement de l'infection chez l'homme. Ces facteurs exercent des multiples fonctions, ils contribuent à la neutralisation du système immunitaire de l'hôte, l'adhésion de la matrice cellulaire, la dissémination et à l'acquisition de nouveaux nutriments [13].

La plupart des composants de la paroi sont impliqués dans la virulence de *S. aureus*. En plus des protéines de surface, la bactérie sécrète un panel de toxines et d'enzymes (fig. 3). Toutes ces protéines liées ou contribuent à la capacité de la bactérie à surmonter les défenses de l'hôte et à envahir, coloniser et survivre dans les tissus. Leur expression est donc étroitement régulée dans le temps. Les enzymes sécrétées par *Staphylococcus aureus* peuvent dégrader les tissus humains, Favoriser la propagation des agents infectieux. Les principales enzymes extracellulaires sont des protéases, auréolysine, désoxyribonucléase, lipase, phosphatase, catalase, hyaluronidase et coagulase. *S. aureus* produit plusieurs

toxines cytolytiques ayant la capacité de détruire les cellules de la défense de l'hôte en formant des pores au niveau des membranes cellulaires. Parmi elles, on peut citer les hémolysines (α - δ), les peptides PSM (phenol-soluble modulins) ou « phénol-soluble peptides », la leucocidine de Pantone Valentine (LPV), et la leucocidine LukE-LukD. En plus des toxines cytolytiques, certaines souches de *S. aureus* produisent également des toxines à activité épidermolytique (exfoliatines ou épidermolysines ETA, ETB et ETD), et des protéines CHIPS (Chemotaxis Inhibitory Proteins of Staphylococci) dont l'action est d'inhiber le chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes [13].

D'autres souches de *S. aureus* produisent des toxines (superantigènes) responsables de syndromes spécifiques (entérotoxines A-E et toxine du choc toxique staphylococcique 1 [TSST-1]). La plupart des souches cliniques produisent une capsule polysaccharidique qui donne aux bactéries la capacité de résister à la phagocytose. La protéine A se lie aux immunoglobulines et empêche l'opsonisation [13].

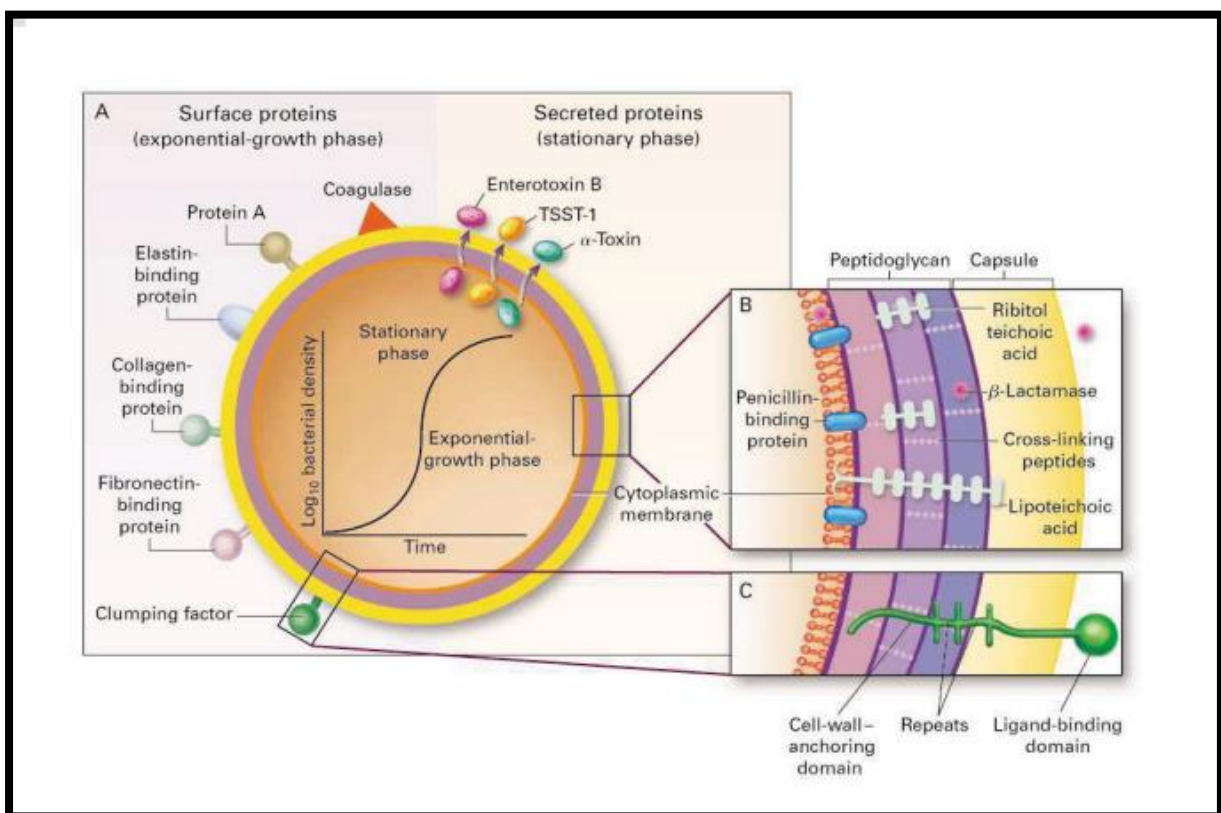


Figure N°03 : Expression des facteurs de virulence chez le *S. aureus*

Le schéma A montré les principales protéines de surface et secrétées de *S. aureus*. La synthèse de ces protéines est dépendante de la phase de croissance de la bactérie comme le montre le graphique au centre. Les facteurs de virulence solubles sont principalement secrétés au cours de la phase stationnaire de croissance. Les schémas B et C montrent des sections de l'enveloppe bactérienne.

2.7 Les Toxines

Le *S. aureus* est responsable de plusieurs infections causées par une large gamme de toxines :

A. Hémolysines ou staphylolysines

Plusieurs Hémolysines ont été décrites (alpha, bêta, Gamma, delta), Elles ont une action cytolytique sur les plaquettes et les globules rouge [15].

B. La leucocidine

La Leucocidine de Pantone Valentine (PVL) est une exotoxine cytolytique composée de deux parties LukS-PV et LukF-PV. Ces deux composants sont secrétés séparément puis s'assemblent en octamère à la surface des cellules cibles, ce qui provoquera la formation d'un pore au niveau de la membrane cellulaire. Cette exotoxine induit la lyse de plusieurs types cellulaires comme les polynucléaires, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages [15].

C. Les entérotoxines

Elles sont responsables d'intoxication alimentaires (diarrhée, vomissements, douleurs abdominales). Ce sont des protéines thermostables, insensibles aux enzymes protéolytiques du suc digestif. Dont il existe 7 sérotypes différents. Des souches de *S. aureus* produisent une entérotoxine. Les entérotoxines staphylococciques sont des exotoxines gastro-intestinales puissantes synthétisées par *S. aureus* tout au long de la phase exponentielle de la croissance ou durant la transition de cette phase à la phase stationnaire. Elles sont actives en faible

quantité [15].

D. La toxine responsable du choc toxique Staphylococcique (TSST-1)

La (TSST-1) est un super-antigène extracellulaire retrouvé chez plus de 90% des souches responsables de ce syndrome. Cette toxine a un effet pyrogène et entraîne l'activation simultanée de plusieurs sous-populations lymphocytaires et provoque la libération de plusieurs médiateurs cytokiniques (TNF- α , IL-1, IL-6) responsables de la symptomatologie du choc staphylococcique [15].

E. L'exfoliatine

C'est une protéine thermostable responsable des lésions d'érythrodermie bulleuse que l'on observe parfois au cours des septicémies à staphylocoques et au cours de l'impétigo. Produite par certaines souches de *S. aureus*, on distingue deux sérotypes A et B : le gène codant du sérotype A est chromosomique et celui codant le sérotype B est plasmidique [15].

2.8 Interaction de *S. aureus* avec la fibronectine

2.8.1 La structure de la fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine d'un poids moléculaire variant de 420 à 500 kDa en fonction des épissages alternatifs qu'elle subit des glycosylations qu'elle arbore (4-9% de la masse de la fibronectine). Elle est constituée de deux sous-unités homologues chacune d'environ 250 kDa. Les deux sous-unités sont reliées entre elles par deux ponts disulfures au niveau du domaine carboxy-terminal. Cette protéine d'environ 8.7 nm de rayon hydrodynamique [16] est trouvée sous forme soluble dans les liquides physiologiques tels que le plasma, la lymphe et la synovie, et dans certains fluides pathologiques comme les ascites. Cette molécule est constituée de domaines de type I : a une longueur de 45 acides aminés et est situé aux extrémités de la protéine (N- et C-terminale), Le type II : est constitué 60 acides aminés répétés deux fois. Et le type III : a 90 acides aminés et est répété de 15 à 17 fois. La fibronectine possède également trois domaines d'épissage alternatif appelés EDA, EDB et III CS (Figure 4). Ces domaines d'épissage, qui ne sont généralement pas présents dans la molécule de fibronectine plasmatique, ont permis de recenser

environ 20 isoformes pour cette protéine et qui ont des localisations et des rôles différents. Dans sa conformation dépliée, cette fibronectine possède une longueur d'environ 140 nm [17]. En 2000, il a été montré que la fibronectine en solution correspond à une chaîne gaussienne qui adopte une conformation qui change sans cesse du fait de l'agitation thermique, et qu'à un instant donné, la conformation des chaînes est différente d'une molécule à l'autre. En d'autres termes, la fibronectine possède une grande flexibilité à l'échelle de la molécule contre une structuration importante à l'échelle des modules constituant la fibronectine [18].

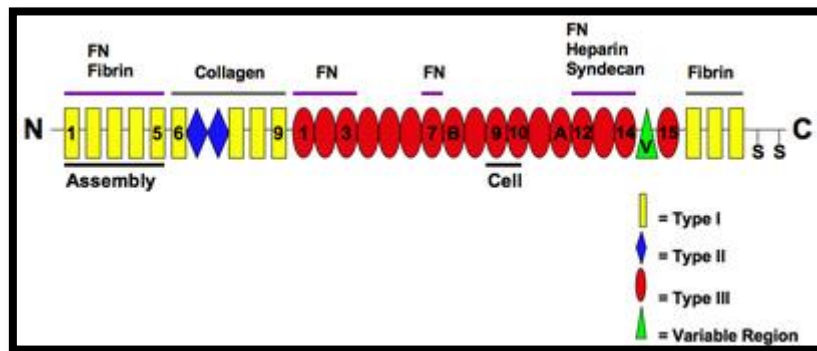


Figure N°04 : Structure de la fibronectine

2.8.2 Structure et propriétés des adhésines à la fibronectine

Les adhésines liant la fibronectine n'ont pas pu être caractérisées facilement par voie biochimique. Leur structure a été rendue à partir de 1987 par le clonage et le séquençage du gène de la première (FnBPA) des deux FnBP présents dans la souche de laboratoire. La deuxième FnBP (FnBPB) a été clonée en 1991 et localisée à la suite du gène codant pour la FnBPA [12].

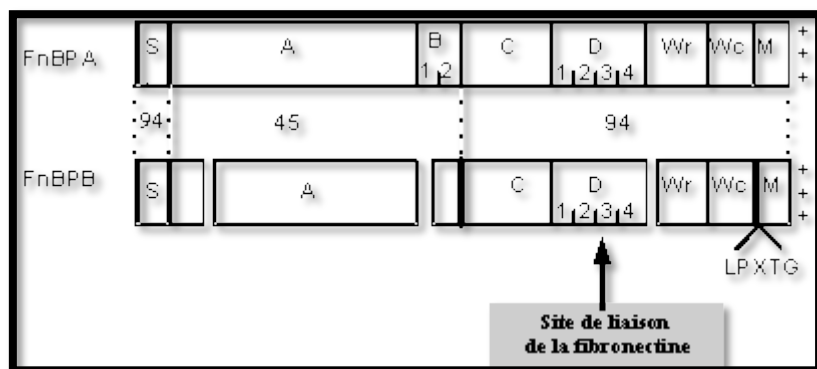


Figure N°05 : Homologies entre les protéines FnBP A et FnBP B

Chapitre II : *Staphylococcus aureus*

Les deux protéines FnBP ont des régions extrêmement bien conservées, en particulier dans leur séquence de liaison à la fibronectine.

(Les pourcentages d'homologie sont indiqués entre les régions délimitées par des traits pointillés verticaux.

S : peptide signal. A, B, C, D : Régions extracellulaires. Wr, Wc : Régions pariétales. M : Région membranaire. + : Région cytoplasmique chargée positivement.

Les séquences de FnBPA et FnBPB ont été comparées et se sont avérées très similaires (figure 5) [12].

**Chapitre III : *Effet de
la vitamine c sur les
molécules fnBPs et
 $\alpha 5\beta 1$***

1. Régulation de l'expression des FnBPs

Les FnBP, comme de nombreux autres MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), sont principalement présents à un niveau détectable et fonctionnel à la surface des cellules de *S. aureus* pendant la phase exponentielle de croissance. Ceci suggère que la transcription des gènes *fnb* est prédominante en phase exponentielle et que FnBPA et FnBPB peuvent être dégradés par la protéase et être éliminés dans le milieu pendant la phase stationnaire. Cependant, pendant la phase stationnaire, une quantité suffisante de protéines reste à la surface des cellules bactériennes, comme l'indique la capacité des bactéries à conserver la liaison à Fn. Les gènes *fnb* sont soumis à un contrôle au niveau de la transcription par les régulateurs globaux Agr (accessory gene regulator) et Sar (Staphylococcal accessory regulator) [19] [20]. La protéine Sar active la synthèse des FnBP pendant la phase exponentielle, tandis que Agr régule à la baisse la transcription des gènes pour les protéines de liaison Fn de manière post-exponentielle [21].

2. Structure et organisation des FnBPs

Les protéines FnBPA et FnBPB sont codées par des gènes étroitement apparentés *fnbA* et *fnbB*[22]. L'analyse d'une collection de 163 isolats cliniques a révélé que la majorité des souches de *S. aureus* contiennent à la fois les deux gènes et que certaines souches, notamment celles des lignées CC30 et CC45, n'expriment pas le FnBPB (par exemple, le SARM épidémique associé aux soins de santé) [23]. Les deux protéines comprennent une séquence signal N-terminale et un signal de tri comprenant un motif Leu-Pro-X-Thr-Gly (où X représente n'importe quel acide aminé), une région membranaire hydrophobe et une queue cytosolique, à l'extrémité C. La région de liaison au ligand la plus proche du FnBPA et du FnBPB réside dans le domaine N-terminal A, qui est composé de trois sous-domaines repliés de type IgG (de N1 à N3). La combinaison des sous-domaines N2 et N3 forme un sillon hydrophobe qui lie les ligands. Situé entre le domaine A et la région s'étendant sur la paroi se trouve une longue région répétitive de liaison Fn non structurée (FnBR) composée de 11 répétitions dans FnBPA et 10 dans FnBPB [23].

Chapitre III : Effet de la vitamine c sur les molécules *fnBPs* et *a5B1*

Les répétitions de liaison Fn se lient individuellement au domaine N-terminal (NTD) de Fn et présentent des variations de séquence considérables, ce qui explique à son tour les différences d'affinité de chaque répétition pour le ligand(Figure 6)

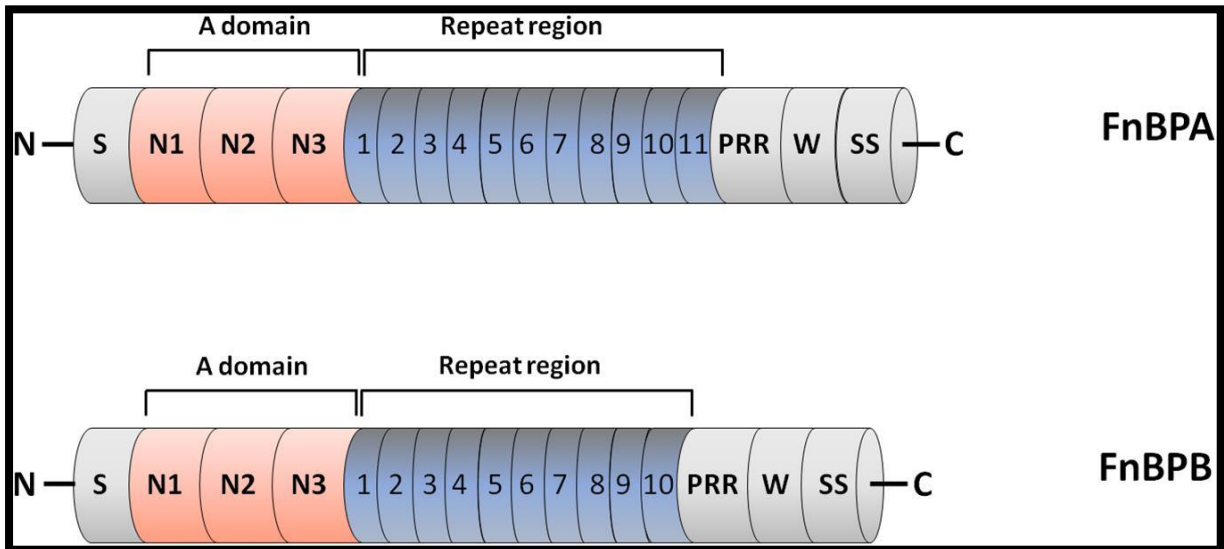


Figure N°06 : Organisation des domaines des protéines A et B de liaison à la fibronectine (FnBPA et FnBPB)

3. Fibronectine

Le nom de la fibronectine vient du latin *fibra* qui signifie « fibre » et *nectere* qui signifie « lier ». Ce nom lui a été donné de par sa structure allongée mais également de par sa capacité à se lier à différents partenaires pour former des réseaux. La fibronectine est une des macromolécules constituant les matrices extracellulaires. Cette protéine, découverte en 1948 sous le nom de « cold-insoluble protein » [24], est une des premières protéines ayant été reconnue pour sa double fonction : structurelle mais également fonctionnelle [25].

À l'issue d'un épissage alternatif, différents isoformes de fibronectine sont produits. La fibronectine est synthétisée par les hépatocytes et sécrétée dans le plasma sous forme soluble et compacte à une concentration d'environ 300 µg/ml [26]. On parle alors de fibronectine plasmatique. Cette molécule est également produite par les cellules résidentes des différents tissus dont les cellules endothéliales et les fibroblastes [25]. On parle de fibronectine cellulaire. Dans ce dernier cas, elle est liée à

Chapitre III : Effet de la vitamine c sur les molécules *fnBPs* et *a5B1*

la surface des cellules. Ces deux fibronectines peuvent être assemblées et incorporées sous forme insoluble et fibrillaire dans les matrices en phase solide [27]. Des études montrent également la formation *in vivo* d'agrégats de fibronectine dans certaines conditions pathologiques telle la glomérulopathie ou les lésions de sclérose en plaque [28]. Cette protéine peut donc se trouver sous différentes conformations moléculaires et supramoléculaires.

L'existence d'au moins deux conformations de la fibronectine (compact ou fibrillaire) mène à s'interroger sur la relation entre son état structural et son rôle dans les matrices. Ainsi, pour déterminer les rôles de la fibronectine, il est nécessaire de s'intéresser à sa structure ainsi qu'à ses mécanismes de repliement et assemblage. C'est dans cette perspective que des études *in silico* et *in vitro* en absence de cellules ont été réalisées et d'avoir un aperçu de l'organisation de la fibronectine.

4. Rôle biologique des FnBPA/FnBpB dans les infections staphylococciques

Adhésion et invasion

Les FnBP contribuent à la colonisation et à l'infection de l'hôte par *S. aureus* via l'adhésion à la Fn présente dans la matrice extracellulaire des tissus. Suite à l'adhésion, *S. aureus* est capable d'envahir une variété de cellules de mammifères phagocytaires non professionnelles, telles que les cellules épithéliales, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les kératinocytes [29]. L'importance de l'invasion bactérienne n'est pas claire, mais elle pourrait être impliquée dans l'évasion des défenses immunitaires de l'hôte et la protection contre les antibiotiques. Le pontage Fn entre les FnBP et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la surface de la cellule hôte est suffisant pour induire l'absorption de type fermeture éclair des staphylocoques [30]. Une étude axée sur le rôle dépendant du FnBR de l'invasion des cellules endothéliales par *S. aureus* a démontré que l'invasion cellulaire peut être facilitée par les FnBR à haute affinité pour le Fn, tandis que les FnBR à faible affinité exprimées sur la surface staphylococcique assurent l'adhérence mais pas l'invasion. De plus, plusieurs FnBR ont augmenté l'efficacité de l'invasion sans altérer le mécanisme d'absorption [31]. Les variantes de petites colonies (VPC), une sous-population de *S. aureus* provenant de mutations dans les gènes métaboliques et adaptée pour persister viable dans le milieu intracellulaire, expriment des niveaux

Chapitre III : Effet de la vitamine c sur les molécules *fnBPs* et *a5B1*

élevés de FnBP, une propriété qui facilite l'invasion des cellules hôtes [32]. Récemment, un modèle d'invasion impliquant FnBPA, Fn et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été proposé. Le Fn natif dimérique en solution existe principalement sous la forme d'un conformère globulaire compact où les modules 9FnIII-10FnIII situés dans le domaine central de liaison cellulaire sont occlus et gênés par la liaison aux molécules d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la surface des cellules. Lors de la liaison au DNT de Fn, les répétitions FnBPA perturbent les contacts intramoléculaires spécifiques au sein des chaînes Fn, ce qui entraîne l'exposition des sites de liaison cryptiques $\alpha 5\beta 1$ et la facilitation de l'interaction Fn avec et du regroupement des intégrines[33]. Le regroupement des intégrines favorise le recrutement de protéines telles que la vinculine, la zyxine et la tensine, ainsi que l'activation des kinases d'adhésion focales (AKF) et Src au site de fixation bactérienne. L'activité concertée de AKF et de Src entraîne la phosphorylation de la tyrosine de plusieurs effecteurs, notamment la cortactine, la polymérisation de l'actine et l'invasion bactérienne finale [34]. Ce modèle d'invasion pour les FnBP rappelle l'adhésine afimbriale YadA de *Yersinia pseudotuberculosis* et la protéine de surface F1 de *Streptococcus pyogenes* qui favorisent l'invasion de la cellule hôte via le pontage Fn avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ [35]. Ensemble, ces résultats soutiennent le concept selon lequel le mécanisme d'invasion médié par FnBP est un processus assez courant chez les bactéries.

5. Propriétés immunologiques des FnBPA/FnBPB

Compte tenu du rôle important joué par les FnBP dans la pathogenèse, il est crucial de définir les propriétés immunologiques et le potentiel de ces facteurs de virulence dans le développement de vaccins. Une étude réalisée par Zuo et al. a démontré qu'un domaine avait une forte immunogénicité et induisait une survie accrue des souris immunisées avec l'antigène, tandis que la région de liaison Fn C-terminale avait de mauvaises propriétés antigéniques. De plus, un segment d'acides aminés situé entre les sous-domaines N1 et N2 a montré une immunogénicité et un potentiel vaccinal comparables au domaine A complet du FnBPA[36]. Plus précisément, un épitope linéaire des lymphocytes B dans la même sous-région du FnBPA a été identifié et s'est avéré évoquer une réponse immunitaire protectrice contre l'infection à *S. aureus* chez les souris immunisées [37]. Ainsi, la région A des FnBP semble être un composant prometteur pour un vaccin antistaphylococcique.

6. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Les intégrines sont composées d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. Le domaine extracellulaire de la sous-unité α a une hélice β à 7 pales connectée à une cuisse et à deux domaines de mollet. De plus, neuf des sous-unités α ont un domaine I qui contient le site adhérent dépendant des ions métalliques (SADIM), crucial pour la liaison du ligand [41]. La sous-unité α est responsable de la haute spécificité de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pour la fibronectine. La combinaison d'une interaction primaire avec le site RGD avec une interaction secondaire avec le site de synergie de la fibronectine assure à la (Arg-Gly-Asp) fois une affinité et une spécificité élevées de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pour la fibronectine [42][43]. La partie extracellulaire de la sous-unité β est composée d'un domaine hybride, d'un domaine bêtaI (avec une structure SADIM), d'un domaine plexine/sémaphorine/intégrine et de quatre domaines de type EGF [45].

Les structures cristallines ont révélé que les intégrines $\beta 3$ se présentent dans trois états possibles : affinité faible, intermédiaire et élevée pour son ligand [46]. L'activation de l'intégrine soit en se liant à son ligand (signalisation de l'extérieur vers l'intérieur), soit en liant une protéine activatrice comme la taline à sa queue cytoplasmique (signalisation à l'envers) entraîne un changement de conformation d'une courbure (faible affinité) à une extension. (Haute affinité). Au site proximal du domaine transmembranaire GFFKR, des résidus, extrêmement conservés dans la sous-unité α , et des résidus hydrophobes proximaux de la membrane dans la sous-unité β , sont impliqués dans la libération de l'intégrine d'une conformation inactive à une conformation active, avec des queues cytoplasmiques non liées disponibles pour transduction du signal [47]. Les intégrines n'ont pas d'activité enzymatique, la transduction du signal est donc effectuée par des protéines recrutées dans la queue cytoplasmique telles que AKF, src et talin [48]. La longueur et l'intensité du signal sont régulées en partie par des protéines régulatrices négatives spécifiques telles que ICAP1 ou shardin. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ possède des régulateurs spécifiques comme la nischarine et GIPC1 [49]. En plus du recrutement d'inhibiteurs de signalisation, le trafic d'intégrines peut réguler la signalisation. Après activation, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ peut

Chapitre III : Effet de la vitamine c sur les molécules *fnBPs* et *a5B1*

soit être ubiquitinée et dégradée dans le lysosome, soit être recyclée rapidement vers la membrane plasmique via la voie précoce de l'endosome [50].

Chapitre IV :

Le docking

1. Définition

Le docking moléculaire ou autrement dit l'amarrage moléculaire est une procédure de simulation bio-informatique largement utilisée pour prédire la conformation d'un complexe récepteur-ligand, où le récepteur est généralement une protéine ou une molécule d'acide nucléique et où le ligand est soit une petite molécule soit une autre protéine [51].

Le docking moléculaire se déroule en deux étapes distinctes

La première étape « Docking » est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, les positions et les orientations possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.

La seconde dite « Scoring » est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées [52].

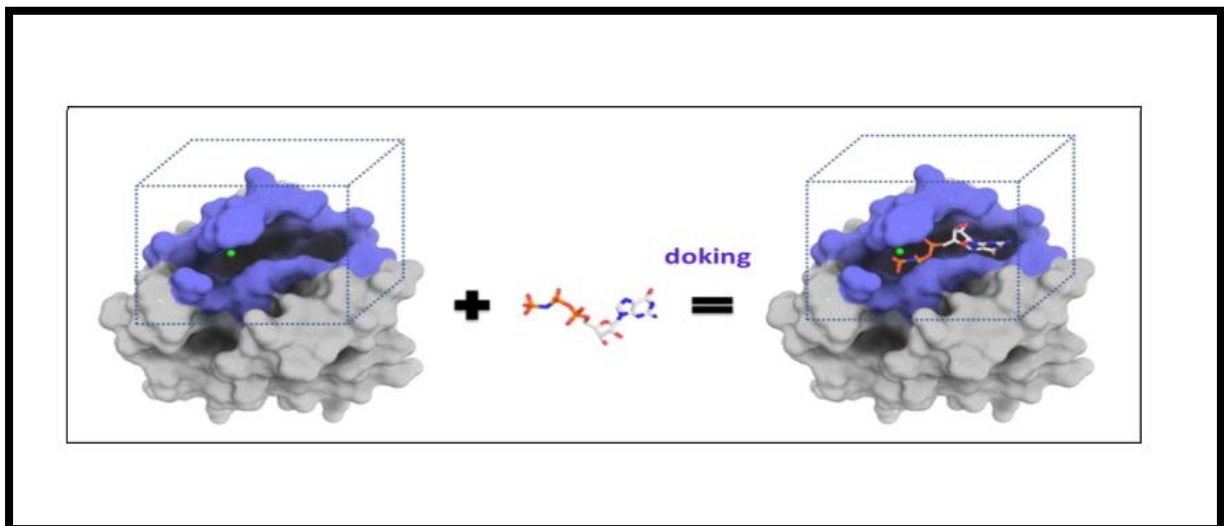


Figure N°07 : Représentation schématique du docking moléculaire

2. Types de docking moléculaire

Le docking peut être classé en docking rigide, flexible et semi-flexible

2.1 Docking rigide

Le ligand et la protéine sont tous les deux considérés comme étant rigides. Seuls les 6 degrés de Liberté de translation et rotation sont explorés pour le ligand, le subir des translations et rotations dans chacune des trois dimensions.

Dans ce cas, la flexibilité du ligand pourrait être abordée en utilisant un ensemble pré-calculé de Conformations de ligand, ou en permettant un degré de chevauchement atome-atome entre la protéine et le ligand [03]. Chaque pose sans clash est notée à l'aide d'une fonction de score. Les pose ayant les meilleurs scores sont affinées par le programme, qui teste les rotations et translation proches (RMSD supérieure à 0.5 Å et 0.75 Å, respectivement) [53].

D'autres programmes, tels que DOCK font aussi docking rigide. La précision de ces méthodes peut être améliorée en générant plusieurs conformés pour chaque ligand [53].

2.2 Docking flexible

Dans le docking flexible, le ligand et la protéine sont flexibles (la flexibilité du récepteur concerne les chaînes latérales des résidus du site actif). Les degrés de liberté conformationnels du récepteur peuvent être limités à certaines chaînes latérales ou bien considérer également des mouvements plus larges impliquant par exemple les différents arrangements possibles entre les domaines d'une protéine. Ce type de docking représente une approche plus réaliste il représente l'approche la plus utilisée dans la plupart des logiciels de docking car elle permet une évaluation rapide de bases de milliers de molécules.

En revanche, elle est approximative et l'exploration de l'ensemble des degrés de liberté du ligand et du récepteur implique des difficultés importantes liées au temps de calculs nécessaires pour exploiter le docking flexible efficacement. [54]

2.3 Docking semi-flexible

L'approche courante, également un compromis entre la précision et le temps de calcul, consiste à traiter le ligand comme flexible tandis que le récepteur est maintenu rigide pendant l'amarrage [55]. Ainsi, l'échantillonnage des degrés de liberté du ligand s'ajoutent aux explorations translationnelles et rotationnelles. Ce type de docking repose sur l'hypothèse sommaire que la conformation du récepteur utilisée est apte à reconnaître le ligand [54].

3. Outils de docking moléculaire

Les éléments essentiels pour effectuer un docking moléculaire se limitent aux récepteurs qui sont des macromoléculaires appelées cibles, un ligand et un programme de docking qui prédit la conformation la plus favorable du ligand au sein du récepteur choisi [56].

3.1 Récepteur 3D (cible)

Le récepteur cellulaire est une molécule naturellement présente sur les cellules, c'est une protéine de la membrane cellulaire ou du cytoplasme ou du noyau cellulaire qui se lie spécifiquement à un facteur spécifique (un ligand, tels un neurotransmetteur, une hormone, une molécule médicamenteuse, une toxine, un ion calcium, ou une protéine), induisant une réponse cellulaire à ce ligand. [56]

La plupart des structures protéiques sont disponibles via la PDB "Protein Data Bank". C'est la plus grande base de données de structures 3D de macromolécules Biologique tels que protéine, ADN, ARN...etc [08]. La PDB a été créé en 1971 au laboratoire national de Brookhaven. Actuellement, la PDB compte plus de 152.000 structures macromoléculaires biologiques dont plus de 141 000 sont des protéines [56].

Il est important de signaler que certaines protéines ne sont pas encore disponibles dans cette base de données, il devient alors possible de construire la structure 3D de la cible souhaitée, en faisant appel à la modélisation par homologie [56].

3.2 Ligands 3D (Chimiothèques)

Le ligand est un messenger chimique libéré par une cellule pour signaler soit elle-même, soit une autre cellule. La liaison entraîne un effet cellulaire, qui se manifeste par un certain nombre de changements dans cette cellule, y compris la modification de la transcription ou de la traduction du gène ou la modification de la morphologie cellulaire. [57]

Le choix du ligand est une étape très importante pour un docking moléculaire réussi. Dans ce cadre, les ligands doivent être sous forme 3D. Pour y arriver, il y a deux méthodes :

Le premier : consiste à utiliser des ligands du pdb ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....) grâce à des logiciels de construction moléculaires tels que Titan

La deuxième méthode est souvent d'aspect commercial consistant à consulter des bases de données de structures chimiques appelées chimiothèques. Parmi les chimiothèques virtuelles nous citons : les Chimiothèque nationale Française, PubChem, Zinc ... [58].

3.3 Programmes (Logiciels)

Dans le domaine de docking moléculaire, plusieurs logiciels ont été utilisés pour étudier les différentes interactions existantes entre deux entités moléculaires (protéine-ligand). À l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking sont disponibles que ce soit commerciaux ou libres [59]. Tels que: GOLD, AUTODOCK, AUTODOCK VINA, FLEXX, SURFLEX, UCSF CHIMERA et Arguslab (TableauN°4).

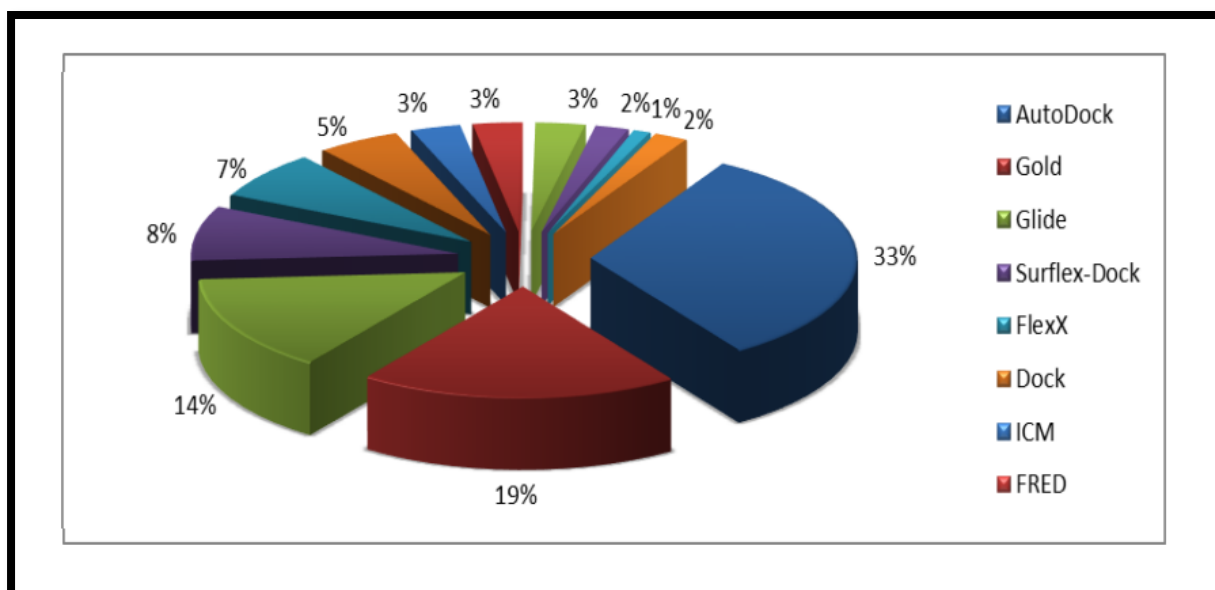


Figure N°08 : Utilisation des différents logiciels de docking en 2010-2011.

Tableau N° 04 : Principaux programmes de docking moléculaire.

Nom	Editeur	Site Internet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred Open	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

Matériel et méthodes

Matériels et Méthodes

L'objectif essentiel de notre travail de master est une initiation aux approches de Modélisation par docking moléculaire. Pour ce faire, nous avons utilisé le matériel suivant :

1. Matériels :

1.1. Micro-ordinateur

Dans notre étude nous avons utilisé un micro-ordinateur avec une mémoire de 16GB, un processeur (AMD core Ryzen 5 3400g CPU 3.5GHZ) et un système d'exploitation windows 11.

1.2 Logiciels (programmes)

Nous avons fait appel à plusieurs programmes pour réaliser le présent travail :

1.2.1 argusLab

ArgusLab est un logiciel distribué gratuitement pour la plate-forme Windows, couramment utilisé comme progiciel d'introduction à la modélisation moléculaire, en particulier dans le milieu universitaire. Il dispose d'une interface conviviale et de menus de calcul intuitifs. Le moteur d'amarrage se rapproche d'une méthode de recherche exhaustive. Il nécessite un fichier au format PDB pour le ligand et le récepteur.

1.2.2 ChemSketch

ChemSketch est un logiciel gratuit de modélisation moléculaire utilisé pour dessiner des structures moléculaires complexes en 2D ou en 3D et pour modifier des images de structures chimiques.

1.2.3 Chem3D

Chem3D est un outil de visualisation et de partage de structures tridimensionnelles (3D) de molécules et d'optimisation moléculaire. Il est construit sur une puissante plateforme de représentation 3D

1.2.4 Discovery Studio

Discovery Studio est une suite de logiciels pour stimuler les systèmes de petites molécules et macromolécules. Il couvre la simulation, la conception de ligands, la modélisation de pharmacophore et la conception basée sur la structure, QSAR et ADMET.

1.3 Banques de données

1.3.1. « PDB » (Protein Data Bank)

La Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) est l'unique archive mondiale des données structurales des macromolécules biologiques. Il est considéré comme une collection de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) des macromolécules biologiques telles que les protéines essentiellement et les acides nucléiques.

1.3.2 PubChem

C'est une banque de donnée américaine de molécules chimiques gérée par NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Elle répertorie plusieurs millions de composés, principalement des petites molécules, mais également des molécules plus grandes telles que les nucléotides, les glucides, des lipides, les peptides et les macromolécules. Cette base nous a été utile afin d'obtenir des similaires structuraux de notre ligand de base.

2. Methodes

2.1 Préparation de la protéine

La structure tridimensionnelle de notre protéine FnBPs a été téléchargé via protein data bank (PDB)

Le code PDBID «1FNF» fragment de fibronectine humain comprenant les répétitions de 7 à 10 de type III, la protéine a été résolu par cristallographie au rayon X avec une résolution de 2 Angström

2.2 Préparation du ligand

Dans un premier temps nous avons téléchargé le ligand à partir de la plateforme pubchem sous forme 2D ensuite, nous avons utilisé le logiciel chemsketch pour modéliser notre ligand.

3. Le docking moléculaire

Le docking moléculaire est réalisé pour déterminer l'affinité de liaison et prédire les interactions intermoléculaires des molécules (protéine –ligand), cette étape a été réalisée en utilisant le ligand et la protéine au format pdb, notre recherche est basée sur les structures cristallines du domaine C de la protéine FnBPs staphylococcique étudié avec la vitamine C.

Le code utilisé pour le docking a été téléchargé à partir du Banque de données protéiques (PDB ID : 1FNF) sous forme PDB Les molécules d'eau sont retirées, le site actif de la protéine a été déterminé.

Les étapes de notre dépistage virtuel sont les suivant :

- Sélection et préparation de la protéine
- Sélection et préparation du ligand
- Docking moléculaire
- Analyse post-docking

Calcul des grilles de potentiel

Après la préparation des molécules pour le docking (ligand et binding site de la protéine). La protéine FnBPs a été plongée dans une grille tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéine FnBPs et permettant la libre rotation du ligand dans ce site. Le centre de cette boîte est déterminée par les coordonnées ($X=40\text{Å}$, $Y=40\text{Å}$, $Z=60\text{Å}$)

Interaction ligand protéine

La visualisation des interactions entre la vitamine C et la protéine FnBPs de la meilleure pose a été réalisé par Discovery Studio.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Les 5 Règles de LIPINSKI

Chaque ligand doit de se conformer à plusieurs critères de base, tel que son faible coût de production, sa solubilité, son stabilité. Il doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité. Dans ce contexte, l'évaluation de la biodisponibilité de notre ligand a été réalisée à l'aide du Molinspiration Checker. Sur la base de cette évaluation, on a étudié la réponse de la vitamine C aux règles de Lipinski.

Les paramètres suivants ont été calculés :

1. Une masse moléculaire inférieure à 500 daltons
2. Un coefficient de partition (logP) ou une lipophile ($-2 \leq \log P \leq 5$).
3. Le nombre de donneurs de liaisons Hydrogène pas plus de 5.
4. Le nombre d'accepteurs de liaisons Hydrogène maximum 10.
5. Nombre d'angles de rotations ≤ 5 .

L'application des règles de LIPINSKI sur notre ligand donnent les résultats consignés dans le tableau 5 :

Tableau N° 05 : : L'application des règles de LIPINSKI sur la vitamine C

Ligand	LogP	PSA	Nactoms	MW	nON	Nohnh	nviolation	nrot
Vitamine C	-1.40	170.22	12	176.12	6	4	0	2

Nos résultats montrent que notre ligand répond parfaitement à la règle de LIPINSKI. Pour cela, nous nous attendons à une bonne interaction même sans optimisation du ligand (tableau 5).

2. Le docking moléculaire

La reconstruction du ligand vitamine C par docking moléculaire avec « ArgusLab » montre 150 poses avec un meilleur score avec un ΔG égale à -6.56802 Kcal/mol. Ce score résulte de la mise en place des liaisons hydrogène lors de la formation de ce composé dans la cavité catalytique de la protéine (figure 12, 13). En Effet, les liaisons hydrogènes sont formée avec les acides aminés avec une distance comprise entre 1,84572 Å et 2,37902 Å (Tableau 8), ces résidus du site active de FnBPs sont : Arg1493, Arg1445, Gly1494, Lys1324, Arg1403, Arg1371, Phe1366, Ser1367 et Gly1368

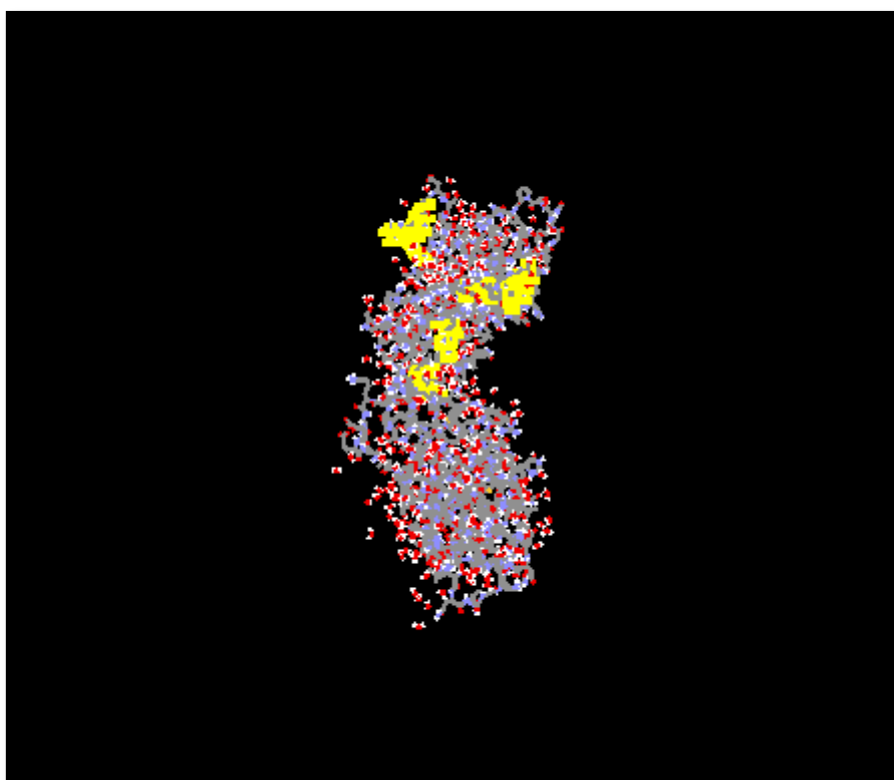


Figure N°09 : Binding site sur ArgusLab

Le programme nous a donné 150 poses, nous avons choisi la pose 1 qui était la plus importante avec une énergie de -6.56802 kcal/mol. Les 10 meilleurs résultats sont montres dans le (tableau 6)

Tableau N° 06 : Les poses de ligand

Pose 1	-6.56802
Pose 2	-6.50183
Pose 3	-6.37257
Pose 4	-6.30471
Pose 5	-6.28464
Pose 6	-6.28156
Pose 7	-6.28156
Pose 8	-6.24117
Pose 9	-6.21076
Pose 10	-6.20253

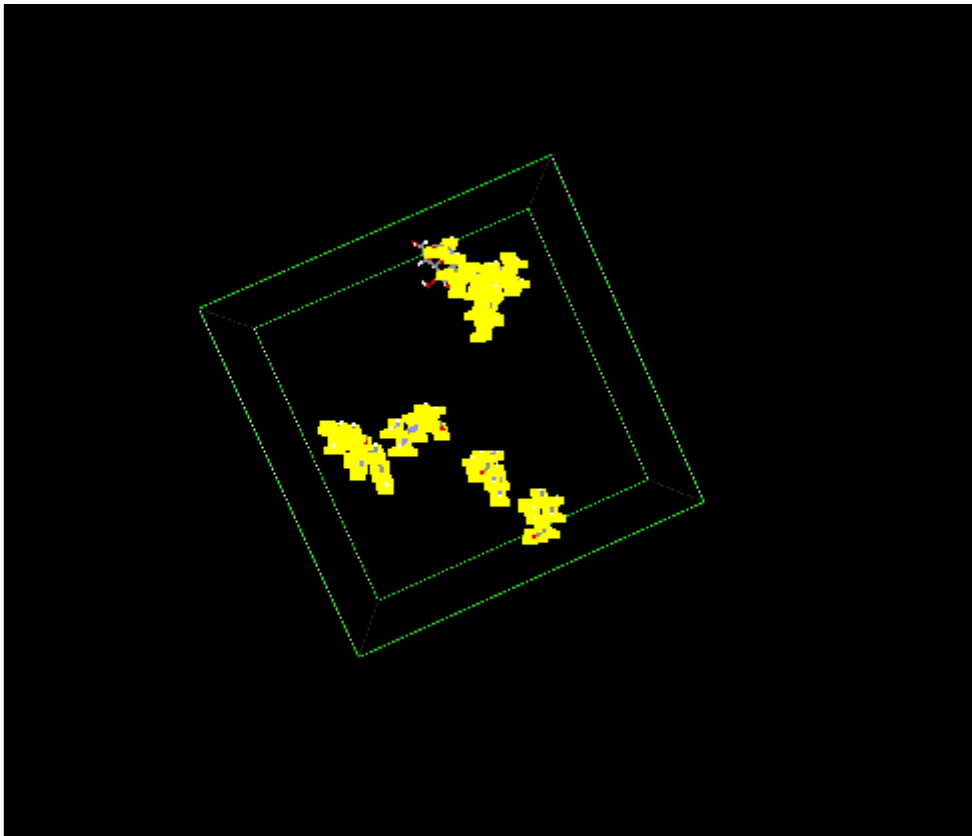


Figure N°10 : Binding site Bounding Box

Nous avons rempli les cases de Bounding Box de site actif (X = 40 , Y = 40 , Z =60)

Tableau N° 07 : Calcul de docking protéine- ligand

Box	Docking énergie	Type de ligand
X :40 Y :40 Z :60	ArgusDock	Semi-flexible

3. Interaction entre la vitamine C et la protéine FnBPs

Le complexe 1FNF avec l'énergie de Score la plus basse (-6.56802 kcal/mol) a formé 4 interactions avec notre ligand.

Des interactions hydrogènes sont formées avec les acides aminés suivants : SER1496:HN avec une distance de 1,98 Å , SER1496:O avec une distance de 2,19 Å, GLY1494:HA1 avec une distance 2,37 Å, ainsi que le ARG1493:O avec une distance de 1,84 Å voir le (Tableau 8), ces interactions suggèrent que la vitamine C pourrait avoir un effet sur la protéine A staphylococcique.

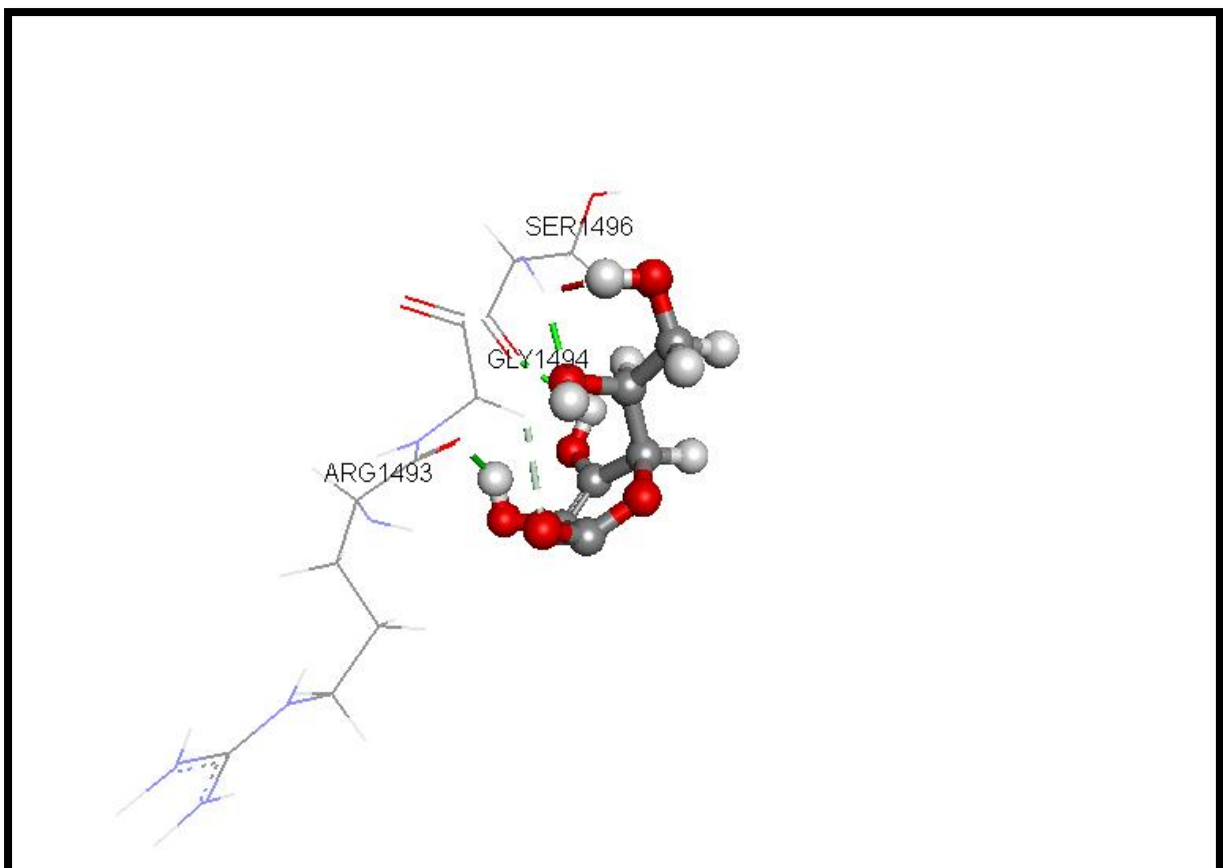


Figure N°11 : Interaction du ligand avec la protéine

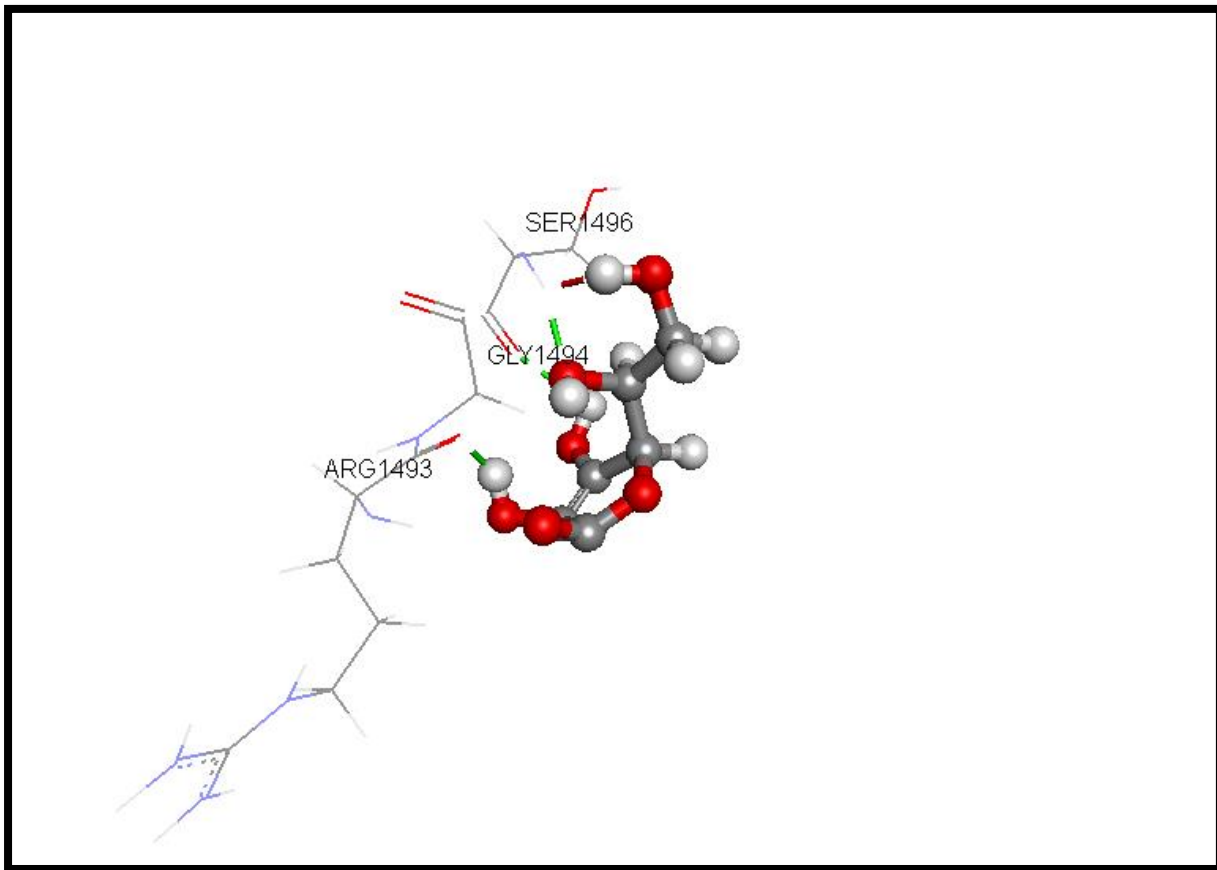


Figure N°12 : Interaction hydrogène classique

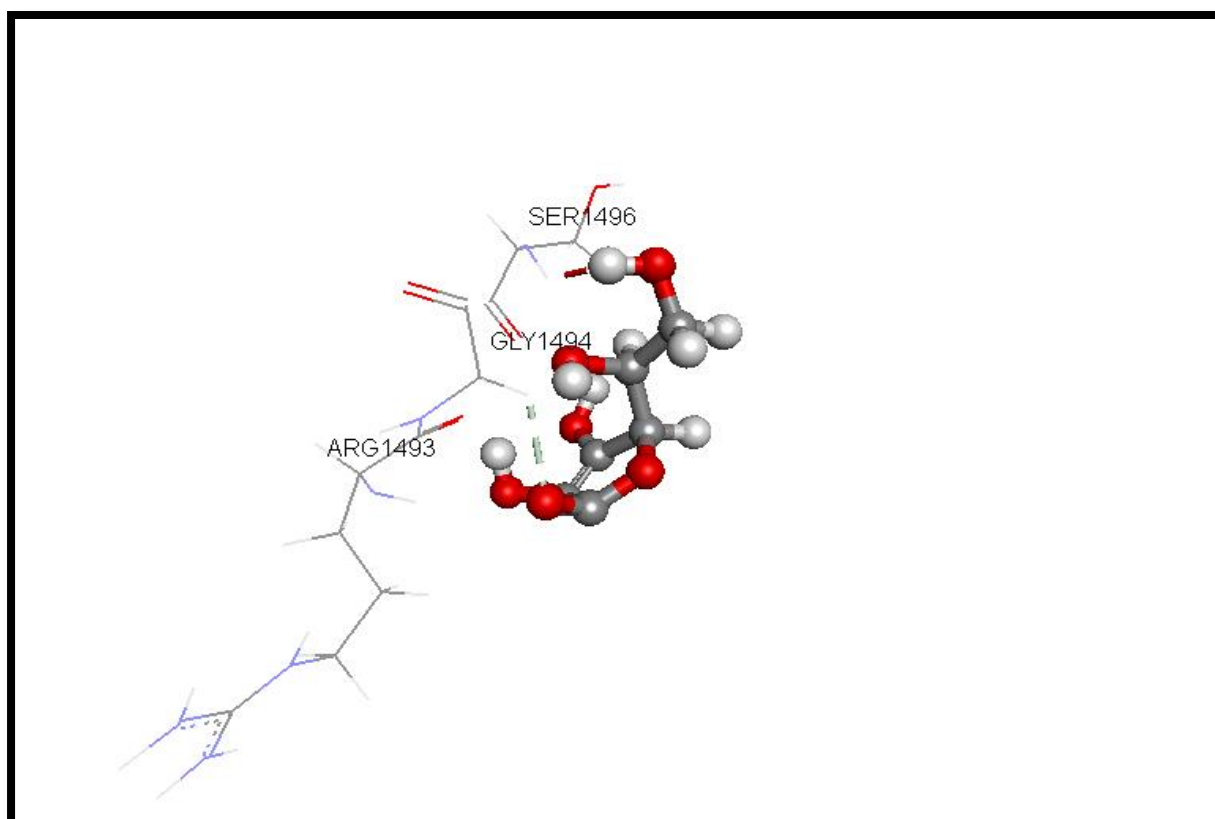


Figure N°13 : Interaction hydrogène non classique

Tableau N° 08 : Types de liaisons établies entre la protéine et le ligand

Molécule	Interaction hydrogène	
	Involved residu	Distance (Å)
Vitamine C	SER1496:HN	1,98112
	SER1496:O	2,19359
	GLY1494:HA1	2,37902
	ARG1493:O	1,84572

Conclusion

Le travail présenté dans ce mémoire concerne principalement l'utilisation de plusieurs approches théoriques de la modélisation moléculaire à fin de prédire les interactions existantes entre la vitamine C et la protéine FnBPs staphylococcique, une modélisation par docking moléculaire a été faite, ensuite une révélation des interactions par le logiciel Discovery Studio, les 4 interactions obtenues sont de types hydrogènes classique et non classique.

Ces résultats montrent que la vitamine C bloque l'entrée de la bactérie en se lient avec son récepteur.

Références

Références

- [1] "Vitamine-C-Estelle-Schwartz-2016.pdf." Accessed: May 15, 2022. [Online]. Available: <http://www.scc-quebec.org/wp-content/uploads/2017/08/Vitamine-C-Estelle-Schwartz-2016.pdf>
- [2] S. Nesrine, T. Kociela, F. Sofiane, H. Tewfik, and T. Lamia, "Simulation du procédé de préparation du sirop vitamine C sous Aspen Plus," p. 107.
- [3] "BOUDALIA.pdf." Accessed: May 16, 2022. [Online]. Available: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/12240/1/BOUDALIA.pdf>
- [4] "document.pdf." Accessed: May 16, 2022. [Online]. Available: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00585438/document>
- [5] "BOUCHACHIA.pdf." Accessed: May 17, 2022. [Online]. Available: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/12283/1/BOUCHACHIA.pdf>
- [6] "12095254.pdf." Accessed: May 17, 2022. [Online]. Available: <https://core.ac.uk/download/pdf/12095254.pdf>
- [7] "Vitamine C - Carences et surdosage," Figaro Santé. <https://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/nutrition-nutriments/vitamine-c/carences-surdosage> (accessed May 18, 2022).
- [8] "Vitamine C - Bienfaits, Carence, Vertus, Effets Secondaires - Nutrimea." <https://www.nutrimea.com/fr/99-vitamine-c> (accessed May 18, 2022).
- [9] C. Lays, "ARN régulateurs de Staphylococcus aureus: Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques," p. 222.
- [10] "Pr_valence_de_Staphylococcus_aureus_responsables_des_infections_cutan_e_s_dans_la_Wilaya_de_T_bessa.pdf."
- [11] Trouillet (2011) . Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis. Mémoire : Minister de l'enseignement supérieur et de la recherche école pratique des hautes études : p 102.

- [12] http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2001/BisognanoC/these_body.html (accessed May 21, 2022).
- [13] “M_moire_Master_Louaar_Khaoula_2020.pdf.”
- [14] Le Loir, Y.L. and M. Gautier. 2010. *Staphylococcus aureus*. Monographies de microbiologie.
- [15] “FINAL_AISSOU_Meriem___BOUSNANE_Nour_el_houda.pdf.”
- [16] Nelea, V., Nakano, Y. & Kaartinen, M.T., 2008. Size distribution and molecular associations of plasma fibronectin and fibronectin crosslinked by transglutaminase 2. *The Protein Journal*, 27(4), p.223-233.
- [17] Erickson, H.P., Carrell, N. & McDonagh, J., 1981. Fibronectin molecule visualized in electron microscopy: a long, thin, flexible strand. *The Journal of Cell Biology*, 91(3), p.673-678.
- [18] Pelta, J. et al., 2000. Statistical Conformation of Human Plasma Fibronectin. *Biochemistry*, 39(17), p.5146-5154.
- [19] Cheung, A. L., Koomey, J. M., Butler, C. A., Projan, S. J., and Fischetti, V. A. (1992). Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a Locus (Sar) distinct from agr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6462–6466. doi: 10.1073/pnas.89.14.6462
- [20] Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12, 3967–3975. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb06074.x
- [21] Saravia-Otten, P., Müller, H. P., and Arvidson, S. (1997). Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by Agr and an Agr-independent mechanism. *J. Bacteriol.* 179, 5259–5263. doi: 10.1128/jb.179.17.5259-5263.1997
- [22] Signäs, C., Raucci, G., Jönsson, K., Lindgren, P. E., Anantharamaiah, G. M., and Höök, M. (1989). Nucleotide Sequence Of The Gene For A Fibronectin-Binding

Protein From *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 699–703. doi: 10.1073/pnas.86.2.699

[23] Peacock, S. J., Day, N. P., Thomas, M. G., Berendt, A. R., and Foster, T. J. (2000). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in Fnb genes and adhesion to human fibronectin. *J. Infect.* 41, 23–31. doi: 10.1053/jinf.2000.0657

[24] Morrison, P.R. Edsall, J.T. & Miller, S.G., 1948. Preparation and properties of serum and plasma proteins; the separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *Journal of the American Chemical Society*, 70(9), p.3103-3108

[25] Hynes, R.O. & Yamada, K.M., 1982. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*, 95(2Pt1), p.369-377.

[26] Tamkun, J.W. & Hynes, R.O., 1983. Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(7), p.4641-4647.

[27] Mao, Y. & Schwarzbauer, J.E., 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology*, 24(6), p.389-399.

[28] Stoffels, J.M.J. et al., 2013. Fibronectin aggregation in multiple sclerosis lesions impairs remyelination. *Brain*, 136(1), p.116-131.

[29] Mempel, M., Schnopp, C., Hojka, M., Fesq, H., Weidinger, S., Schaller, M., et al. (2002). Invasion of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death. *Br. J. Dermatol.* 146, 943–951. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04752.x

[30] Sinha, B., François, P. P., Nüsse, O., Foti, M., Hartford, O. M., Vaudaux, P., et al. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cell Microbiol.* 1, 101–117. doi: 10.1046/j.1462-5822.1999.00011.x

- [31] Edwards, A. M., Potts, J. R., Josefsson, E., and Massey, R. C. (2010). *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog.* 6:e1000964. doi: 10.1371/journal.ppat.1000964
- [32] Vaudaux, P., Francois, P., Bisognano, C., Kelley, W. L., Lew, D. P., Schrenzel, J., et al. (2002). Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect. Immun.* 70, 5428–5437. doi: 10.1128/iai.70.10.5428-5437.2002
- [33] Liang, X., Garcia, B. L., Visai, L., Prabhakaran, S., Meenan, N. A. G., Potts, J. R., et al. (2016). Allosteric regulation of fibronectin/ $\alpha 5\beta 1$ interaction by fibronectin-binding MSCRAMMs. *PLoS One* 11:e0159118. doi: 10.1371/journal.pone.0159118
- [34] Hauck, C. R., and Ohlsen, K. (2006). Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 5–11. doi: 10.1016/j.mib.2005.12.002
- [35] Ozeri, V., Rosenshine, I., Mosher, D. F., Fassler, R., and Hanski, E. (1998). Role of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol. Microbiol.* 30, 625–637. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01097.x
- [36] Zuo, Q. F., Cai, C. Z., Ding, H. L., Wu, Y., Yang, L. Y., Feng, Q., et al. (2014). Identification of the immunodominant regions of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *PLoS One* 9:e95338. doi: 10.1371/journal.pone.0095338
- [37] Ma, J., Wei, Y., Zhang, L., Wang, X., Yao, D., Liu, D., et al. (2018). Identification of a novel linear B-cell epitope as a vaccine candidate in the N2N3 subdomain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *J. Med. Microbiol.* 67, 423–431. doi: 10.1099/jmm.0.000633
- [41] Lee J.O., Bankston L.A., Arnaout M.A., Liddington R.C. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): A pathway for activation? *Structure.* 1995;3:1333–1340. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00271-4.
- [42] Aota S., Nomizu M., Yamada K.M. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* 1994;269:24756–

- [43] Obara M., Kang M.S., Yamada K.M. Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: Separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell*. 1988;53:649–657.
- [45] Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010;339:269–280. doi: 10.1007/s00441-009-0834-6.
- [46] Lau T.L., Kim C., Ginsberg M.H., Ulmer T.S. The structure of the integrin α 5 β 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J*. 2009;28:1351–1361. doi: 10.1038/emboj.2009.63.
- [47] Shattil S.J., Kim C., Ginsberg M.H. The final steps of integrin activation: The end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2010;11:288–300. doi: 10.1038/nrm2871.
- [48] Kim C., Ye F., Ginsberg M.H. Regulation of integrin activation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 2011;27:321–345. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104104.
- [49] Pouwels J., Nevo J., Pellinen T., Ylanne J., Ivaska J. Negative regulators of integrin activity. *J. Cell. Sci*. 2012;125:3271–3280. doi: 10.1242/jcs.093641.
- [50] Valdembri D., Caswell P.T., Anderson K.I., Schwarz J.P., König I., Astanina E., Caccavari F., Norman J.C., Humphries M.J., Bussolino F., et al. Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates α 5 β 1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol*. 2009;7:e25. doi: 10.1371
- [51] Lucido, M. J.; Orlando, B. J.; Vecchio, A. J.; Malkowski, M. G. *J. Biochemistry* 2016, 55, 1226–1238
- [52] kenza EHS. Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. 2016.
- [53] Khan, Y. S.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Åqvist, J. ; *J. Biochemistry* 2018, 57, 1236–1248.
- [54] Chevrollier, N. ; Thèse « Développement et application d'une approche de docking par fragments pour modéliser les interactions entre protéines et ARN simple-brin », Université Paris Sud, 2019.
- [55] Meng, X.Y.; Zhang, H.X.; Mezei, M.; Cui, M.; *Curr Comput Aided Drug* 2011, 7, 146.
- [56] ZEMOURI Rania DA. Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de l'ADAMTS-5 pour le traitement de l'arthrose. . 2019.

[57]: PDB. Protein Data Bank [Available from: <https://www.rcsb.org/>].

[58] Mokrani EL. H. Contribution à l' amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Mémoire du magister d'Université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine-1. Algérie. 2012. 75p.

[59] Grosdidier A. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat d'université : Pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier-Grenoble. France. 2007. 90p.