

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABOU BEKR BELKAID-Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Mémoire en vue de l'obtention
Du diplôme de Master en Biologie
Option Biologie Moléculaire et cellulaire
Thème

Inhibition du transporteur de cholestérol intracellulaire
ORP1-ORD dans la thérapie anticancéreuse

Présenté par :

✎ M^{elle} ABED BERRACHED Aya

✎ M^{elle} BELKENADIL Saliha

Soutenu le : 05/ 06 /2024

Soutenu devant le jury :

Présidente	Mme. BENMANSOUR Meriem	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme. BERRAHOUI Samira	MCB	Université de Tlemcen
Encadreur	Mme. MEDJATI Nouria	Pr.	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2023/2024

Dédicaces

Je remercie dieu, la force qui guide mes pas, la lumière qui éclaire mon chemin, et la source de tout ce qui est bon dans ma vie.

À mes parents, les héros de mon histoire, dont l'amour inébranlable et les sacrifices ont façonné mon être et m'ont donné les bases pour grandir et prospérer. Je prie Dieu de vous protéger de vous procurez santé, bonheur, et longue vie inchallah. J'espère avoir exaucé vos vœux.

À mon frère, mon compagnon d'aventure, dont la présence et le soutien inconditionnel ont été un roc sur lequel je peux toujours m'appuyer, quelles que soient les tempêtes de la vie.

À mes collègues et les amis précieux, dont l'énergie et le dévouement enrichissent mes journées de travail et rendent chaque défi surmontable.

Belkenadil Saliha

إِهْدَاء

بعد مسيرة دراسية دامت سنوات حملت في طياتها الكثير من الصعوبات والمشقة والتعب ها
أنا اليوم أقف على عتبة تخرجي اقطف ثمار تعبي وأرفع قبعتي بكل فخر، فاللهم لك الحمد
قبل أن ترضى ولك الحمد إذا رضيت ولك الحمد بعد الرضا، لأنك وفقتني على إتمام هذا
العمل وتحقيق حلمي..

أهدي هذا النجاح إلى:

الذي زين اسمي بأجمل الألقاب، من دعمني بلا حدود وأعطاني بلا مقابل، ومن علمني أن
الدنيا كفاح وسلاحها العلم والمعرفة، إلى من غرس في روحي مكارم الأخلاق داعمي الأول
في مسيرتي وسندي وقوتي وملأني بعد الله... إلى فخري واعتزازي.....والذي
إلى من جعل الله الجنة تحت أقدامها واحتضنني قلبها قبل يدها وسهلت لي الشدائد بدعائها إلى
القلب الحنون والشمعة التي كانت لي في الليالي المظلمات سر قوتي ونجاحي ومصباح دربي
إلى وهج حياتي والدتي.

إلى ضلعي الثابت وأمان أيامي إلى ملهمي نجاحي من شددت عضدي بهم فكانوا لي يناييع
أرتوي منها إلى خيرة أيامي وصفوتها إلي قرة عيني.... أخواتي.

لكل من كان عوناً وسنداً في هذا الطريق.. أهدىكم هذا الإنجاز وثمره

نجاحي الذي لطالما تمنيته ها أنا اليوم أتممت أول ثمراته راجية من الله تعالى أن ينفعني بما
علمني وأن يعلمني ما أجهل ويجعله حجة لي لا علي

عابد براهيم آية

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné durant toutes ces années, la santé, le courage et la foi en nous même pour pouvoir avancer et mener nos études à leurs termes. Tout d'abord, nous souhaitons exprimer nos sincères remerciements à notre encadrant, Mme 'Medjati Nouria', pour avoir rempli parfaitement son rôle et pour les orientations précieuses dont elle nous a fait part. Nous lui sommes grandement redevables pour la confiance qu'elle nous a accordée, ainsi que pour ses encouragements et ses précieux conseils.

Nous souhaitons également adresser nos remerciements les plus sincères à Mme. Benmansour Meriem, pour avoir gracieusement accepté de présider le jury.

Nos remerciements s'adressent également à Mme. Berrahoui Samira, membre du jury, qui nous a fait l'honneur d'examiner ce mémoire.

Nous souhaitons exprimer toute notre gratitude à Melle Mkhelfi Ikeram, pour son aimable assistance et sa contribution inestimable à la préparation de ce mémoire. Nous lui adressons nos vœux les plus sincères de réussite dans son parcours académique et professionnel.

Nous exprimons également notre profonde gratitude envers tous nos enseignants du département de biologie ainsi que tous les enseignants qui ont contribué à notre formation depuis notre première année universitaire. Leur expertise, leur dévouement et leurs efforts ont

Joué un rôle essentiel dans notre développement académique.

Nous ne pouvons oublier de mentionner nos amis: Abdelkader et Ismain.

Un dernier remerciement s'adresse encore à toutes les autres personnes qui nous ont encouragés et qu'il serait trop long d'énumérer ici.

Résumé :

Objectif : le transporteur de cholestérol ORP1 agit en tant que capteur de cholestérol ancré dans un endosome/lysosome tardif qui peut également déplacer le mouvement bidirectionnel du cholestérol à l'interface entre le réticulum endoplasmique et l'endosome /lysosome tardif. Les protéines de transport du cholestérol sont souvent fortement exprimées dans les cancers, d'où la nécessité d'inhiber ces transporteurs. Des antifongiques de la famille des azolés ont montré une efficacité dans la thérapie de certains types de cancer, sans que leurs mécanismes d'action soient clairement définis. Dans ce travail, on s'est proposé d'inhiber le transport du cholestérol en liant ces antifongiques à l'ORP1-ORD, en utilisant la méthode d'amarrage moléculaire.

Méthode : La structure cristallographique tridimensionnelle d'ORP1-ORD a été téléchargée à partir du site Web PDB (Protein Data Bank). L'amarrage moléculaire a été réalisé à l'aide du programme AUTODOCK VINA, intégré dans le logiciel UCSF Chimera pour étudier in silico l'interaction du kétoconazole, fluconazole et de l'itraconazole avec la protéine cible ; les résultats de l'énergie de liaison ont été exprimés en(kcal/mol).

Résultats : Notre étude a démontré que le kétoconazole est le meilleur candidat en tant qu'inhibiteur potentiellement actif de la protéine ORP1-ORD pour le traitement anticancéreux par rapport au fluconazole et à l'itraconazole.

Motsclés: ORP1-ORD, l'amarrage moléculaire, itraconazole, fluconazole, kétoconazole, cancer.

Abstract:

Objective: The ORP1 cholesterol transporter acts as a cholesterol sensor anchored in a late endosome/lysosome that can also move cholesterol bi directionally at the interface between the endoplasmic reticulum and the late endosome / lysosome. Cholesterol transport proteins are often highly expressed in cancers, hence the need to inhibit these transporters. Antifungal agents of the azole family have shown efficacy in the therapy of certain types of cancer, without their mechanisms of action being clearly defined. In this work, we proposed to inhibit cholesterol transport by binding these antifungals to ORP1-ORD, using the molecular docking method.

Method: The three-dimensional crystal ographic structure of ORP1-ORD was downloaded from the PDB (Protein Data Bank) website. Molecular docking was performed using the AUTODOCK VINA programme, integrated into the UCSF Chimera software to study in silico the interaction of three antifungal drugs (ketoconazole, fluconazole and itraconazole) with the target protein; binding energy results were expressed in (kcal/mol).

Results: Our study demonstrates that ketoconazole is the best candidate as a potentially active inhibitor of the ORP1-ORD protein for cancer treatment compared with fluconazole and itraconazole.

Key words: ORP1-ORD, molecular docking; itraconazole; fluconazole; ketconazole; cancer.

الملخص:

الهدف: يعمل ناقل الكوليسترول ORP1 كناقل للكوليسترول كمستشعر للكوليسترول مثبت في الإندوسوم/الجسيم الإندوبلازمي المتأخر الذي يمكنه أيضًا تحويل الحركة ثنائية الاتجاه للكوليسترول في الواجهة بين الشبكة الإندوبلازمية والإندوسوم/الجسيم الإندوبلازمي المتأخر. غالبًا ما يتم التعبير عن بروتينات نقل الكوليسترول بشكل كبير في السرطانات، ومن هنا تأتي الحاجة إلى تثبيط هذه الناقلات. أظهرت العوامل المضادة للفطريات من عائلة الأزول فعالية في علاج أنواع معينة من السرطان، دون تحديد آليات عملها بوضوح. في هذا العمل، اقترحنا في هذا العمل تثبيط نقل الكوليسترول عن طريق ربط هذه المضادات الفطرية بـORP1-ORD، باستخدام طريقة الالتحام الجزيئي.

الطريقة: تم تنزيل التركيب البلوري ثلاثي الأبعاد ل ORP1-ORD من موقع PDB (بنك بيانات البروتين). تم إجراء الإرساء الجزيئي باستخدام برنامج AUTODOCK VINA، المدمج في برنامج UCSF Chimera لدراسة تفاعل ثلاثة أدوية مضادة للفطريات (كيتوكونازول و فلوكونازول وإيتراكونازول) مع البروتين المستهدف في السيليكو؛ وتم التعبير عن نتائج طاقة الارتباط بوحدة (كيلو كالوري/مول).

النتائج: أظهرت دراستنا أن الكيتوكونازول هو أفضل مرشح كمثبط نشط محتمل لبروتين ORP1-ORD للعلاج المضاد للسرطان مقارنةً بالفلوكونازول والإيتراكونازول.

الكلمات المفتاحية: ORP1-ORD، الالتحام الجزيئي، إيتراكونازول، فلوكونازول، كيتوكونازول، السرطان.

Liste des figures

Figure 01: Mécanismes possibles des ORP.....	5
Figure 02: Structure de la cible 5ZM5.....	10
Figure-03: Structure des trois ligands.....	14
Figure 04: Interaction 2D du kétoconazole avec l'ORP1-ORD.....	17
Figure 05: Interaction 2D du fluconazole avec l'ORP1-ORD	18
Figure 06: Interaction 2D de l'itraconazole avec l'ORP1-ORD.....	19

Liste des tableaux

Tableau 01: Coordonnées et énergies de liaison des trois ligands amarrés à l'ORP1-ORD....	13
Tableau 02: Interactions des 3 ligands ancrés au site de liaison de l'ORP1-ORD.....	16

Table des matières

Résumé.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des tableaux.....	II
Table des matières.....	III
Liste des abréviations.....	IV

Chapitre I: Introduction

1. Introduction.....	1-8
----------------------	-----

Chapitre II: Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes.....	10
2.1 Préparation de la protéine.....	10
2.2 Téléchargement des ligands.....	11
2.3 L'amarrage moléculaire.....	11
2.4 Identification des interactions.....	11

Chapitre III: Résultats et discussion

3. Résultats.....	13
3.1 Études d'amarrage.....	13
3.2 Interaction des ligands et modes de liaisons au transporteur.....	15
3.3 Discussions.....	20
Conclusion.....	23
Références bibliographiques.....	25

Liste des abréviations

ES: Les effets secondaires

RT: Radiothérapie

EIOI: Evénement indésirable d'origine immunitaire

ORP: OSBP related proteins

OSBP: Oxysterol-binding protein

START: StAR-related lipid transfer

MCS: Sites de contact membranaire

VAP: Protéines associées aux protéines membranaires associées aux vésicules

PH: Homologie pleckstrine

ANK: Répétition d'ankyrine

FFAT: Di Phénylalanine dans un tractus acide

LEL: Endosome/lysosome tardif

RE: Réticulum endoplasmique

PI4P: Phosphatidylinositol-4-phosphate

MVB: Multivesicular Bodies

PI (4,5) P2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PI (3,4) P2: Phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate

ORP1L: Oxysterol-binding protein-related protein 1L

VAP-A: Vesicle-associated membrane protein-associated protein A

RILP: Rab-interacting lysosomal protein

PDB: Protein Data Bank

ΔG : La variation de l'énergie libre de Gibbs

Chapitre I :

Introduction

Le cancer se caractérise par la prolifération de cellules qui parviennent à échapper aux mécanismes centraux de contrôle endogène. Les cancers sont regroupés en fonction de l'organe ou du tissu dont ils proviennent, mais de plus en plus également en fonction des caractéristiques moléculaires des cellules cancéreuses respectives. Grâce aux progrès technologiques rapides de ces dernières années, il est désormais possible d'analyser en détail la composition moléculaire de différents types de cancer dans un court laps de temps. Les connaissances accumulées sur l'initiation et la progression du cancer peuvent être utilisées pour développer des diagnostics plus précis et des thérapies anticancéreuses plus efficaces et/ou moins toxiques. À long terme, l'objectif des chercheurs est d'offrir à chaque patient atteint d'un cancer une option thérapeutique la mieux adaptée à sa maladie et à sa situation [1].

Le cancer est souvent causé par des modifications de la séquence d'ADN génomique des cellules cancéreuses. Au cours du dernier quart de siècle, on a appris beaucoup de choses sur ces mutations et ces gènes anormaux responsables du cancer humain. Des séquences complètes d'ADN d'un grand nombre de gènes impliqués dans le cancer sont actuellement disponibles [2].

Différents types de traitement ont été développés en fonction de la nature de la tumeur. La chimiothérapie est un traitement bien connu et efficace pour différents cancers [3]. Elle a été inventée par le chimiste allemand Paul Ehrlich qui a étudié l'utilisation de médicaments pour traiter les maladies infectieuses [4]. Le but de la chimiothérapie est d'inhiber la prolifération cellulaire et la multiplication tumorale, évitant ainsi l'invasion et les métastases [5]. Ce traitement n'a pas été aussi efficace que prévu dans l'éradication de toutes les cellules cancéreuses [3].

Les effets secondaires (ES) provoqués par la chimiothérapie sont nombreux. Les plus courants sont les vomissements, la perte de cheveux, la bouche sèche et les troubles digestifs [6].

La chimiothérapie peut être suivie d'une radiothérapie (RT), une modalité clinique qui utilise des rayonnements ionisants pour traiter les néoplasies malignes (et parfois les maladies bénignes). Depuis sa création, l'objectif de la RT est de guérir le cancer localement sans effets secondaires excessifs [7]. Les ES sont classés comme précoces ou tardifs, les

premiers survenant pendant ou dans les semaines qui suivent la fin de la radiothérapie et les seconds se manifestant des mois, voire des années plus tard [8]. Les ES psychologiques comprennent la détresse, l'anxiété et la dépression et ne doivent pas être négligés [9].

Les ES physiques comprennent la fatigue liée au cancer, les ES cutanés, les ES de la tête et du cou, ainsi que les ES cardiaques, pulmonaires et gastro-intestinaux [9].

L'immunothérapie anticancéreuse est une approche différente. Elle consiste à modifier le système immunitaire et/ou l'utilisation de composants du système immunitaire, comme traitement du cancer. Au cours des 25 dernières années, 17 produits immunologiques ont reçu une autorisation légale basée sur leur activité anticancéreuse en tant qu'agents uniques et/ou en association avec une chimiothérapie. Entre autres : les cytokines interféron- α et interleukine-2, les anticorps monoclonaux [10].

L'inconvénient de l'immunothérapie est le risque d'événements indésirables d'origine immunitaire (EIOI). La réponse immunitaire accrue déclenchée par l'immunothérapie, qui peut commencer des semaines après le début du traitement ou se présenter des mois après la fin de la thérapie, peut amener l'organisme à attaquer ses propres tissus sains. Ces réponses immunitaires « hors cible » peuvent entraîner des événements indésirables d'origine immunitaire comme l'hépatite, la pneumonie, la colite, l'hypophysite, la dermatite, la néphrite, la pancréatite ou l'inflammation d'autres tissus [11, 12].

Dans les cancers hormono-dépendants, la thérapie repose sur des molécules qui s'opposent aux hormones surexprimées à l'origine du cancer. Les œstrogènes et/ou la progestérone peuvent promouvoir la croissance tumorale au niveau de la glande mammaire par l'intermédiaire de récepteurs. C'est pourquoi il faut empêcher leur action [13].

L'hormonothérapie ne convient qu'aux patients dont les tumeurs sont porteuses de récepteurs d'œstrogènes et/ou de progestérone. Ce sont des tumeurs dites hormono-dépendantes [13]. Les effets indésirables symptomatiques associés à l'utilisation de cette thérapie sont divers : sueurs, bouffées de chaleur sont principalement liées à un déficit important des taux d'œstrogènes, et l'une des limitations les plus fréquemment rencontrées dans la poursuite de l'hormonothérapie est l'acquisition de résistances au traitement [14].

Pour réduire les effets secondaires des différents traitements sus-cités, Une thérapie ciblée est essentielle pour améliorer la survie globale tout en réduisant les effets indésirables du traitement du cancer [15]. Les deux types de thérapies ciblées les plus courantes sont les

anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de petites molécules [16]. La thérapie par anticorps monoclonaux est devenue une modalité de traitement importante du cancer [17].

Les effets secondaires des thérapies ciblées sont moins importants que les thérapies plus générales, cependant la recherche de nouvelles molécules ayant moins d'effet sur les cellules saines est toujours en cours. Parmi ces molécules, les inhibiteurs des transporteurs du cholestérol constituent une voie de recherche prometteuse.

En effet, La transformation maligne se caractérise par la perte du mécanisme de rétro-inhibition du cholestérol qui contrôle la production de cholestérol. Le cholestérol est essentiel pour les cellules cancéreuses afin de répondre à leurs besoins en nutriments élevés et de soutenir leur croissance incontrôlée, ce qui favorise le développement et la progression des tumeurs [18]. Ainsi, une hypothèse plausible consiste à prévenir la croissance des cellules tumorales en restreignant soit la disponibilité du cholestérol, soit la production de cholestérol [19].

Au niveau intracellulaire, le cholestérol et sa distribution correcte à travers les différentes membranes sont cruciaux pour maintenir les gradients de cholestérol [20]. Les différentes voies de transport du cholestérol et même les mécanismes contrôlant leur régulation restent mal connus. Cette difficulté résulte des interconnexions entre les différents pools de cholestérol intracellulaire et de la variabilité des mécanismes qui transportent simultanément le cholestérol. Cependant, plusieurs études ont démontré le rôle concomitant de deux processus : le transport vésiculaire et le transport non vésiculaire. Dans les deux cas, le cholestérol est absorbé par les transporteurs car il ne peut pas diffuser librement dans le cytoplasme [20].

Le transport vésiculaire du cholestérol reste le processus le plus étudié. Ce mode de transport permet au cholestérol d'être transporté au sein des vésicules et nécessite l'intégrité du cytosquelette, le long duquel les vésicules se déplacent grâce à l'énergie fournie par les moteurs moléculaires et l'ATP [21]. Le transport vésiculaire est impliqué dans la voie endocytaire mais également dans la voie sécrétoire. Concernant le transport non vésiculaire, il s'agit du transfert direct du cholestérol entre deux membranes en contact proche. Pour réaliser ce transport, le cholestérol a besoin de transporteurs intracellulaires de nature protéique [20].

Il existe deux grandes familles de protéines transporteuses diffusibles :

- Les ORP (OSBP related proteins) qui regroupent l'OSBP (oxysterol-binding protein) et ses apparentées .

- Les protéines de la famille START (StAR-related lipid transfer) [20].

En raison du rôle important du cholestérol au niveau cellulaire, des agonistes et antagonistes du cholestérol sont proposés en thérapie ciblée, particulièrement ses transporteurs intracellulaires.

Il existe 12 transporteurs de cholestérol dans le corps humain [22]. Le point commun de ces protéines est qu'elles peuvent se lier aux stérols, permettant ainsi leur transport dans le cytoplasme [23]. Leur rôle est de contrôler le ciblage de différentes régions cibles [23]. Les oxystérols sont les stérols dont le transport a été le mieux étudié. Ce sont des dérivés du cholestérol qui peuvent être produits par des réactions enzymatiques et non enzymatiques, bien que leur teneur dans les cellules soit généralement très faible [24]. Les premières études sur la rétro-inhibition de la biosynthèse du cholestérol par les stérols ont montré que les oxystérols sont 50 fois plus puissants que le cholestérol [25]. Ces découvertes et d'autres ont conduit à la recherche de protéines liant l'oxystérol, conduisant à l'identification de l'OSBP (oxysterol-binding protein) [26]. La protéine a ensuite été purifiée et l'ADNc de lapin et humain cloné [27, 28].

Les ORP sont impliqués dans divers processus cellulaires tels que la signalisation cellulaire, le transport vésiculaire, le métabolisme lipidique et le transport lipidique non vésiculaire. Quatre types de mécanismes de transport sont proposés (**Figure 1**). Ils pourraient transférer des lipides entre les membranes cellulaires via des cycles d'extraction et de délivrance de lipides (**Figure.1a**). Cela se produit probablement principalement au niveau des MCS (sites de contact membranaire). Ils peuvent également aider à établir des changements transitoires dans la distribution des lipides membranaires en ajoutant ou en supprimant des lipides d'une région de la membrane (**Figure.1b**). De cette manière, les ORP peuvent contribuer à des processus tels que la courbure ou la signalisation de la membrane, qui peuvent être provoqués par le regroupement temporaire ou l'exclusion de lipides spécifiques dans les régions membranaires [29-32]. D'un autre côté, Ils peuvent servir de capteurs lipidiques, modifiant leurs interactions avec d'autres partenaires protéiques en fonction de la liaison ou de la libération de ligands lipidiques. La détection des lipides peut être utilisée pour signaler des événements ou moduler les interactions protéiques ou membranaires. La détection des lipides par ORP se produit principalement au niveau des

sites de contact des organelles (**Figure. 1c**). Enfin, les ORP peuvent réguler l'entrée d'autres protéines liant les lipides en présentant le lipide à une deuxième protéine liant les lipides (**Figure. 1d**) ou en empêchant la protéine liant les lipides de pénétrer dans la membrane (**Figure.1e**).

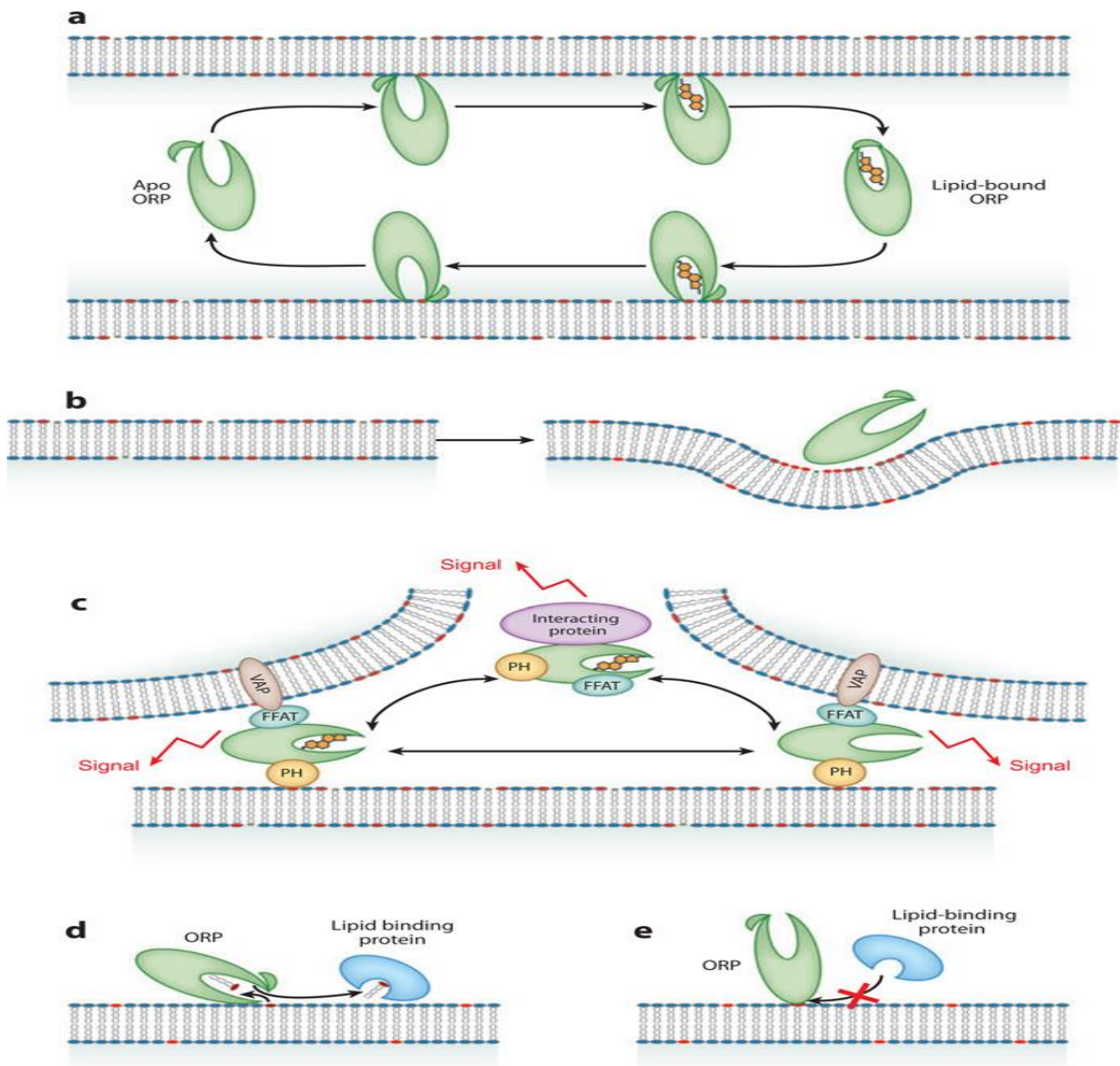


Figure01: Mécanismes possibles des ORP. (a) Transfert lipidique par un ORP entre deux membranes. (b) Modifications transitoires de la distribution des lipides dans une membrane induites par la liaison ORP et/ou le transfert de lipides. (c) Les ORP pourraient fonctionner comme des capteurs lipidiques qui modifient la signalisation et/ou leurs partenaires d'interaction protéique en réponse à la liaison du ligand. (d) Les ORP pourraient également présenter un lipide à une deuxième protéine liant les lipides ou (e) empêcher une protéine liant les lipides d'accéder à un lipide dans une membrane. VAP (protéines associées aux protéines membranaires associées aux vésicules), PH (homologie pleckstrine)

Ces transporteurs selon leur nature, interagissent avec différents types de lipides. L'ORP1-ORD interagit avec le cholestérol, les oxystérols, ainsi qu'une gamme de phosphoinositides [33]. Deux variantes de la protéine liée à l'OSBP (ORP) 1 ont été identifiées : l'isoforme longue ORP1L (résidus 1 à 950) qui contient le domaine ANK (répétition d'ankyrine), le domaine PH (homologie de Pleckstrin), le motif FFAT (di phénylalanine dans un tractus acide) et le motif ORD, et une courte isoforme ORP1S (résidus 514 à 950) qui ne contient que l'ORD [34].

ORP1L agit en tant que capteur de cholestérol ancré dans un endosome/lysosome tardif (LEL) qui peut également déplacer le mouvement bidirectionnel du cholestérol à l'interface entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'endosome /lysosome tardif (LEL) [33]. Ce transfert requiert la liaison de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) à ORP1L. Par ailleurs, lorsque le niveau de cholestérol dans la LEL est bas, ORP1L favorise le transfert de cholestérol du RE vers les MVB (Multivesicular Bodies) afin de favoriser la formation de vésicules intraluminales. Il semble que ORP1 est un capteur unique de PI-bisphosphates lysosomal et que phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI (4,5) P2) /phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate (PI (3,4) P2) régule de manière allostérique le transport du cholestérol par ORP1 [34].

À la surface des endosomes tardifs, la conformation d'ORP1L (oxysterol-binding protein-relatedprotein 1L) varie en fonction du taux de cholestérol, ce qui contrôle sa liaison à VAP-A (Vesicle-associated membrane protein-associatedprotein A) ou à la protéine RILP (Rab-interacting lysosomal protein), qui permet le déplacement des endosomes par des moteurs moléculaires. Ainsi, ORP1L se présente comme un senseur de cholestérol qui permet de positionner des organelles dans la cellule en fonction de leur richesse en cholestérol [35].

La fonction moléculaire d'ORP1S est moins bien comprise par rapport à ORP1L. On ignore si ORP1S agit au niveau des sites de contact membranaire, car il manque de motifs de ciblage et est une distribution relativement cytosolique [36]. Cependant, une interaction transitoire avec les phosphoinositides PI (3,4) P2 et PI (4,5) P2 grâce à des patchs basiques présents sur sa surface pourrait favoriser son association avec les membranes [34].

Les protéines de transport du cholestérol sont souvent fortement exprimées dans les cancers, d'où la nécessité d'inhiber ces transporteurs [37]. Pour cela, elles sont visées en tant que cible attractive pour la stratégie anticancéreuse [38]. L'ORP s'est révélé être un récepteur

cellulaire de haute affinité d'un groupe de produits naturels potentiellement inhibiteurs de croissance de lignées cellulaires cancéreuses humaines. Ces produits naturels sont constitués de céphalostatine1, OSW-1, retrazine B, stelletin E, et schweifortine A, schweifortine B, ou encore l'ORPphilines [39].

Dans les années 1970, une découverte majeure a montré que les médicaments antifongiques présentaient des effets synergiques avec certains agents chimio thérapeutiques. Cette synergie résultait de la capacité de ces antifongiques à altérer la composition lipidique membranaire des cellules cancéreuses [40].

Des études expérimentales ont mis en lumière les mécanismes anticancéreux sous-jacents de l'itraconazole, démontrant sa capacité à réguler à la baisse de différentes voies de signalisation présentes dans les cellules cancéreuses ainsi que dans les cellules stromales environnantes. Les découvertes de ces recherches ont été corroborées par douze études cliniques portant sur divers types de cancer, lesquelles ont rapporté des résultats prometteurs quant à l'efficacité de l'itraconazole en tant qu'agent anticancéreux [40].

L'itraconazole est un triazole à large spectre antifongique. On peut le trouver sous forme orale et intraveineuse, avec des profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques avantageux [41]. La synthèse de l'ergostérol est inhibée par l'itraconazole. Le lanostérol doit subir une réaction de 14 alpha-déméthylation pour aboutir à de l'ergostérol. Cette étape est catalysée par la 14 alpha-déméthylase fongique, une enzyme du cytochrome P-450 [42]. L'itraconazole bloque cette réaction en interagissant -au lieu du substrat- avec le site de liaison de la 14 alpha-déméthylase [43].

D'autres azolés à l'exemple du kétaconazole et du fluconazole présentent la capacité d'agir efficacement contre la production de cholestérol tant in vivo qu'in vitro.

Le fluconazole est un composé de la famille des triazoles, l'un des agents antifongiques les plus couramment employés [44]. Il interagit lui aussi avec la 14-déméthylase. Puisque l'ergostérol est un composant important des membranes cellulaires fongiques, le fluconazole inhibe la synthèse de l'ergostérol pour augmenter la perméabilité cellulaire. Il convient également de rappeler que la perte de stérols est étroitement liée à l'accumulation de 14-méthylstérols présents dans les champignons et constitue la principale raison de l'activité fongicide du fluconazole[45].

Des recherches menées sur des fibroblastes humains normaux en culture ont démontré que le kétoconazole a un effet inhibiteur sur la production de cholestérol en bloquant la conversion du lanostérol en cholestérol [46]. Le kétoconazole est un produit pharmaceutique de la catégorie des antifongiques à base d'imidazole [47]. Il agit comme un agent antifongique en inhibant le cytochrome P450 14 α -déméthylase. Des doses élevées de kétoconazole peuvent se lier de manière compétitive aux récepteurs androgènes, tels que ceux de la testostérone et de la dihydrotestostérone, ce qui peut réduire l'activité de la testostérone et de la dihydrotestostérone dans le cancer de la prostate [48].

Le présent travail a pour objectif de tester le potentiel des agents antifongiques à inhiber le transporteur de cholestérol ORP1-ORD dans la thérapie anticancéreuse. En ayant recours à une approche computationnelle à savoir l'amarrage moléculaire, nous avons évalué l'interaction entre ces agents antifongiques et ORP1-ORD, obtenue à partir de la base de données des protéines (Protein Data Bank PDB).

L'objectif de l'amarrage moléculaire est de déterminer si ces agents antifongiques peuvent entraver la prolifération des cellules cancéreuses en étant des antagonistes du cholestérol, au niveau de ORP1-ORD.

Chapitre II :
Matériel et méthode

.1 Préparation de la protéine :

La structure cristallographique tridimensionnelle d'ORP1-ORD (PDB structure ID : 5ZM5) a été téléchargée du site web PDB (Protein Data Bank) du RCSB <https://www.rcsb.org/> avec une très haute résolution de 2,60 Å et ne présente aucune mutation.

Par conséquent, cette structure 3D doit être préparée avant d'entamer le processus d'ancrage moléculaire. Pour ce faire, on utilise le programme ChimeraUCSF [49] (ver 1.17), qui supprime non seulement le ligand original lié à la cible, mais aussi les molécules d'eau. Enfin, la structure 3D préparée du 5ZM5 a été sauvegardée en tant que fichier PDB (figure 2).

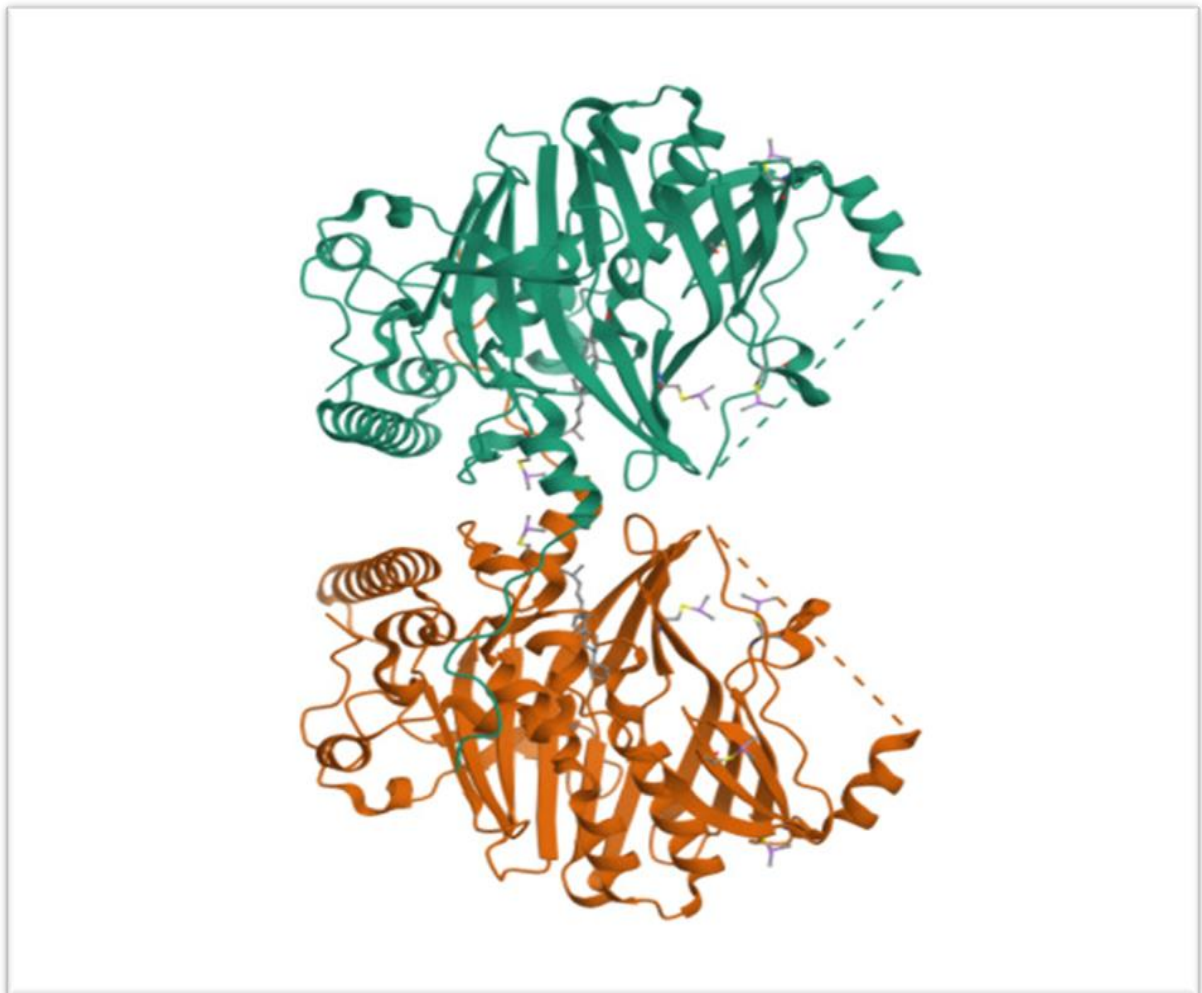


Figure 2 : Structure de la cible 5ZM5

.2 Téléchargement des ligands « inhibiteurs » :

La structure tridimensionnelle de itraconazole, kétoconazole, fluconazole ont été extraites de la base de données PubChem en format sdf <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

.3 L'amarrage moléculaire :

Pour réaliser l'ancrage moléculaire, la structure ORP1-ORD 5ZM5 a été préparée à l'aide de l'outil Dock Prep du programme Chimera UCSF [49]. Cet outil permet d'ajouter des atomes d'hydrogène et des charges, ainsi que d'appliquer une énergie minimale ΔG , car la cible extraite de la PDB du RCSB est dépourvue de charge.

Par ailleurs, les trois ligands ont été ajoutés l'un après l'autre afin de préparer l'amarrage moléculaire, qui consiste à déterminer le degré d'affinité de liaison des différents ligands avec ORP1-ORD.

Pour vérifier l'effet inhibiteur de ces molécules sur ORP1-ORD, l'interaction de liaison réelle a été validée par l'amarrage moléculaire à l'aide du logiciel Auto Dock Vina [50]. Les conformères les plus optimaux ont été identifiés sur la base de leur énergie de liaison (kcal/mol) au niveau du site actif.

.4 Identification des interactions :

Les trois ligands complexés à ORP1-ORD ont été chargés directement l'un après l'autre dans le logiciel de visualisation Discovery Studio [51, 52], qui permet de visualiser en 2D les différents diagrammes d'interaction existant entre le site actif du transporteur et les ligands, ainsi qu'il permet de connaître les liaisons hydrogène et les liaisons hydrophobes contractualisées par les acides aminés du site actif de la cible 5ZM5 et les trois ligands.

Chapitre III :
Résultats et discussion

.1 Études d'amarrage :

Les détails des trois ligands sont répertoriés dans le tableau 01. L'amarrage de ces ligands, réalisé sur le site de liaison du transporteur ORP1-ORD, a permis d'identifier plusieurs configurations retenues pour définir des modes de liaison énergétiquement favorables.

Plus l'énergie de liaison est faible, plus l'affinité du ligand avec le transporteur est élevée. Par conséquent, ceci suggère que le transport du cholestérol peut être inhibé.

Il s'avère que le kétoconazole a présenté la meilleure conformation de liaison en plus d'une meilleure affinité avec l'ORP1-ORD (5ZM5), et une énergie de liaison de -10,6 kcal/mol qui est considérée comme une faible énergie. Il est suivi par le fluconazole avec une énergie de liaison de -7,2 kcal/mol. A noter que ces valeurs sont supérieures à celle obtenue pour l'itraconazole avec une énergie de liaison de -5,9 kcal/mol.

Tableau01 : Coordonnées et énergies de liaison des trois ligands amarrés à l'ORP1-ORD

Nom	CID (Identifiant composé)	Formule moléculaire	Masse Moléculaire (G/mol)	ΔG (la variation de l'énergie libre de Gibbs) (-kcal /mol)
Kétoconazole	47576	C ₂₆ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₄	531,4 g/mole	-10,6 kcal/mol
Fluconazole	3365	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	306,27 g/mole	-7,2 kcal/mol
Itraconazole	55283	C ₃₅ H ₃₈ Cl ₂ N ₈ O ₄	705,6 g/mole	-5,9 kcal/mol

.2Interaction des ligands et modes de liaisons au transporteur :

Nous avons réalisé le processus d'amarrage moléculaire de ces ligands avec l'ORP1-ORD (5ZM5), cela nous a permis d'identifier toutes les interactions et modes de liaison permettant d'obtenir une bonne affinité, puisque plus l'énergie de liaison est faible, plus l'efficacité de liaison est élevée.

Le logiciel Discovery Studio visualizer a été utilisé pour identifier les liaisons contractées entre d'une part, les acides aminés du site de liaison de la cible 5ZM5 et d'autre part, les trois ligands.

Les interactions des trois ligands obtenus lors des expériences de docking sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau.02 : Interactions des 3 ligands ancrés au site de liaison de l'ORP1-ORD

Les ligands amarrés	Les acides Aminés de 5ZM5 qui interviennent dans les interactions des composés	Types d'interaction	ΔG kcal/mol
Kétoconazole	Val 712 Leu 720 Phe 570 Ile 557 Lys 623 Ala 686 Pro 688 Met 566 Cys 710 Thr 621 Gly 622 Val 614 Arg 579 Gln 617	Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-sulfur Pi-sulfur Van der waals Van der waals Van der waals ConventionalHydrogenBond,Pi-cation ConventionalHydrogen Bond	-10,6
Fluconazole	Ala 686 Pro 675 Pro 688 Met 559 Cys 710 Gln 617	Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-sulfur Pi-sulfur Carbon Hydrogen Bond	-7,2
Itraconazole	Pro 688 Pro 675 Met 559 Lys 623 Val 712 Ile 715 Ile 557 Leu 720 Leu 553 Ala 686 Gly 622 Met 566 Cys 710 Arg 579 Phe 570 Gln 617	Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Pi-Alkyl Carbon Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-sulfur Pi-sulfur Pi-cation Pi-Sigma,Pi-Pi Stacked Conventional Hydrogen Bond	-5,9

Le kétoconazole appartient à la classe des médicaments antifongiques imidazole [53]. Dans le cadre de cette étude le kétoconazole fournit la meilleure énergie de liaison. Le complexe a établi sept liaisons Pi-alkyl avec les acides aminés Val 712, Leu 720, Phe 570, Ile 557, Lys 623, Ala 686 et Pro 688, deux liaisons Pi-sulfur avec les acides aminés Met 566, Cys 710, trois liaisons van der waals avec les acides aminés Thr 621, Gly 622 et Val 614, une Liaison hydrogène conventionnelle et une liaison Pi-cation avec l'acide aminé Arg 579 et une Liaison hydrogène conventionnelle avec l'acide aminé Gln 617 (figure 04, Tableau 2).

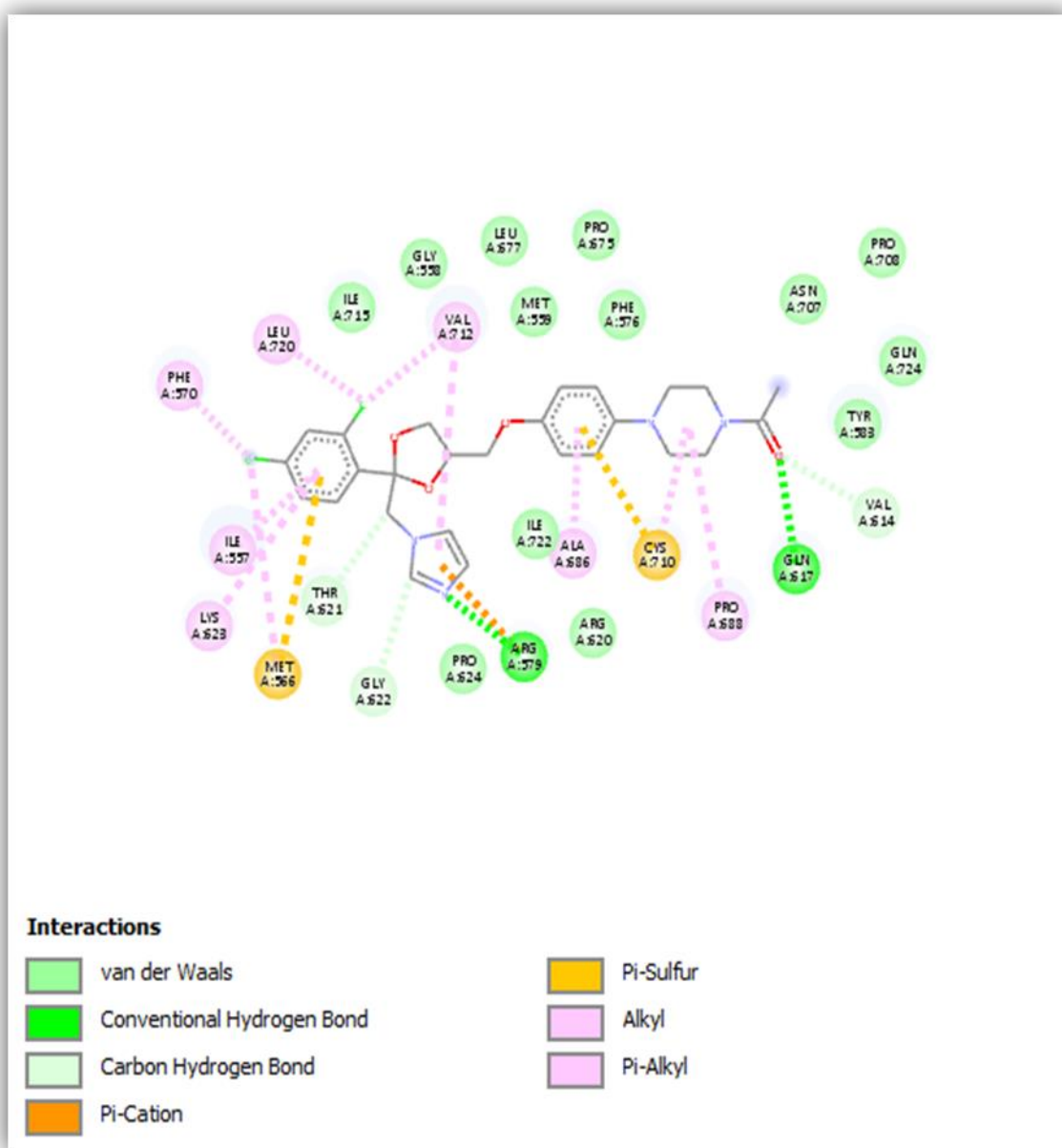


Figure 04 : Interaction 2D du kétoconazole avec l'ORP1-ORD (-10,6 kcal/mol)

Le fluconazole est un agent antifongique bis-triazole substitué par le fluor [54]. Il a présenté un score de liaison de -7,2 kcal/mol avec la création de trois liaisons Pi-alkyl avec les acides aminés Ala 686, Pro 675 et Pro 688, deux liaisons Pi-sulfur avec les acides aminés Met 559 et Cys 710, et une Liaison carbone-hydrogène avec l'acide aminé Gln 617 (figure 05, Tableau 2).

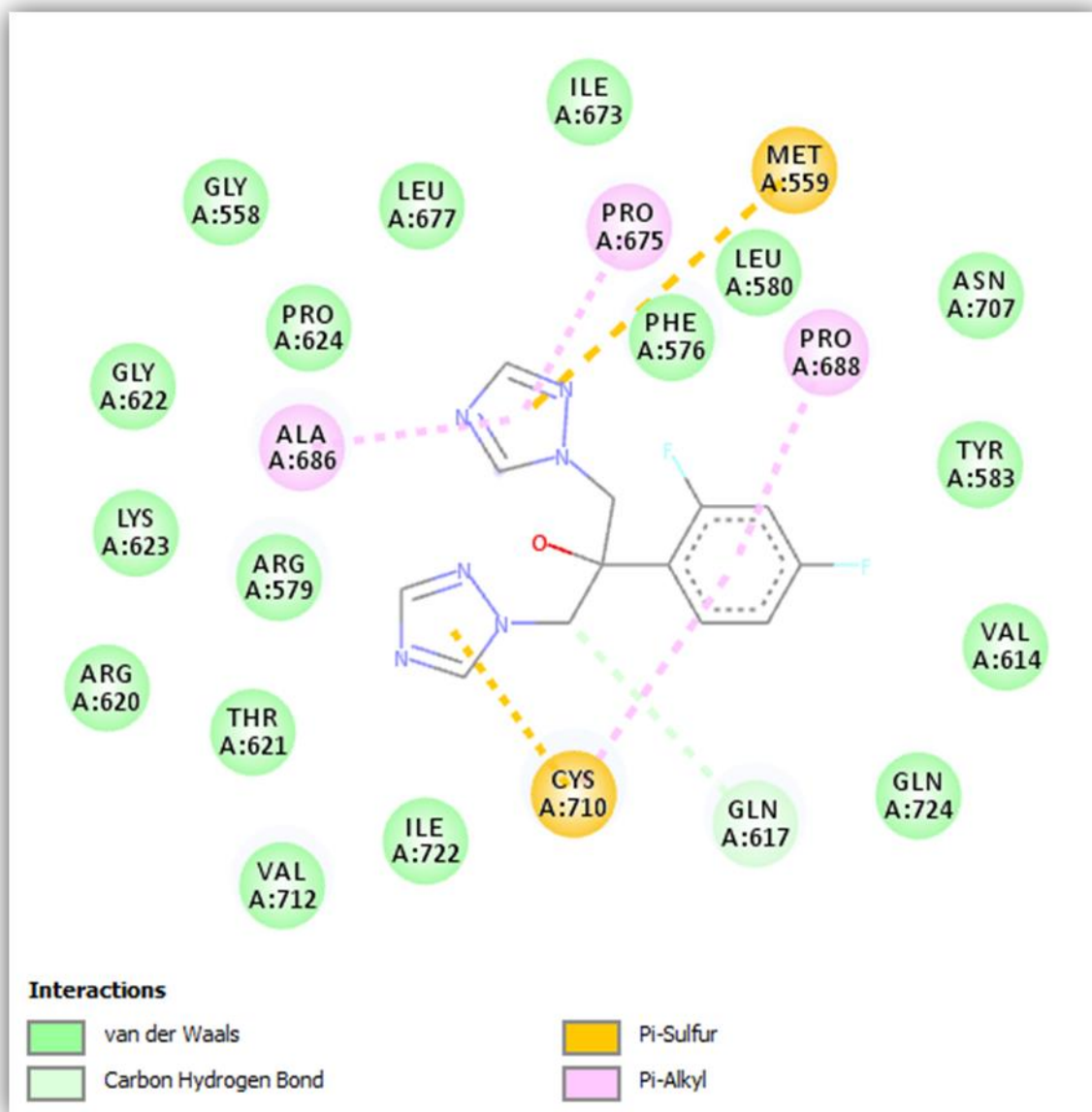


Figure 05 : Interaction 2D du fluconazole avec l'ORP1-ORD (-7,2 kcal/mol)

L'itraconazole est un agent antifongique triazole. Il a présenté un score de liaison de -5,9 kcal/mol. Différentes liaisons ont été observées. Neuf liaisons Pi-alkyl avec les acides aminés Pro 688, Pro 675, Met 559, Lys623, Val712, Ile 715, Ile 557, Leu 720 et Leu 553. Deux liaisons carbone hydrogène avec les acides aminés Ala 686 et Gly 622. Deux Liaisons Pi-sulfur avec les acides aminés Met 566 et Cys 710, une liaison Pi-cation avec l'acide aminé Arg 579, une liaison Pi-Sigma et Pi-Pi Stacked avec l'acide aminé Phe 570 et une liaison hydrogène conventionnelle avec l'acide aminé Gln 617 (**figure 06, Tableau 2**).

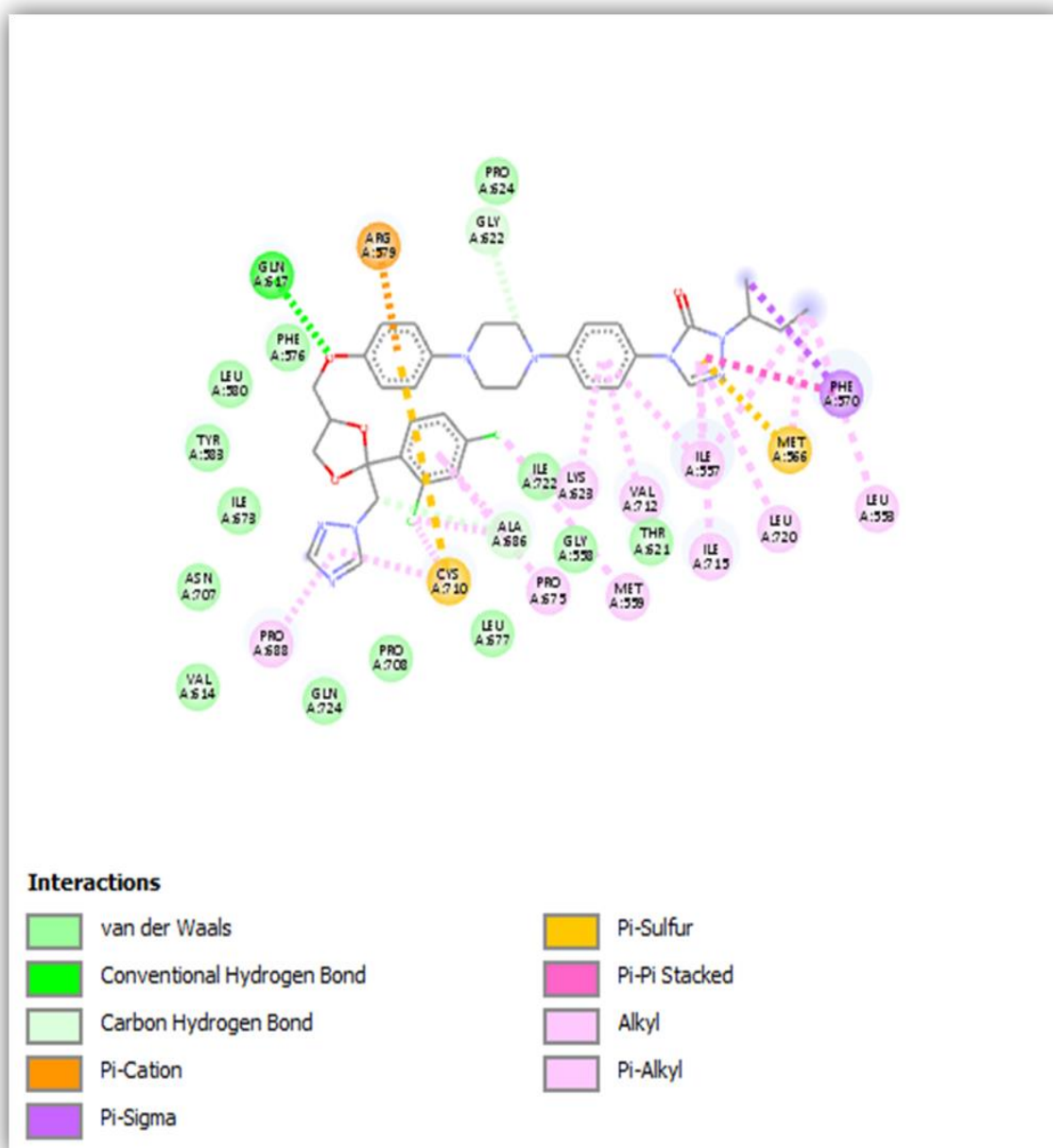


Figure 06 : Interaction 2D de l'itraconazole avec l'ORP1-ORD (-5.9 kcal/mol)

.3 Discussion :

Dans cette étude, nous avons effectué un docking moléculaire qui nous a permis de prédire comment trois médicaments antifongiques (kétoconazole, fluconazole et itraconazole) interagissent avec le transporteur de cholestérol ORP1-ORD. En effet, certains travaux ont démontré que des antifongiques azolés peuvent avoir une activité inhibitrice sur la croissance des cellules tumorales. L'itraconazole a été proposé par Isono et al (2021) comme un potentiel inhibiteur du transport de cholestérol intracellulaire, au niveau des lignées humaines en culture de cellules squameuses (CaSki) du carcinome du col de l'utérus [40]. Dans ces cultures, il est constaté que les cellules cultivées en présence d'itraconazole présentent une accumulation cytoplasmique du cholestérol, contrairement aux cultures témoins. D'où l'hypothèse que cet antifongique est un agoniste des transporteurs de cholestérol intracellulaires. Il en est de même pour les autres antifongiques testés.

Parmi les nombreux transporteurs intracellulaires de cholestérol nous avons ciblée l'ORP1-ORD qui permet de déplacer le cholestérol entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'endosome /lysosome tardif et vice versa.

Nous avons obtenu une bonne inhibition de ORP1-ORD avec le kétoconazole car l'énergie de liaison est plus faible. Le kétoconazole a donc des effets anticancéreux car il inhibe le transporteur de cholestérol qui est essentiel pour les cellules cancéreuses. Sur la base des rapports récents et des découvertes actuelles, ce médicament semble avoir un grand potentiel dans le traitement du cancer [55,56].

Le deuxième antifongique à avoir montré une énergie de liaison intéressante est le fluconazole. Il a une affinité plus forte pour ORP1-ORD que l'itraconazole et a des effets antitumoraux en raison de sa capacité à bloquer le transporteur de cholestérol. Plusieurs essais cliniques ont démontré l'efficacité du fluconazole comme traitement antifongique empirique chez les patients atteints de cancer présentant de la fièvre et neutropénie [57].

Dans notre étude, nous avons constaté que l'itraconazole a une faible affinité pour ORP1-ORD, ce qui exclut l'inhibition de ce transporteur par cet antifongique au niveau des cellules CaSki. D'autres mécanismes antitumoraux ont été proposés pour l'itraconazole, notamment l'inhibition de multiples voies de l'angiogenèse [58].

Nous avons remarqué qu'il existe une similitude entre les trois ligands au niveau de 4 acides aminés (Pro 688, Ala 686, Cys 710 et Gln 617), cela nous a permis de suggérer que ces acides aminés appartiennent au site de fixation de la protéine 5ZM5.

Les résultats de l'amarrage moléculaire présentés dans les figures **(04,05 et 06)** ont confirmé que diverses interactions non covalentes telles que les liaisons hydrophobes et hydrogènes, les forces de Van-der-Waals, Pi-alkyl et Pi-sulfur avec notre cible apportent une contribution fondamentale aux structures de liaison et aux énergies libres de liaison.

En effet, les interactions Pi-alkyle contribuent à la stabilisation des structures de liaison [59]. Il a été constaté que les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène peuvent former des liaisons fortes et puissantes entre les atomes des ligands et les molécules de protéines [60]. De même que les liaisons Pi-sulfur jouent un rôle important dans la structure et la fonction des protéines, en contribuant de manière significative à la stabilité, au repliement et à l'activité biologique de la protéine [61]. Les forces de Van der Waals influencent la structure, la stabilité, la dynamique et la fonction des molécules [62].

Les résultats de l'étude seront utiles pour améliorer l'activité anticancéreuse existante du kétoconazole, du fluconazole et de l'itraconazole ou à étudier la synergie de ces trois médicaments antifongiques avec d'autres médicaments anticancéreux.

Conclusion

Conclusion

Trois agents antifongiques potentiels inhibiteurs de la prolifération de cellules cancéreuses ont été étudiés, en utilisant avec succès l'outil de docking moléculaire. Les résultats indiquent que le kétoconazole et le fluconazole ont une énergie de liaison plus faible que celle de l'itraconazole (-10,6kcal/mol ; -7,2kcal/mol ; -5,9kcal/mol, respectivement). Le kétoconazole présente donc la meilleure affinité avec la protéine 5ZM5. Sur la base de ces résultats, le kétoconazole peut être utilisé pour la thérapie anticancéreuse, mais pour cela d'autres essais *in vivo* et *in vitro* devraient être réalisés pour valider les résultats obtenus *in silico*.

Bibliographie

- [1] Krieghoff-Henning E, Folkerts J, Penzkofer A, Weg-Remers S. Cancer – an overview. *Med Monatsschr Pharm.* 2017 Feb;40(2):48-54. English, German. PMID: 29952494.
- [2] Stratton, M. R., Rahman, N., & The Cancer Genome Atlas Research Network. (2012). The cancer genome—a decade of discoveries. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 721-730.
- [3] Behranvand N, Nasri F, ZolfaghariEmameh R, Khani P, Hosseini A, Garssen J, Falak R. Chemotherapy:a double-edgedsword in cancer treatment. *Cancer ImmunolImmunother.* 2022 Mar;71(3):507-526. Doi: 10.1007/s00262-021-03013-3. Epub 2021 Aug 5. Erratum in: *Cancer ImmunolImmunother.* 2021 Aug28; PMID: 34355266.
- [4] Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. 2023 Feb 27. In:StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL):StatPearlsPublishing; 2024 Jan–. PMID: 33232037.
- [5] Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. 2023 Feb 27. In:StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL):StatPearlsPublishing; 2024 Jan–. PMID: 33232037.
- [6] Altun İ, Sonkaya A. The Most Common SideEffectsExperienced by Patients WereReceiving First Cycle of Chemotherapy. *Iran J Public Health.* 2018 Aug;47(8):1218-1219. PMID: 30186799; PMCID: PMC6123577.
- [7] Mehta SR, Suhag V, Semwal M, Sharma N. Radiotherapy: Basic Concepts and RecentAdvances. *Med J Armed Forces India.* 2010 Apr;66(2):158-62. Doi: 10.1016/S0377-1237(10)80132-7. Epub 2011 Jul 21. PMID: 27375326; PMCID: PMC4920949.
- [8] Benzen SM. Prévenir ou réduire les effets secondaires tardifs de la radiothérapie: la radiobiologie rencontre la pathologie moléculaire. *Nat Rev Cancer* 2006; 6 (9): 702-13. [PubMed] [Google Scholar].
- [9] Chaput G, Regnier L. Radiotherapy:Clinicalpearls for primary care. *Can Fam Physician.* 2021 Oct;67(10):753-757. Doi: 10.46747/cfp.6710753. PMID: 34649900; PMCID: PMC8516179.
- [10] Dillman RO. Cancer immunotherapy. *Cancer BiotherRadiopharm.* 2011 Feb;26(1):1-64. doi: 10.1089/cbr.2010.0902. PMID: 21355777.
- [11] Esfahani K, Meti N, Miller WH Jr, Hudson M. Adverse eventsassociatedwith immune checkpoint inhibitorstreatment for cancer. *CMAJ* 2019;191(2): E40-6.
- [12] Michot JM, Lazarovici J, Tieu A, Champiat S, Voisin AL, Ebbo Met al. Haematological immune-related adverse eventswith immune checkpoint inhibitors, how to manage?Eur J Cancer 2019;122:72-90. Publ. en ligne du 18 oct. 2019.
- [13] Véronique Rousselle. Place et intérêt de l'hormonothérapie dans les cancers du sein chez la femme ménopausée: guide d'information destiné aux pharmaciens d'officine. *Sciences pharmaceutiques* 2013. Ffhal-01733652f.
- [14] RihebJabeur. Résistance à l'hormonothérapie dans le cancer du mammaire: implication des isoformes de hRE α et de l'activité de CDK5 en réponse à des traitements par de nouveaux anti-oestrogènes. *Biologie moléculaire.* Université de Bretagne Sud, 2022. Français. ffNNT:2022LORIS642ff. Fftel04103864.
- [15] Zhou Z, Li M. Targetedtherapies for cancer. *BMC Med.* 2022 Mar 11;20(1):90. Doi: 10.1186/s12916-022-02287-3. PMID: 35272686; PMCID: PMC8915534.
- [16] Shuel SL. Therapies ciblées contre le cancer: Perles cliniques à l'intention des soins primaires. *Can Fam Physician.* 2022 Jul;68(7): e199-e203. Doi: 10.46747/cfp.6807e199. PMID: 35831087; PMCID: PMC9842151.

- [17] von Mehren M, Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibodytherapy for cancer. *AnnuRev Med.* 2003;54:343-69. Doi: 10.1146/annurev.med.54.101601.152442. Epub 2001 Dec 3. PMID: 12525678.
- [18] Giacomini I, Gianfanti F, Desbats MA, Orso G, Berretta M, Prayer-Galetti T, Ragazzi E, Cocetta V. CholesterolMetabolicReprogramming in Cancer and ItsPharmacological Modulation as TherapeuticStrategy. *Front Oncol.* 2021 May 24;11:682911. doi: 10.3389/fonc.2021.682911. PMID: 34109128; PMCID: PMC8181394.
- [19] Buchwald H. Cholesterol inhibition, cancer, and chemotherapy. *Lancet.* 1992 May 9;339(8802):1154-6. doi: 10.1016/0140-6736(92)90744-n. PMID: 1349377.
- [20] THÈSE DE DOCTORAT soutenue le 07/05/2013 par Emmanuelle GIRARD.
- [21] Mesmin, B., and F.R. Maxfield. 2009. Intracellularsteroldynamics. *BiochimBiophys Acta.* 1791:636-645
- [22] Lehto, M., S. Laitinen, G. Chinetti, M. Johansson, C. Ehnholm, B. Staels, E. Ikonen, and V.M. Olkkonen. 2001. The OSBP-relatedproteinfamily in humans. *J LipidRes.* 42:1203-1213.
- [23] Olkkonen, V.M. 2004. Oxysterol binding protein and its homologues: new regulatoryfactorsinvolved in lipidmetabolism. *CurrOpinLipidol.* 15:321-327.
- [24] Bjorkhem I, Diczfalusy U. Oxysterols:friends, foes, or justfellowpassengers? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22:734–742
- [25] Brown MS, Goldstein JL. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductaseactivity and inhibition of growth of humanfibroblasts by 7-ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:7306–7314.
- [26] Taylor FR, Saucier SE, Shown EP, Parish EJ, Kandutsch AA. Correlationbetweenoxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 1984; 259:12382–12387.
- [27] Dawson PA, Ridgway ND, Slaughter CA, Brown MS, Goldstein JL. cDNAcloning and expression of oxysterol-binding protein, an oligomerwith a potential leucine zipper. *J. Biol. Chem.* 1989a; 264:16798–16803
- [28] Levanon D, Hsieh CL, Francke U, Dawson PA, Ridgway ND, et al. cDNAcloning of humanoxysterol-binding protein and localization of the gene to human chromosome 11 and mouse chromosome 19. *Genomics.* 1990;7:65–74.
- [29] Balla T, Szentpetery Z, Kim YJ. Signalisation phosphoinositide: nouveaux outils et perspectives. *Physiologie.* 2009; 24: 231-244.
- [30] Bard F, Malhotra V. La formation de transporteurs de transport TGN vers membrane plasmatique. *Ann. Révérend Cell Dev. Biol.* 2006 22: 439-455;
- [31] chernomordik LV, Kozlov MM. Interaction protéine-lipide dans la fusion et la fission des membranes biologiques. *Ann. Révérend Biochem.* 200372: 175-207
- [32] De Matteis MA, Godi A. Interactions protéine-lipide dans le trafic membranaire au complexe de Golgi. *Biochimie. Biophysique. Actes.* 2004; 1666: 264-2741666: 264-274
- [33] Aw YC, Brown AJ, Wu JW, Yang H. ORP1L, ORP1S et ORP2: capteurs et transporteurs lipidiques. *Contact.* 2020;3. est-ce que je: 10.1177/2515256420956818.
- [34] Dong J, Du X, Wang H, Wang J, Lu C, Chen X, Zhu Z, Luo Z, Yu L, Brown AJ, Yang H, Wu JW. Allostericenhancement of ORP1-mediated cholesterol transport by PI (4,5) P2/PI

- (3,4) P2. *Nat Commun.* 2019 Feb 19;10(1):829. doi: 10.1038/s41467-019-08791-0. PMID: 30783101; PMCID: PMC6381110.
- [35] Dong J, Du X, Wang H, Wang J, Lu C, Chen X, Zhu Z, Luo Z, Yu L, Brown AJ, Yang H, Wu JW. Allosteric enhancement of ORP1-mediated cholesterol transport by PI (4,5) P2/PI (3,4) P2. *Nat Commun.* 2019 Feb 19;10(1):829. doi: 10.1038/s41467-019-08791-0. PMID: 30783101; PMCID: PMC6381110.
- [36] Aw YC, Brown AJ, Wu JW, Yang H. ORP1L, ORP1S et ORP2: capteurs et transporteurs lipidiques. *Contact.* 2020;3. est ce que je: 10.1177/2515256420956818.
- [37] Yan D & Olkkonen A. (2008). Characteristics of oxysterol binding proteins. *Int Rev Cytol*; 265: 253–285.
- [38] Liu H, Huang S. (2020). Role of oxysterol-binding protein-related proteins in malignant human tumours. *World J Clin Cases*; 8:1-10.
- [39] Burgett AW, Poulsen TB, Wangkanont K, et al. (2011). Shair, Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins, *Nat. Chem. Biol*; 7: 639–647.
- [40] Isono R, Tsubamoto H, Ueda T, Takimoto Y, Inoue K, Sakata K, Shibahara H, Nishiumi S. Itraconazole Inhibits Intracellular Cholesterol Trafficking and Decreases Phosphatidylserine Level in Cervical Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2021 Nov;41(11):5477-5480. doi: 10.21873/anticancer.15360. PMID: 34732417.
- [41] Piérard GE, Arrese JE, Piérard-Franchimont C. Itraconazole. *Expert Opin Pharmacother.* 2000 Jan;1(2):287-304. doi: 10.1517/14656566.1.2.287. PMID: 11249550.
- [42] Spampinato C, Leonardi D. Infections à *Candida*, causes, cibles et mécanismes de résistance: agents antifongiques traditionnels et alternatifs. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 204237. [Article gratuit PMC] [PubMed].
- [43] Kurn H, Wadhwa R. Itraconazole. 2023 Apr 17. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32491797.
- [44] Govindarajan A, Bistas KG, Ingold CJ, Aboeed A. Fluconazole. 2023 May 23. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 30725843.
- [45] Sinawe H, Casadesus D. Ketoconazole. 2023 Jun 26. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32644647.
- [46] [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90816-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90816-8)
- [47] Govindarajan A, Bistas KG, Ingold CJ et al. Fluconazole. [Mise à jour le 23 mai 2023]. Dans: *StatPearls* [Internet]. Île au trésor (FL): StatPearls Publishing; 2024 janvier. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537158>.
- [48] Bhasin S, Sikka S, Fielder T, Sod-Moriah U, Levine HB, Swerdloff RS, Rajfer J. Effets hormonaux du kétoconazole in vivo chez le rat mâle: mécanisme d'action. *Endocrinologie.* Mars 1986; 118 (3):1229-32. [PubMed].

- [49] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605-12. doi: 10.1002/jcc.20084. PMID: 15264254.
- [50] Trott, O. and A.J. Olson, AutoDockVina:improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 2010. 31(2): p. 455-461.
- [51] Studio, D., Discovery Studio. Accelrys [2.1], 2008.
- [52] Visualizer, D.S., V 16.1. 0, Accelrys Inc. San Diego, 2016.
- [53] Sinawe H, Casadesus D. Ketoconazole. 2023 Jun 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 32644647.
- [54] Pasko MT, Piscitelli SC, Van Slooten AD. Fluconazole: a new triazole antifungal agent. *DICP.* 1990 Sep;24(9):860-7. doi: 10.1177/106002809002400914. PMID: 2260347.
- [55] Prado-Carrillo, O.; Arenas-Ramirez, A.; Llaguno-Munive, M.; Jurado, R.; Pérez-Rojas, J.; Cervera-Ceballos, E.; Garcia-Lopez, P. Le kétoconazole inverse la résistance à l'imatinib dans les cellules K562 de leucémie myéloïde chronique humaine. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7715. <https://doi.org/10.3390/ijms23147715>.
- [56] Tresnanda, RI; Pramod, SV; Safriadi, F. Kétoconazole pour le traitement du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (mCRPC) naïf de docétaxel: une revue systématique. *Pac asiatique. J. Cancer Précédent.* 2021, 22, 3101-3107. [Google Scholar] [CrossRef].
- [57] Yu DT, Seger DL, Peterson JF, Kumar RN, Bates DW. Fluconazole for empiric antifungal therapy in cancer patients with fever and neutropenia. *BMC Infect Dis.* 2006 Dec 5;6:173. doi: 10.1186/1471-2334-6-173. PMID: 17147804; PMCID: PMC1702543.
- [58] Pounds R, Leonard S, Dawson C, Kehoe S. Repurposing itraconazole for the treatment of cancer. *Oncol Lett.* 2017 Sep;14(3):2587-2597. doi: 10.3892/ol.2017.6569. Epub 2017 Jul 10. PMID: 28927025; PMCID: PMC5588108.
- [59] Lobato JCM, Arouche TDS, Nero JD, Filho T, Borges RDS, Neto AMJC. Interactions between carbon nanotubes and external structures of SARS-CoV-2 using molecular docking and molecular dynamics. *J Mol Struct.* 2023 Aug 15;1286:135604. doi: 10.1016/j.molstruc.2023.135604. Epub 2023 Apr 18. PMID: 37089815; PMCID: PMC10111146.
- [60] Pushpendra, S., P.P. Kushwaha, and K. Shashank, Novel potent inhibitors of Plasmodium vivax dihydrofolate reductase: an in silico anti-malarial drug discovery. *IJPER*, 2018. 52(1): p. 122-134.
- [61] Kojasoy V, Tantillo DJ. Importance of Noncovalent Interactions Involving Sulfur Atoms in Thiopeptide Antibiotics—Glycothiohexide α and Nocathiacin I. *J Phys Chem A.* 2023 Mar 9;127(9):2081-2090. doi: 10.1021/acs.jpca.2c07600. Epub 2023 Feb 28. PMID: 36855831.
- [62] Hermann J, DiStasio RA Jr, Tkatchenko A. First-Principles Models for van der Waals Interactions in Molecules and Materials: Concepts, Theory, and Applications. *Chem Rev.* 2017 Mar 22;117(6):4714-4758. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00446. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28272886.

Résumé:

Objectif: le transporteur de cholestérol ORP1 agit en tant que capteur de cholestérol ancré dans un endosome/lysosome tardif qui peut également déplacer le mouvement bidirectionnel du cholestérol à l'interface entre le réticulum endoplasmique et l'endosome /lysosome tardif. Les protéines de transport du cholestérol sont souvent fortement exprimées dans les cancers, d'où la nécessité d'inhiber ces transporteurs. Des antifongiques de la famille des azolés ont montré une efficacité dans la thérapie de certains types de cancer, sans que leurs mécanismes d'action soient clairement définis. Dans ce travail, on s'est proposé d'inhiber le transport du cholestérol en liant ces antifongiques à l'ORP1-ORD, en utilisant la méthode d'amarrage moléculaire.

Méthode: La structure cristallographique tridimensionnelle d'ORP1-ORD a été téléchargée à partir du site Web PDB (Protein Data Bank). L'amarrage moléculaire a été réalisé à l'aide du programme AUTODOCK VINA, intégré dans le logiciel UCSF Chimera pour étudier in silico l'interaction du kétoconazole, fluconazole et de l'itraconazole avec la protéine cible; les résultats de l'énergie de liaison ont été exprimés en(kcal/mol).

Résultats: Notre étude a démontré que le kétoconazole est le meilleur candidat en tant qu'inhibiteur potentiellement actif de la protéine ORP1-ORD pour le traitement anticancéreux par rapport au fluconazole et à l'itraconazole.

Motsclés: ORP1-ORD, l'amarrage moléculaire, itraconazole, fluconazole, kétoconazole, cancer.

Abstract:

Objective: The ORP1 cholesterol transporter acts as a cholesterol sensor anchored in a late endosome/lysosome that can also move cholesterol bi directionally at the interface between the endoplasmic reticulum and the late endosome / lysosome. Cholesterol transport proteins are often highly expressed in cancers, hence the need to inhibit these transporters. Antifungal agents of the azole family have shown efficacy in the therapy of certain types of cancer, without their mechanisms of action being clearly defined. In this work, we proposed to inhibit cholesterol transport by binding these antifungals to ORP1-ORD, using the molecular docking method.

Method: The three-dimensional crystallographic structure of ORP1-ORD was downloaded from the PDB (Protein Data Bank) website. Molecular docking was performed using the AUTODOCK VINA programme, integrated into the UCSF Chimera software to study in silico the interaction of three antifungal drugs (ketoconazole, fluconazole and itraconazole) with the target protein; binding energy results were expressed in (kcal/mol).

Results: Our study demonstrates that ketoconazole is the best candidate as a potentially active inhibitor of the ORP1-ORD protein for cancer treatment compared with fluconazole and itraconazole.

Key words: ORP1-ORD, molecular docking; itraconazole; fluconazole; ketoconazole; cancer.

المخلص:

الهدف: يعمل ناقل الكوليسترول ORP1 كناقل للكوليسترول كمستشعر للكوليسترول مثبت في الإندوسوم/الجسيم الإندوبلازمي المتأخر الذي يمكنه أيضًا تحويل الحركة ثنائية الاتجاه للكوليسترول في الواجهة بين الشبكة الإندوبلازمية والإندوسوم/الجسيم الإندوبلازمي المتأخر. غالبًا ما يتم التعبير عن بروتينات نقل الكوليسترول بشكل كبير في السرطانات، ومن هنا تأتي الحاجة إلى تثبيط هذه الناقلات. أظهرت العوامل المضادة للفطريات من عائلة الأزول فعالية في علاج أنواع معينة من السرطان، دون تحديد آليات عملها بوضوح. في هذا العمل، اقترحنا في هذا العمل تثبيط نقل الكوليسترول عن طريق ربط هذه المضادات الفطرية بـORP1-ORD، باستخدام طريقة الالتحام الجزيئي.

الطريقة: تم تنزيل التركيب البلوري ثلاثي الأبعاد لـORP1-ORD من موقع PDB (بنك بيانات البروتين). تم إجراء الإرساء الجزيئي باستخدام برنامج AUTODOCK VINA، المدمج في برنامج UCSF Chimera لدراسة تفاعل ثلاثة أدوية مضادة للفطريات (كيتوكونازول و فلوكونازول وإيتراكونازول) مع البروتين المستهدف في السيليكو؛ وتم التعبير عن نتائج طاقة الارتباط بوحدة (كيلو كالوري/مول).

النتائج: أظهرت دراستنا أن الكيتوكونازول هو أفضل مرشح كمثبط نشط محتمل لبروتين ORP1-ORD للعلاج المضاد للسرطان مقارنةً بالفلوكونازول والإيتراكونازول.

الكلمات المفتاحية: ORP1-ORD، الالتحام الجزيئي، إيتراكونازول، فلوكونازول، كيتوكونازول، السرطان.