

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de  
L'Univers

**Département de Biologie**



MEMOIRE Présenté par :

*M<sup>elle</sup> HASSAINE Fatima Zohra*

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Biologie Moléculaire et cellulaire

# **Conception d'inhibiteurs de la protéine CAF-1 pour le maintien de la totipotence**

Soutenu en ligne le 13 /10 / 2020

Devant le jury composé de :

Président :	Mme Dennouni-Medjati Nouria	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur :	Mme Dali Sahi Majda	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur :	Mr Cherak Ahmed Sabri	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2019/2020

*À La Mémoire de Mon Père.....*

## Remerciements

*Louange à Allah par le bienfait duquel les bonnes choses se concrétisent, « el hamdoulilah »*

*Je voudrais dans un premier temps remercier Mme **Dali Sahi M**, professeur de biologie moléculaire et cellulaire à l'université de Tlemcen pour son suivi et pour son énorme soutien. Je veux vraiment vous remercier car j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme encadrante de ce travail.*

*Je désire aussi remercier Mme **Dennouni Medjati N**, maître de conférences A à l'Université de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être la présidente de jury de ce mémoire.*

*Je remercie en particulier Mr **Cherak Ahmed Sabri**, maître de conférences A à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté d'être membre du jury.*

*J'exprime mes profonds remerciements à Mr **Merad Boudia Naguib Hamza**. Son œil critique m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections.*

*J'adresse aussi mes vifs remerciements aux Mr **Abed Zakaria** qui m'a consacré certain temps de son travail pour m'aider, et aussi pour sa patience et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

*Je remercie très chaleureusement mes copines **Hayat** et **Ola** pour apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.*

*Enfin, je ne pourrais finir ces remerciements sans penser à ma famille dont l'affection, l'amour, le soutien et l'encouragement constants m'ont été d'un grand réconfort et ont contribué à l'aboutissement de ce travail.*

Merçi 

Liste des abreviations  
 Liste des figures  
 Listes des tableaux  
 Introduction ..... 1

**Chapitre I : Synthèse Bibliographique**

1. Chromatin assembly factor 1 et la plasticité cellulaire ..... 3  
 2. Architecture du CAF-1 ..... 5  
     2.1. La plus grande sous-unité ..... 5  
         2.1.1. La Cac1 est suffisante ? pour la tétramérisation (H3 / H4)<sub>2</sub> ..... 7  
     2.2 La sous-unité moyennes ..... 10  
     2.3. La plus petite sous-unité ..... 10  
     2.4. Organisation générale du complexe CAF-1 ..... 11  
     2.5. La liaison d'histone ..... 12  
     2.6. Liaison à l'ADN ..... 13  
 3. Modèle d'assemblage de nucléosomes médié par CAF-1 pendant la réplication ..... 14  
     3.1. Formation de tétrasomes ..... 14  
     3.2. La dimérisation régulée des chaperons d'histones guide l'assemblage des nucléosomes ..... 16  
     3.3. Régulation du recrutement de CAF-1 par des modifications post-traductionnelles .... 17  
 4. CAF-1 au cours de la réparation d'ADN ..... 18  
 5. L'impact d'inhibition d'activité PARP-1 sur les cinétiques de recrutement CAF1 au site du photo-dommage ..... 19  
 6. Les poly(ADP-ribose) polymerases ..... 20  
     6.1. Structure de PARP-1 ..... 21  
     6.3. L'inhibition de la PARP ..... 24  
 7. Olaparib ..... 25  
     7.1. Chimie ..... 25  
     7.2. Pharmacodynamique ..... 25  
     7.3. pharmacocinétique et métabolisme ..... 26

**Chapitre II : les principales approches de la modélisation moléculaire**

1. La mécanique moléculaire ..... 27  
 2. La dynamique moléculaire ..... 31

3. Docking moléculaire .....	31
3.1 Définition des termes fondamentaux de l'amarrage .....	32
3.2. Algorithmes du docking .....	33
3.3. Fonction de score .....	33
3.4. Les étapes de base de l'amarrage moléculaire .....	34

**Chapitre III : Étude de l'interaction protéine – ligand**

1. Matériels et Méthodes .....	36
1.1. Matériels .....	36
1.1.1 Ressources informatiques .....	36
1.1.2 Logiciels utilisés .....	37
1.2. Méthode .....	37
1.2.1 Présentation de protéine .....	37
1.2.2 Présentation de ligand .....	39
1.2.3 Protocole de calcul .....	40
2. 2. Résultat .....	41

**Conclusion et Perspective**

1. Conclusion .....	46
2. Perspective .....	46

Références bibliographique

Résumé

## LISTE DES ABREVIATIONS

**5c:** (E)-4-([3-[4-(3-(4-methoxyphenyl) acryloyl) piperazine-1-carbonyl]-4-fluorophenyl] methyl) -2H-phthalazin-1-one

**5i:** (E)-4-([3-[4-(3-(3-fluorophenyl) acryloyl) piperazine-1-carbonyl]4-fluorophenyl] methyl) -2H-phthalazin-1-one

**5l:** (E)-4-([3-[4-(3-(3-nitrophenyl) acryloyl) piperazine-1-carbonyl]-4-fluorophenyl] methyl) -2H-phthalazin-1-one

**ADN** :Acide disoxyribonucléique

**AMBER** :Assisted Model Building with Energy Refinement

**ASF** :Anti Silencing Factor 1

**Caf-1** : Chromatin Assembly Factor I

**Cdc7-Dbf4** :La protéine kinase liée au cycle 7

**CDK** : kinases dépendante des cycline

**CHARMM** :Le département de chimie de HARvard Macromolecular Mechanics

**CSE** : cellule souche embryonnaire

**DISO-PRED** : Prédiction bioinformatiques des propriétés des domaines de reconnaissance peptidique

**DSS** :disuccinimidyl suberate

**ECEPP** :Le programme d'énergie conformationnelle empirique pour les peptides

**EDC** :1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide

**EMSA** :Electrophoretic Mobility Shift Assay

**FRET** : Fluorophore Förster Resonance Energy Transfer

**GFP** :Green Fluorescent Protein

**H3** :Histone3

**H4** : Histone4

**HDAC 1** :Histone Deacetylase

**Hela** :Henrietta Lacks cells (HeLa) par des vecteurs

**HIRA** :Histone cell cycle RegulAtor

**HJURP** :Holiday junction recognition protein

**HP1** : Heterochromatin protein 1

**HX-MS** :la spectrométrie de masse à échange d'hydrogène-deutérium

**MD** : dynamique moléculaire

**MM** : mécanique moléculaire

**MMFF** : Merck molecular force field

**NAD+** :nicotinamide adénine dinucléotide

## LISTE DES ABREVIATIONS

**NURD** : Nucleosome Remodeling Deacetylase  
**NURF** :Nucleosome Remodeling Factor  
**OLPS** : potentiels optimisés pour les simulations de liquides  
**PAR** : poly (ADP-ribose)  
**PARP** : poly (ADP-ribose) polymérase  
**PCNA** : Proliferating Cell Nuclear Antigen  
**Pdb** :protein data bank  
**pEBV** :Epstein-Bar Virus  
**PRC2** : Polycomb Repressive Complex  
**PROTAC** : Proteolysis Targeting Chimeras  
**RMN** :résonance magnétique nucléaire  
**RPA** :Replication protein A  
**SCM3** :Suppressor de chromosome missegregation  
**Spdbv** :Swiss-PdbViewer  
**SUMO** : Small ubiquitin-like modifier  
**UFF** :champ de force universel  
**WHD** : winged helix domain  
**XL-MS** : spectrométrie de masse à réticulation chimique

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> :L'absence de CAF-1 favorise la décondensation de la chromatine et le retour des CSE à l'état totipotent.....	5
<b>Figure 2</b> :Réticulation chimique des complexes CAF-1(A)et CAF-1H3/H4(B) .....	9
<b>Figure 3</b> : Modèle d'assemblage de nucléosomes médié par CAF-1 .....	16
<b>Figure 4</b> :Recrutement de CAF-1 aux sites des dommages d'ADN .....	20
<b>Figure 5</b> :La structure de PARP-1 .....	24
<b>Figure 6</b> : le pourcentage moyen d'inhibition de la PARP dans les cellules mononucléaires en association avec des doses croissantes d'olaparib .....	25
<b>Figure 7</b> :la structure chimique de l'olaparib .....	39
<b>Figure 8</b> :Protocole de calcul.....	40
<b>Figure 9</b> :Diagramme2D d'interactions .....	44

## LISTE DES TABLEUX

<b>Tableau 1:</b> les different type de champ de force .....	29
<b>Tableau 2:</b> Les donn�e cristallographique de la protéine PARP.....	38
<b>Tableau 3 :</b> les don�e cristallographique de ligand co-cristallis�e avec le PARP-1 .....	38
<b>Tableau 4 :</b> Cellule unitaire.....	38
<b>Tableau 5:</b> software package.....	39
<b>Tableau 6 :</b> Différentes poses obtenu lors du docking moléculaire .....	41
<b>Tableau 7:</b> les acide aminé impliqu�e dans l'interaction .....	42

# Introduction

## Introduction

Juste après la fécondation, les premières cellules disposent d'un pouvoir extraordinaire: générer tous les tissus et les organes de l'embryon, et même les annexes indispensables à son développement, comme le placenta et le cordon ombilical. Cette plasticité cellulaire totale, appelée « totipotence ».

Au fil de leurs divisions, les cellules perdent cette capacité. Elles deviennent des cellules-souches embryonnaires pluripotentes, capables de produire les différentes cellules de l'organisme, mais pas les annexes.

Les cellules totipotentes embryonnaires peuvent produire des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires et générer des organismes entiers. Chez la souris, ce niveau de plasticité du génome est conservé dans les embryons à 2 cellules, mais il est absent chez les cellules embryonnaires aux stades ultérieurs du développement. Il a été récemment démontré que des cellules de type totipotent apparaissent spontanément dans les cultures de cellules souches embryonnaires et que l'épuisement du chaperon histone Chromatin Assembly Factor I (CAF-I) augmente l'abondance des cellules de type 2 cellules. Des études proposent que l'absence de CAF-I confère une totipotence aux cellules embryonnaires et que son activation déclenche des modifications de la chromatine qui remettent l'épigénome en place pour la différenciation cellulaire.

Au cours du développement embryonnaire, les cellules deviennent progressivement restreintes dans leur potentiel de différenciation. On pense que cela est régulé par des changements dynamiques dans la structure de la chromatine et les modifications associées, qui agissent ensemble pour stabiliser des lignées cellulaires spécialisées distinctes. De façon remarquable, les cellules différenciées peuvent être reprogrammées expérimentalement à un état semblable à une cellule souche ou à des lignées alternatives. Ainsi, la reprogrammation cellulaire fournit une plate-forme précieuse pour étudier les mécanismes qui sauvegardent normalement l'identité cellulaire et découvrir les facteurs dont la manipulation facilite les transitions du destin cellulaire. Des travaux récents ont identifié le complexe du facteur d'assemblage de la chromatine CAF-1 comme une barrière puissante à la reprogrammation cellulaire. En outre, CAF-1 a été impliqué dans la réversion des cellules pluripotentes à un état de type totipotent et dans divers paradigmes de conversion de lignage, suggérant que la modulation des niveaux de CAF-1 peut doter les cellules d'un état de développement plus

plastique. Dans ce travail, nous nous proposons de concevoir des inhibiteurs de la protéine CAF-1 pour le maintien de la totipotence. A l'aide d'outils informatiques (la modélisation moléculaire) et plus précisément le docking moléculaire (assemblage ou arrimage moléculaire). Cette approche a rapidement investi le domaine de la recherche en biologie. Celui-ci peut être défini comme la recherche du meilleur appariement entre deux molécules. De plus, il est à noter que la majorité des recherches actuelles dans le domaine du développement des médicaments et des substances physiologiquement actives sont basés sur des calculs de modélisation (Drug design). Il n'est donc, pas étonnant que ces méthodes sont devenues le centre d'intérêt d'une grande communauté de chercheurs dans les secteurs des sciences du vivant.

Le présent manuscrit s'articule autour de trois chapitres

1. Le premier chapitre, présente un rappel bibliographique sur le développement des organismes multicellulaires d'une part et d'autre part. L'étude de l'impact de l'inhibition de PARP-1 sur les mécanismes de recrutement de certains facteurs chromatinien. Notre choix s'est initialement porté sur le facteur CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1), facteur impliqué dans la formation des nucléosomes au cours de la réplication et qui joue également un rôle dans la réparation des lésions induites par les UV-C.

2. Le deuxième chapitre de ce manuscrit concerne Les principales approches de la modélisation moléculaire.

3. Dans un troisième chapitre, nous nous exposerons les résultats et la discussion de l'étude qui consiste à étudier l'interaction entre PARP et Olaparib comme une nouvelle stratégie pour le maintien de la totipotence.

# Chapitre I : Synthèse Bibliographique

## 1. Chromatin assembly factor 1 et la plasticité cellulaire

Le développement des organismes multicellulaires englobe des étapes distinctes de structuration et de spécification de la lignée, ce qui entraîne la production de tous les types de cellules spécialisées du corps adulte. Chez les mammifères, les zygotes fécondés et les blastomères de l'embryon au stade du clivage représentent l'état la plus plasticité en développement et sont donc appelés "totipotents", ce qui définit la capacité des cellules à produire toutes les lignées embryonnaires et extra-embryonnaires de l'organisme en développement

Contrairement au cas de la pluripotence, le mécanisme qui sous-tend la régulation moléculaire de la totipotence reste largement inconnu. Chez la souris, seuls le zygote et les blastomères à deux stades cellulaires peuvent générer un organisme entier sont donc considérés comme des cellules totipotentes (Tarkowski,1959). La morphologie des embryons à deux cellules sont caractérisées par l'absence de chromocentres colorés au 4,6-diamidino-2phénylindole (DAPI) dans le noyau (Probst et al,2007), et la forte mobilité de la chromatine au stade deux cellules diminue progressivement avec le développement (Boskovic et al,2014). Le profil transcriptionnel des embryons à deux cellules sont caractérisé par l'activation des principaux satellites , MERVL, et des gènes spécifiques aux deux cellules, tels que les gènes de type Eif1a (qui comprennent Gm5662, Gm2022, Gm4027, BB287469, Gm2016, Gm21319, Gm8300 et Gm10264), les gènes Zscan4 (Zscan4b-Zscan4f), Zfp352 et les gènes Tdpoz (Tdpoz1-Tdpoz5) (Evsikov et al,2004).

Dans un article récent, Ishiuchi et al ont rapporté que la déplétion de deux sous-unités différentes d'un chaperon d'histone appelé Chromatin Assembly Factor I (CAF-I) augmente considérablement la proportion de cellules de type 2C-like dans les cultures de cellule souche embryonnaire (CSE). Les auteurs ont démontré que l'activité de promotion des cellules 2C-like du CAF-I nécessite sa fonction d'assemblage des nucléosomes et un passage par la phase S précoce.

En outre, l'analyse du domaine de la sous-unité p150 du CAF-1 a clairement montré que les régions nécessaires au dépôt d'histones étaient également requises pour maintenir de faibles niveaux de cellules 2C-like. Par conséquent, les données suggèrent fortement que c'est le dépôt d'histones par le CAF-1 qui limite la totipotence dans les cultures d'CSE de souris.

Les auteurs démontrent également que la sous-unité p60 de CAFI est absente des cellules 2C-like et que son absence est corrélée avec le moment d'expression de MERVL.

Les cellules totipotentes sont les seules cellules métazoaires proliférantes qui manquent de CAF-1 (Ishiuchi et al, 2015).

L'article d'Ishiuchi et al montre que l'épuisement des CAF-I dans les embryons de souris provoque un arrêt du développement au stade 16 cellules. La même étude a signalé que l'épuisement des CAF-1 dans les cellules CSE cultivées entraîne une décondensation et une perte de l'agrégation d'hétérochromatine.

Dans l'ensemble, ces études suggèrent qu'en l'absence de CAF-I, les cellules embryonnaires totipotentes ne se différencient pas en cellules pluripotentes. Sachant que l'assemblage de la chromatine et le passage à la phase S sont nécessaires pour accéder à la phase de pluripotence. Toutefois, le rôle précis des CAF-I dans ces processus reste encore mal compris.

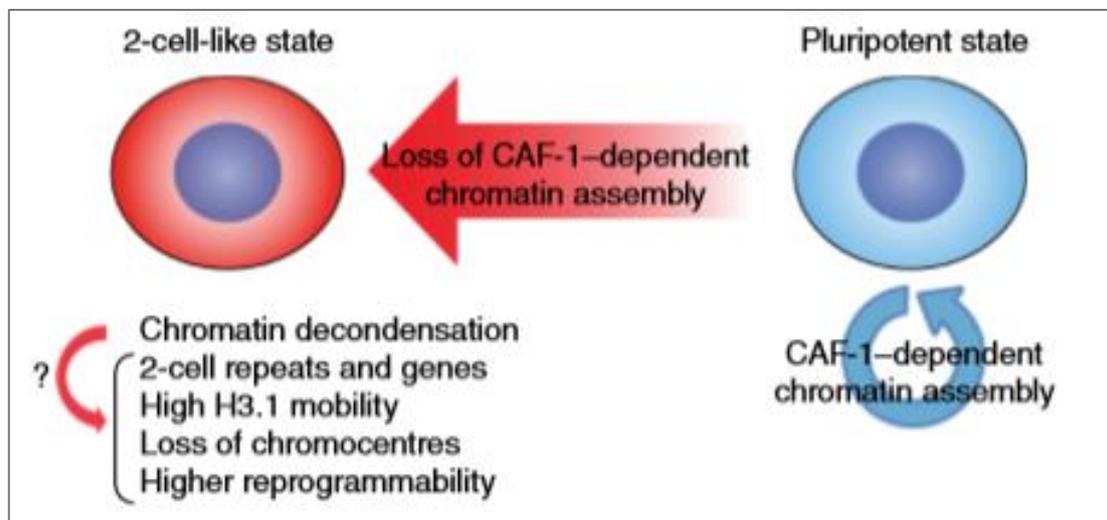
Le CAF-I est un facteur bien connu qui participe à la première étape de ré-assemblage de la chromatine dans le sillage de la fourche de réplication (Kaufman et al, 2015) (Alabert et al, 2012).

Son rôle clé est de déposer les histones H3/H4 dans les nucléosomes nouvellement synthétisés (Alabert et al, 2012). Chez *S.cerevisiae*, la destruction de la sous-unité Cac1 de CAF-I (l'homologue de levure de la sous-unité p150CAF-I de mammifère) entraîne une dé-répression massive des gènes subtélomériques. (Jeffery et al, 2013) (Sharp et al, 2002), ces gènes alternent normalement entre un état d'expression totalement silencieux ou totalement actif.

Ce phénomène épigénétique intéressant est appelé effet de position télomérique (Rusche et al, 2003) (Yankulov et al, 2013).

Cependant, une étude récente a souligné que la perte de l'extinction des gènes télomériques dans les cellules *Dcac1* devrait être attribuée à la faible fréquence des conversions entre les états actif et silencieux plutôt qu'à une réduction générale de l'extinction (Jeffery et al, 2013). Par conséquent, cet article suggère que chez *S.cerevisiae*, CAF-I est impliqué dans les conversions épigénétiques. Ishiuchi et al. ont résumé leur résultat dans un modèle (Figure 1), qui met l'accent sur l'effet causal de l'épuisement des CAF-I dans la génération de cellules de

type 2C-like (Ishiuchi et al ,2015) (Kaufman et al,2015) . Cependant, ce modèle n'examine pas de manière approfondie les mécanismes possibles par lesquels les cellules de type 2C-like apparaissent et disparaissent dans les cultures de l'ECS



**Figure 1** :L'absence de CAF-1 favorise la décondensation de la chromatine et le retour des CSE à l'état totipotent. (Ishiuchi et al ,2015)

## 2. Architecture du CAF-1

Le complexe CAF1 fait partie de la machinerie qui maintient la structure de la chromatine dans les cellules humaines (Kaufman et al, 1995). CAF1 est une protéine histone chaperonne qui positionne les dimères des histones H3 et H4 dans les nucléosomes sur la chromatine nouvellement synthétisée, en particulier pendant la phase S (Tagami et al, 2004).

C'est un complexe hétérotrimérique, conservé, comprenant trois sous-unités protéiques («grandes», «moyennes» et «petites»), (p150, p60 et p48) chez l'humain (erreault et al, 1996), avec des homologues chez les levures (Cac1,Cac2,Cac3), les insectes, les plantes et les vertébrés (Exner et al, 2006) (Ridgway et al, 2000).

Plus récemment, il a été signalé que la CAF1 est également importante pour le maintien d'états cellulaires différenciés chez la souris (Cheloufi et al, 2015)

### 2.1. La plus grande sous-unité

La séquence primaire de la grande sous-unité est modérément conservée entre les espèces, à l'exception des insertions ou délétions de courte séquence. Les graphiques DISO-PRED( Prédiction bioinformatique des propriétés des domaines de reconnaissance peptidique ) (Jones& al,2015) prédisent que la grande sous-unité contient de nombreuses régions

protéiques intrinsèquement désordonnées( Sauer et al,2017)(Liu et al,2012)( Mattioli et al,2017). La partie N-terminale contient deux régions importantes: un étirement qui est enrichi en acides aminés K / E / R (KER), et un motif de peptide d'interaction Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (boîte PIP). La région KER conservée devrait former une superhélice qui se lie à de longs fragments d'ADN ( ~ 40 pb), suggérant une fonction lors de la reconnaissance de l'ADN du substrat et potentiellement du dépôt d'histones (Sauer et al ,2017 ).

Le motif de la boîte PIP médie l'interaction avec le PCNA (Krawitz et al,2002 , Moggs et al,2000 ). Notamment, plus d'un motif PIP est présent dans la plupart des complexes CAF-1, ce qui implique une hiérarchie complexe d'interactions entre CAF-1 et la machinerie de réplication (Rolef et al,2009 ).

La région C-terminale devrait former un domaine structuré (Kaufman et al,1995 ). Selon l'espèce, d'autres domaines d'interaction protéine-protéine sont présents dans les régions N- et C-terminales, y compris les régions de liaison SUMO2 / 3 et HP1 dans l'isoforme humaine (Uwada et al,2010 , Thiru et al,2004 )

Sur la base d'expériences biochimiques et biophysiques comprenant la spectrométrie de masse à réticulation chimique (XL-MS), la spectrométrie de masse à échange d'hydrogène-deutérium (HX-MS) et la mutagenèse, la partie centrale de la grande sous unité s'est avérée responsable de la liaison de la petite sous-unité (Krawitz et al,2002 , Sauer et al ,2017 , Mattioli et al,2017). Le domaine ED acide adjacent est responsable de la liaison aux histones (Sauer et al ,2017. Mattioli et al,2017 , Mattioli et al,2017. , Liu et al,2016 ). Un segment C-terminal au domaine ED est le site de liaison pour la sous-unité médiane ((Krawitz et al,2002),(Sauer et al ,2017) , (Mattioli et al,2017)).

Le domaine C-terminal de la grande sous-unité contient winged helix domain (WHD) conservé qui a été cristallisé et caractérisé structurellement(Liu et al,2016 . Zhang et al,2016 ).

Les résultats des recouvrements montrent que le WHD est également situé dans la proximité de H3-H4 (Liu et al,2016). Il est important de noter qu'il associe spécifiquement les séquences à 10-16 bp d'ADN avec une KD environ 2 M (Zhang et al,2016) et est impliquée dans le silençage de la chromatine. La WHD participe également à la tétramérisation H3 – H4 et à la régulation de l'activité d'assemblage nucléosomiques du CAF-1 in vitro et in vivo (Mattioli et al,2017, Zhang et al,2016).

### 2.1.1. La Cac1 est suffisante ? pour la tétramérisation (H3 / H4)<sub>2</sub>

L'équipe de Churchill mesurer la contribution de la liaison de chaque sous unité CAF-1 avec les histone H3,H4, les sous-unités ont été purifiées pour une utilisation dans des expériences d'anisotropie de fluorescence avec H3 / H4 marqué au pyrène (H3 / H4<sup>Py</sup>). Chaque sous-unité a été titrée indépendamment en une concentration fixe de H3 / H4<sup>Py</sup>, induisant une augmentation dépendant de la concentration de l'anisotropie de fluorescence du pyrène qui a permis de mesurer les constantes de liaison. Conformément aux expériences antérieures, CAF-1 se lie à H3 / H4 avec une faible affinité nanomolaire (KDapp = 5,3 nM) Winkler et al., 2012b ; Liu et al., 2012 ).

Bien que toutes les sous - unités de CAF-1 aient augmenté l'anisotropie de H3 / H4<sup>Py</sup> à des concentrations élevées (1mM), seul Cac1 a atteint une liaison saturable avec une affinité submicromolaire pour H3 / H4 (KDapp = 97 nM). Les titrages Cac2 et Cac3, par contre, n'ont pas atteint la saturation et ont montré une faible affinité pour H3 / H4. Ces résultats suggèrent que Cac1 contribue substantiellement à la liaison H3 / H4, et les autres sous-unités fournissent des interactions accessoires pour promouvoir un complexe CAF-1-H3 / H4 de haute affinité (liu et al,2016) .

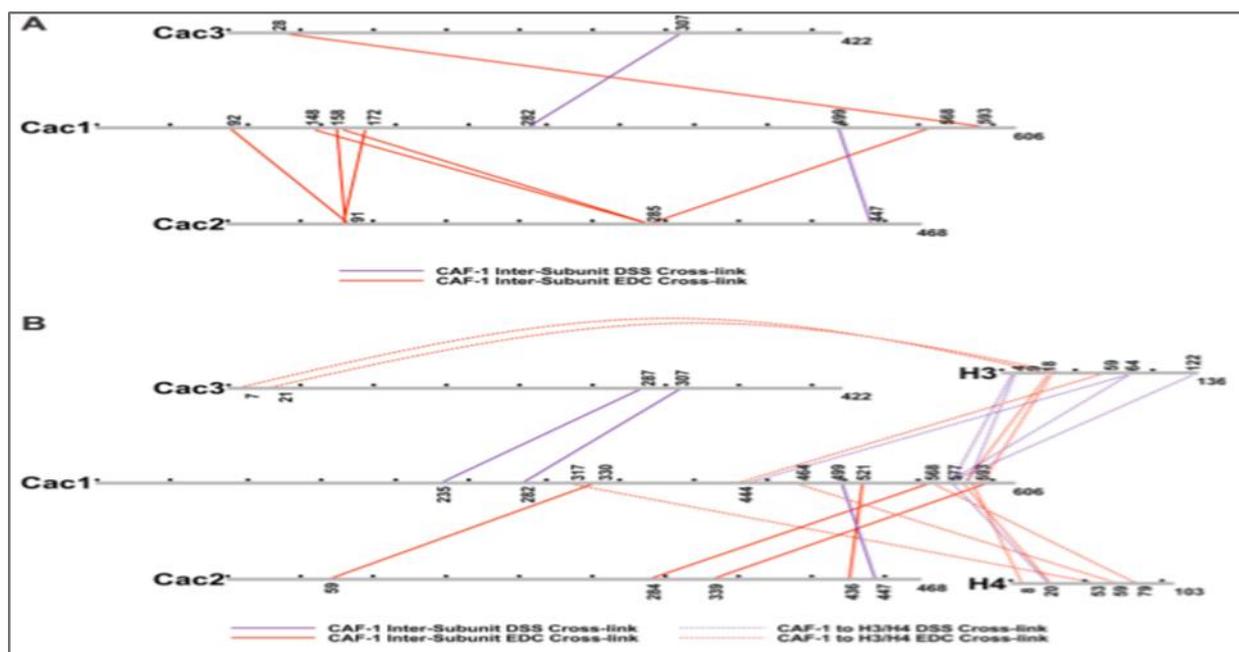
Cac1 est suffisant pour tétramériser H3 / H4 et semble également agir comme un échafaudage pour les autres sous-unités CAF-1. Cependant, l'expérience HX rapporte des régions Cac1 avec des changements de deutération qui pourraient être dus soit à des interactions protéine-protéine directe , soit à des effets indirects résultant de changements de conformation allostériques ou de dynamiques conformationnelles . Pour fournir des informations plus directes sur les interactions physiques qui façonnent l'architecture CAF-1-H3 / H4, wallace et al ont utilisé la réticulation chimique avec le DSS (disuccinimidyl suberate) ou le chlorhydrate d'EDC (1-éthyl-3- (3-diméthylaminopropyl) carbodiimide. ) couplée à la spectrométrie de masse (CX-MS) ( Walzthoeni et al., 2013 ). Identification des résidus liés peut indiquer des régions impliquées dans les interactions protéine-protéine , et éventuellement identifier des interactions tertiaires et quaternaires (liu et al,2016) .

Pour identifier les peptides réticulés, l'équipe de Mair EA Churchill ont digéré les complexes CAF-1 ou CAF-1-H3 / H4 avec trypsin, trypsine et GluC, ou trypsine et LysC, puis LC-MS / MS. ils ont utilisé le package Protein Prospector ( Chu et al., 2010 ) de l'UCSF pour identifier les peptides réticulés .

Les données collectives issues des recherches ont permis de créer une carte des liens pour les sous-unités CAF-1 et H3 / H4 (Figure 2A). En plus des réticulations inter-sous-unités, de nombreuses réticulations intra-protéiques ont été observées. Ces réticulations sont particulièrement répandues dans Cac1 dans les cinquante premiers acides aminés, les résidus 118 à 334 et les résidus 460 à 593. Celles-ci peuvent révéler des régions repliées dans Cac1, car les domaines flexibles et dépliés ne peuvent probablement pas établir de liaisons croisées stables (Leitner et al., 2010).

De nombreux liens croisés ont été observés entre CAF-1 et H3. Plusieurs résidus dans la Cac1 C-terminal (577–593) sont proximaux à la fois aux lysines H3 N-terminales (4 et 18) et à une lysine C-terminale 122. L'hélice N-terminale prévue de Cac3 est également réticulée à l'extrémité N-terminale de H3. Notamment, les lysines 444 et 577 de Cac1 réticulent avec les hélices  $\alpha$ N et  $\alpha$ 1 de H3 (Cac1 K444 à H3 K64, Cac1 K577 à H3 K64 et Cac1 K444 à H3 E59) (Figure 2B). Ces résidus sont proches dans l'espace de H3-K56 et renforcent les rapports selon lesquels la mutation ou l'acétylation de H3-K56 modifie la liaison à Cac1 (Winkler et al., 2012b ; Li et al., 2008).

La moitié C-terminale de Cac1 est également impliquée dans la réticulation à l'histone H4. Les résidus 577–588 de Cac1 réticulent à la queue N-terminale de H4 et au centre via H4K79. K79 est immédiatement adjacent à l'hélice H4  $\alpha$ 2, qui se réticule également avec d'autres résidus Cac1 (H4 E53 à Cac1 K317 et H4 K59 à Cac1 E464) (Figure 2B). Il est important de noter que les résidus Cac1 impliqués dans la réticulation des histones sont situés dans des peptides qui présentent des changements significatifs de HX lors de la liaison H3 / H4. Notamment, ces peptides comprennent les résidus 317 et 464, dont les délétions compromettent la résistance dépendante de CAF-1 aux dommages à l'ADN *in vivo*. Ainsi, la moitié C-terminale de Cac1 est impliquée dans des liaisons croisées avec les domaines de queue et de centre de H3 et H4 (Liu et al., 2016).



**Figure 2 :**Réticulation chimique des complexes CAF-1(A)et CAF-1H3/H4(B)(Liu et al ,2016)

Bien que les expériences de capture chimique génèrent des modèles utiles d'interactions protéine-protéine, la présence ou l'absence de liaisons croisées capturées, ou l'abondance de liaisons croisées, ne sont pas indicatives de constantes de liaison d'équilibre, qui devraient être mesurées par des expériences biophysiques. Comme l'extrémité C-terminale de Cac1 a des liaisons croisées étendues avec H3 / H4, wallace et al pensé que toute cette région pourrait être responsable de la liaison et de la tétramérisation H3 / H4. Pour tester cette hypothèse et identifier une telle région minimale, ont été conçues des délétions en série de N-terminales, qui incluait le domaine ED à travers l'extrémité C-terminale. Des protéines tronquées commençant aux résidus 386 (Cac1 386), 421 (Cac1 421), 454 (Cac1 454) et 457 (Cac1 457) ont été exprimées et purifiées à partir de *E. coli*. Cac1 386, Cac1 421 et Cac1 457 ont été comparés pour la capacité à induire la tétramérisation des histones dans le dépôt d'ADN H3 / H4 Electrophoretic Mobility Shift Assay( EMSA), ainsi que dans le test Fluorophore Förster Resonance Energy Transfer (FRET) H3 / H4. Les deux méthodes biophysiques révèlent que les acides aminés 386–606 de Cac1 sont compétents pour la tétramérisation des histones, alors que Cac1 421et Cac1 457 ne le sont pas. Ces résultats suggèrent que les résidus 386–457 de Cac1 - qui chevauchent une grande partie du domaine ED peuvent être responsables d'une partie importante des interactions de la liaison entre Cac1 et H3 / H4. Pour tester cela, la même étude utilisé l'anisotropie de fluorescence Cac1 386 et Cac1 454 marqué au pyrène (Cac1 386<sup>Py</sup> et Cac1 454<sup>Py</sup>, successivement) pour surveiller les changements d'anisotropie du pyrène avec liaison H3 / H4. Dans ce test, Cac1 386<sup>Py</sup> se lie à H3 / H4 (K Dapp = 210 nM) avec une affinité

légèrement plus faible que celle du Cac1 sur toute sa longueur se liant à H3 / H4 ( $K = 97 \text{ nM}$ ). La liaison de Cac1 454<sup>Pr</sup> à H3 / H4, par contre, était significativement plus faible. Ensemble, ces données révèlent que Cac1 386 se lie à H3 / H4 et est suffisante pour la tétramérisation des histones (Liu et al, 2016).

## 2.2 La sous-unité moyennes

Les prédictions de structure secondaire indiquent que la sous-unité centrale de CAF-1 contient des répétitions WD40. Cette sous-unité contribue à l'interaction de CAF-1 avec Anti Silencing Factor 1 (ASF1), le véhicule de livraison pour H3 – H4 (Tagami et al, 2004, Tyler et al, 2001, Liu et al, 2012, Tang et al, 2006, Malay et al, 2008). Une grande partie de l'interaction avec ASF1 se produit via une extension C-terminale appelée domaine B (Malay et al, 2008). Un analogue domaine B est également trouvée dans le chaperon d'histone Histone cell cycle Regulator (HIRA), qui dépose H3-H4 dans le contexte de la transcription de l'ADN et l'inactivation de l'hétérochromatine (Tang et al, 2006, Kaufman et al, 1998). Cela suggère que la compétition des deux domaines B (de CAF-1 et de HIRA) pour le même site de liaison sur ASF1 fait partie du mécanisme de régulation par lequel les variables d'histone se distribuent vers leurs voies de dépôt appropriées (Tyler et al, 2001, Tang et al, 2006, Malay et al, 2008, Mello et al, 2002). Le domaine B et les histones se lient sur des faces opposées d'ASF1, permettant potentiellement la formation d'un complexe de transfert intercellulaire de transition dans lequel ASF1 présente sa cargaison à l'accepteur (CAF-1 ou HIRA) avant de se dissocier à nouveau (Liu et al, 2012, Zhang et al, 2013). En plus de se lier à ASF1, la sous-unité centrale est également nécessaire pour l'association productive avec H3–H4, et donc pour l'assemblage des nucléosomes (Kaufman et al, 1995, Mattioli et al, 2017, Liu et al, 2016, Shibahara et al, 2000).

## 2.3. La plus petite sous-unité

Petite sous-unité Comme la sous-unité moyenne, cette sous-unité adopte également répétition WD40. Les homologues humains et de drosophile, RbAp48 et p55 ont été structurellement caractérisés (Lejon et al, 2011, Song et al, 2008). RbAp48 est aussi un constituant de plusieurs autres complexes de régulation de la chromatine, à savoir Polycomb Repressive Complex (PRC2), Nucleosome Remodeling Factor (NURF), Nucleosome Remodeling Deacetylase (NURD), and Histone Deacetylase (HDAC1), suggérant que cette sous-unité sert de pont moléculaire entre les enzymes modifiant les histones et leurs substrats (Muller et al, 2002, Martinez-Balbas et al, 1998, Xue et al, 1998, Taunton et al, 1996, Verreault

et al,1996). La petite sous-unité se lie indépendamment aux fragments de H3 et H4 en utilisant différentes surfaces d'interaction (Song et al ,2008, Nowak et al,2011 , Schmitges et al,2011 ). De plus, les structures de la drosophile p55 en complex avec des peptides H3 ou H4, indiquent que les emplacements de liaison aux histones sont probablement incompatibles avec une configuration de type nucléosome en raison d'effet stérique (Zhang et al,2013. Liu et al,2012 ). Comme ces interactions présentent une affinité significativement plus faible que le CAF-1 complet avec des dimères H3 – H4 intacts , leur importance globale pour la liaison des dimères H3 – H4 par la CAF-1 n'est pas claire. En fait, la petite sous unité de la levure Cac3 ne présente aucune interaction avec H3 – H4, même à des concentrations micromolaires in vitro (Liu et al,2016 ), et Cac3 n'est pas nécessaire pour une liaison robuste aux histones dans le contexte de CAF-1 (Mattioli et al,2017). Par conséquent, le rôle de la petite sous unité et son mode d'interaction H3 – H4 dans le contexte du CAF-1 ne sont toujours pas bien définis. La petite sous-unité apparaît également comme une sous- unité non essentielle du complexe de modificateur de la chromatine PRC2,se qui soulève des questions sur le rôle précis de cette sous-unité dans différents contextes (Wen et al,2012 , Poepsel et al,2018).

#### **2.4. Organisation générale du complexe CAF-1**

Bien qu'une structure à haute résolution du complexe CAF-1 ne soit pas encore disponible, des méthodes à basse résolution ont révélé la forme générale du complexe. Microscopie électronique à coloration négative du complexe CAF-1 • H3 – H4 à environ 30 Å. Une résolution montre une forme allongée, dans laquelle les deux sous-unités globulaires WD40 sont reliées par la grande sous-unité (Kim et al,2016 ). En solution ,ab initio SAXS envelopes ont montré une forme légèrement plus allongée que la structure EM et ont également permis le placement provisoire des sous-unités WD40 et la grande sous-unité, qui étaient en général d'accord avec les données EM de coloration négative (Sauer et al,2017 , Mattioli et al,2017). Les données Hydrogen-Deuterium exchange Mass Spectrometry (HX-MS) et Chemical Cross Linking Mass Spectrometry (XL-MS) montrent que la sous unité moyenne et la petite sous-unité interagissent directement avec la grande sous-unité, mais pas entre elles (Mattioli et al,2017 ).Les sites de liaison des deux plus petites sous-unités sur la grande sous-unité ont été déterminées par plusieurs groupes grâce à HX-MS, XL-MS, mutagenèse et dosages pull-down , et flanquent le domain acide ED (Kaufman et al, 1995 , Krawitz et al,2002 , Sauer et al,2017 , Mattioli et al,2017 , Liu et al,2016 , Kim et al,2016 ). Ainsi, les sous-unités du complexe CAF-1 effectuent une division fonctionnelle efficace - la grande sous-unité fournit un échafaudage pour les autres sous - unités CAF-1 et intervient dans le recrutement du

complexe et l'interaction avec d'autres facteurs nucléaires. La sous-unité moyenne est responsable de la communication des chaperons d'histones et de le chargement des histones, tandis que la petite sous - unité fournit des interactions d'accessoires moins bien caractérisées. Le modèle actuel suggère que H3– H4 se lie au centre du complexe chaperon d'histone, à proximité immédiate du domaine ED acide et des sous-unités WD40 (Sauer et al,2018)

## 2.5. La liaison d'histone

Les rapports initiaux indiquaient que CAF-1 se lie H3 – H4 dans une conformation dimère *in vivo* (Tagami et al,2004 , Benson et al,2006 , Nakano et al, 2016 ) et que CAF-1 pourrait former des homodimères (Quivy et al,2001 ). Des rapports ultérieurs ont suggéré que CAF-1 est monomère (Sauer et al,2017, Liu et al,2012 , Mattioli et al,2017 ), et aussi qu'une conformation d'histone tétramère pourrait exister dans le complexe (Liu et al,2012 , Winkler et al 2012. Liu et al,2017 . Winkler et al 2017). Cependant, les rapports les plus récents ont proposé un modèle mis à jour et unifié pour la façon dont le CAF-1 interagit avec les histones. Dans la levure de boulanger, le complexe CAF-1 forme un trimère contenant une copie de chaque sous unité, et il n'y a aucune indication de formation de complexe d'ordre supérieur pour la levure CAF-1 en l'absence d'histones (Sauer et al,2017, Liu et al,2012 , Mattioli et al,2017 , Liu et al,2016 ). La spectrométrie de masse native, les mesures basées sur la fluorescence et les données d'échange hydrogène-deutérium montrent que le complexe trimérique CAF-1 se lie à un seul dimère H3 – H4 avec une affinité nanomolaire à picomolaire (Sauer et al,2017, Mattioli et al,2017 , Liu et al,2016 ). Le dimère H3– H4 est lié dans une conformation telle que l'hélice H3  $\alpha$  3, qui médie les interactions H3-H3 dans le contexte d'un tétramère (H3 – H4)<sub>2</sub> , est disponible pour engager la deuxième copie du dimère H3 – H4 (Mattioli et al,2017 ). De plus, les résultats de la réticulation CAF-1 • H3– H4 indiquent la proximité de CAF-1 avec la surface de liaison à l'ADN de H3 – H4 mais pas la région de dimérisation (Liu et al,2016 ). Ensemble, ces propriétés de liaison permettent la tétramérisation H3 – H4 et la protection potentielle des surfaces de liaison à l'ADN jusqu'à ce que cela soit nécessaire pendant la réaction de dépôt d'histones (Mattioli et al,2017 , Liu et al,2016 ).

H3 – H4 se lie principalement aux sous - unités grandes et moyennes de CAF-1. Les expériences de HX-MS et de mutagenèse indiquent que les histones pourraient entrer en contact avec les brin 5 et 6 du WD40 repeat de la sous-unité centrale (Liu et al,2016). Pour les grands sous-unité, le domaine ED hautement acide est impliqué dans la liaison d'histone (Mattioli et al,2017, Liu et al,2016). Cette propriété est partagée avec d'autres chaperons d'histones qui

contiennent souvent des régions acides censées aider à neutraliser les charges positives des histones (Das et al,2010, Warren et al, 2017). En effet, même un complexe CAF-1 de conception minimale composé uniquement de la sous-unité médiane et de la région centrale de la grande sous-unité (constituée du domaine ED et du domaine de liaison à la sous-unité moyenne) peut fournir l'affinité de liaison aux histones de CAF-1 WT et effectuer l'assemblage du tétrasome in vitro (Mattioli et al,2017). De plus, une petite région de la grande sous-unité seule, comprenant uniquement les domaines ED et WHD, peut former des tétrasomes (Liu et al,2016) bien que moins efficacement que le complexe Cac1 – Cac2. La plus petite sous-unité de CAF-1 est totalement inutile pour l'assemblage tétrasome in vitro (Mattioli et al,2017, Liu et al,2016).

## 2.6. Liaison à l'ADN

Les propriétés de liaison à l'ADN de CAF-1 ont récemment attiré beaucoup d'attention car elles semblent jouer un rôle central à la fois dans le recrutement de CAF-1 vers la fourche de réplication et dans le mécanisme de dépôt d'histone. Les premières expériences utilisant du CAF-1 purifié à partir de sources endogènes n'ont révélé aucune activité de liaison à l'ADN (Smith et al,1989). Plus tard, deux domaines de liaison à l'ADN ont été identifiés et caractérisés, à savoir le domaine WHD et le domaine KER, tous deux situés dans la grande sous-unité (Sauer et al,2017, Zhang et al,2016). Les deux domaines sont importants pour l'activité d'assemblage des nucléosomes de CAF-1 (Sauer et al,2017, Mattioli et al,2017). Alors que la WHD isolée se lie à un minimum de 10 à 16 pb d'ADN, le complexe CAF-1 complet interagit préférentiellement avec des substrats d'ADN étendus  $\sim 40$  pb, probablement en raison de l'activité de liaison à l'ADN supplémentaire conférée par le domaine KER (Sauer et al,2017, 64). La liaison de la protéine pleine longueur à l'ADN est coopérative, ce qui indique que plus d'un complexe CAF-1 se lie à son substrat d'ADN en même temps (Sauer et al,2017). CAF-1 se lie préférentiellement à l'ADN linéaire mais non nucléosomique (Sauer et al,2017, Mattioli et al,2017). Alors que l'ADN linéaire adopte typiquement une géométrie de forme B régulière, la conformation de l'ADN nucléosomique est déformée et une face de la double hélice d'ADN est occluse sur l'ensemble des 147 pb (Luger et al,1997, Richmond et al,2003). Ensemble, ces résultats montrent que CAF-1 a des préférences pour la longueur, la conformation et l'accessibilité de l'ADN. Toutes ces propriétés pourraient être importantes pour l'activité de CAF-1 à la fourche de réplication en permettant à CAF-1 de reconnaître des séquences cibles linéaires d'une longueur suffisante pour accueillir les tétramères  $(H3 - H4)_2$  et être libérés de l'ADN une fois que les histones ont été déposés. Cet ADN de forme B linéaire et étendu est

présent au niveau des fourches de réplication et, en coopération avec la pince de processivité PCNA, pourrait faciliter le recrutement de CAF-1 à ces emplacements, afin de promouvoir l'assemblage des tétrasomes (Zhang et al,2016, Gasser et al,1996 , Sogo et al,1986 ). En revanche, les courtes longueurs de liaisons d'ADN entre des nucléosomes assemblés pourraient interférer avec la reconnaissance du substrat par CAF-1 et ainsi restreindre sa fonction de chaperon d'histone aux fourches de réplication. Un tel mécanisme de recrutement pourrait également expliquer en partie pourquoi les mutants de délétion KER et WHD de CAF-1 sont défectueux dans l'assemblage de la chromatine de réplication dans des extraits cellulaires dans des conditions physiologiques ( Kaufman et al, 1995 , Sauer et al,2017 ).

La capacité du CAF-1 à se lier à l'ADN est une caractéristique que l'on observe, après un examen plus approfondi, est partagée avec de nombreux autres chaperons H3 – H4 qui déposent des histones sur l'ADN. Rtt106, HIRA, Replication protein A (RPA), Holiday junction recognition protein (HJURP) (et son homologue de levure Suppressor of chromosome missegregation (Scm3) ont tous été montrés pour se lier à l'ADN avec des affinités variées mais généralement dans la gamme micromolaire moyenne à faible, similaire à CAF-1 (Liu et al,2010. Ray-Gallet et al ,2011. Xiao et al ,2011. Kato et al, 2007). Il n'y a pas d'information sur la façon dont cette liaison se produit (Sauer et al,2018)

### **3. Modèle d'assemblage de nucléosomes médié par CAF-1 pendant la réplication**

#### **3.1. Formation de tétrasomes**

La formation du complexe tétramère-ADN H3 – H4, connu sous le nom de tétrasome, ne nécessite pas d'hydrolyse de l'ATP, mais est plutôt due à la forte affinité des tétramères  $(H3 - H4)_2$  pour l'ADN dans un mécanisme guidé par CAF-1.

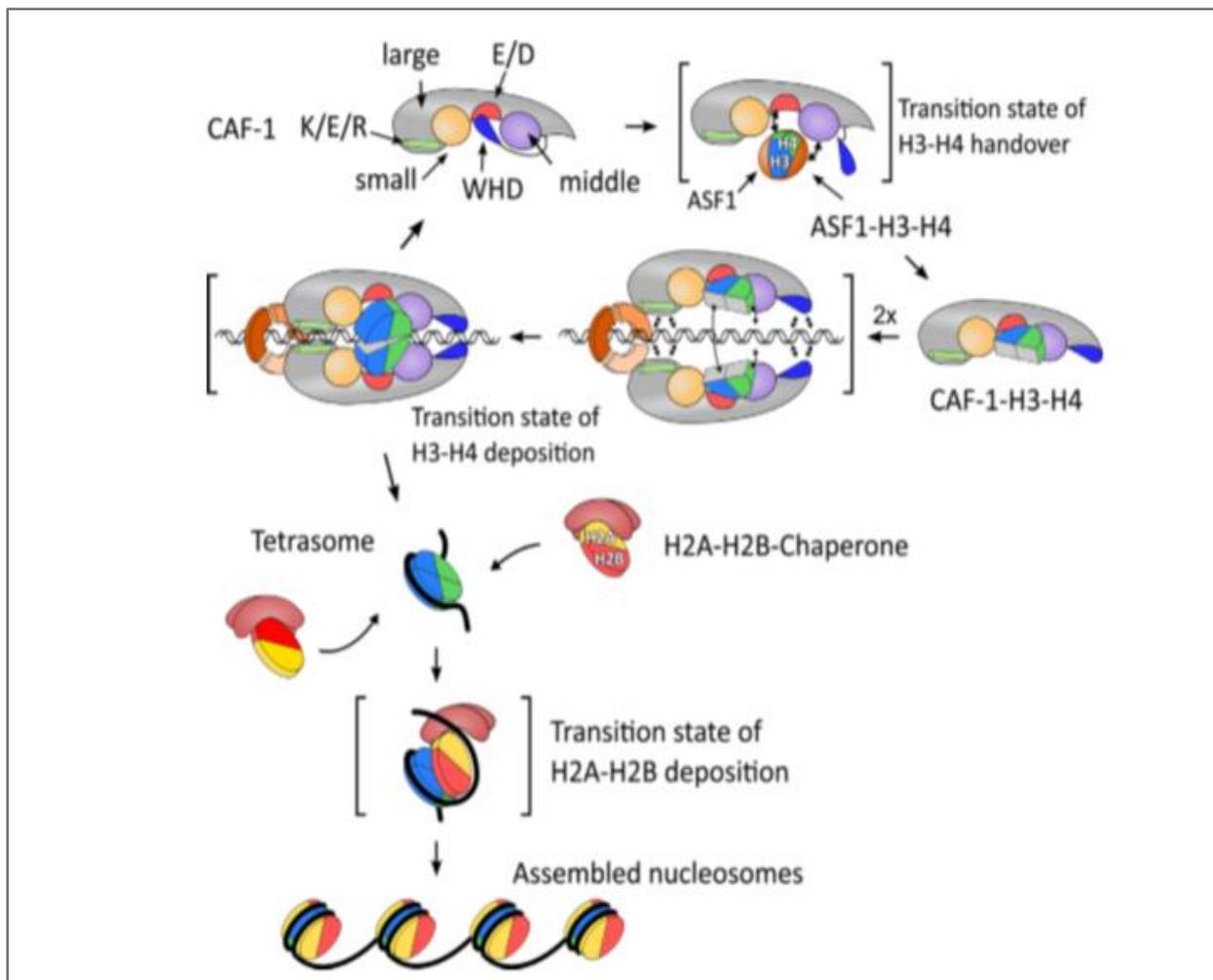
La découverte que CAF-1 se lie à un seul dimère H3 – H4 et se lie de manière coopérative à l'ADN de manière dépendante de la longueur suggère un mécanisme de formation de tétrasomes. Les résultats des deux groupes suggèrent que l'étape de dépôt nécessite l'association de deux CAF-1 • H3-H4 complexes, qui s'assemblent sur l'ADN, suivie par le dépôt d'un concerté tétramère H3- H4 (Figure 3 ) (Sauer et al,2017 , Mattioli et al,2017 ).

En utilisant des fragments d'ADN de différentes longueurs, le laboratoire Luger a pu révéler des étapes intermédiaires dans le mécanisme de dépôt de H3 – H4 médié par CAF-1.

Des études de cross-linking en solution montrent que l'association de deux complexes CAF-1 • H3 – H4 dépend de la capacité de liaison de la grande sous-unité à l'ADN (Mattioli et al,2017 ).

La WHD joue un rôle important dans le mécanisme qui permet le dépôt H3 – H4. En l'absence de la H3 – H4, la surface de liaison à l'ADN chargée positivement de la WHD engage le domaine ED acide, ce qui auto-inhibe les interactions potentielles WHD – ADN. Lors de la liaison de H3 – H4 au domaine ED, cette interaction est déstabilisée et le WHD devient disponible pour l'engagement de l'ADN. Étant donné que la WHD se lie à l'ADN de manière coopérative, cela renforce considérablement l'association ultérieure de deux complexes CAF-1 • H3 – H4, et les mutations du WHD qui interfèrent avec la liaison de l'ADN abolissent la dimérisation des complexes CAF-1 • H3 – H4 (Mattioli et al,2017 ). La tétramérisation de H3 – H4 nécessite l'interaction d'hélices H3  $\alpha$ 3. Notamment, la mutation de l'interface de tétramérisation H3  $\alpha$ 3 permet toujours une interaction H3 – H4 avec CAF-1 ou l'ADN mais perturbe le dépôt concerté des dimères H3 – H4 et de l'assemblage tétrasome (Sauer et al,2017, Mattioli et al,2017).

Cette découverte, associée à des expériences de cross-linking, suggère que les deux hélices  $\alpha$ 3 des dimères H3 – H4 sont positionnées à proximité l'une de l'autre avant le dépôt (Mattioli et al,2017). Dans l'étape finale, CAF-1 libère les histones une fois qu'un tétrasome s'est formé avec succès.



**Figure : 3** Modèle d'assemblage de nucléosomes médié par CAF-1(Sauer et al,2018)

En l'absence d'histones, la WHD C-terminale est inaccessible en raison de la séquestration par le domaine ED. L'ASF1 transfère un seul dimère H3 – H4 à CAF-1, ce qui entraîne la libération de la WHD. Deux complexes CAF-1 • H3 – H4 s'associent en étroite proximité l'un de l'autre, grâce aux contacts PCNA – CAF-1 et ADN – CAF-1. L'association transitoire de deux complexes CAF-1 • H3 – H4 sur l'ADN permet aux contacts H3-H3 de se former et les deux complexes chaperons d'histones déposent de façon concertée un tétramère (H3 – H4)<sub>2</sub> sur l'ADN avant d'être libérés de l'ADN. Au cours de la deuxième étape d'assemblage, les chaperons d'histones H2A – H2B médient le dépôt de H2A – H2B sur le tétramère préexistant formant des nucléosomes complets.

### 3.2. La dimérisation régulée des chaperons d'histones guide l'assemblage des nucléosomes

La dimérisation des chaperons d'histones est probablement un moyen de contrôler l'état d'oligomérisation de H3 – H4 lui-même: vraisemblablement, le maintien de H3 – H4 sous forme de dimères représente une réponse à la nécessité de contrôler et de limiter la tétramérisation des histones réaction lors de tâches critiques.

Au fur et à mesure de la réplication de l'ADN, l'assemblage de la chromatine influe sur la vitesse à laquelle la fourche de réplication progresse (Mejlvang et al,2014 , Kurat et al, 2017. Devbhandari et al,2017. Azmi et al,2017).

Le dépôt rapide de nouveaux tétramères (H3 – H4) est donc essentiel pour éviter le blocage des fourches de réplication et l'instabilité génomique. L'association concertée de CAF-1 lié à l'histone par l'ADN assure un mécanisme rapide et contrôlé et réduit la possibilité d'interactions improductives.

Sur le plan thermodynamique, l'énergie libre associée à la tétramérisation H3– H4 sur l'ADN est la somme des réactions partielles, qui présentent des dépenses énergétiques opposées: dans l'ensemble, l'ADN doit être déformé de manière substantiellement à une dépense énergétique élevée. Cela doit être compensé par une énergie favorable de l'établissement de contacts entre H3 – H4 et l'ADN, la formation du faisceau à quatre hélices H3-H3 et l'effet hydrophobe. La présence de tous ces éléments serait nécessaire pour fournir à l'ensemble du chemin d'assemblage l'énergie libre nécessaire pour procéder de manière ordonnée. Tout comme une enzyme, le CAF-1 favorise un microenvironnement optimal, ce qui permet la formation de ces contacts.

De plus, la tétramérisation d'histone et le dépôt d'ADN concerté pourraient établir la directionnalité de la réaction et expliquer pourquoi les chaperons de pierre comme le CAF-1 ne catalysent pas les réactions de désassemblage des nucléosomes - le coût énergétique de la division des tétrasomes et du déroulement de l'ADN est tout simplement trop élevé et ne peut être accompli qu'à l'aide de remodeleurs ou d'hélicases dépendant de l' ATP .

En conclusion, l'exploitation de l'énergie de liaison à l'ADN dirigée de H3 – H4 par les chaperons d'histones soutient le mécanisme qui les rend indépendants de l'hydrolyse de l'ATP, tout en offrant un haut degré de directionnalité pour le processus de dépôt H3 – H4 (Sauer et al,2018)

### **3.3. Régulation du recrutement de CAF-1 par des modifications post-traductionnelles**

Le dépôt d'histones par CAF-1 est probablement régulé non seulement par d'autres protéines mais également par des modifications post-traductionnelles sur le chaperon d'histone ainsi que sur les histones. L'activité de CAF-1 avec la réplication de l'ADN est régulée par la

phosphorylation dépendante de CDK des sous unités p150 et p60 de CAF-1 (Keller et al, 2000 , Jeffery et al,2015 ).

Il est important de noter que CAF-1 forme également un complexe distinct avec la kinase de réplication essentielle Cdc7-Dbf4 *in vivo*, ce qui suggère que l'activité de CAF-1 est régulée tout au long du cycle cellulaire par phosphorylation (Gerard et al, 2006).

Cependant, le mécanisme par lequel la phosphorylation régule l'activité du CAF-1 ou le ciblage de la chromatine actuellement n'est pas clair (Sauer et al,2018), les modifications post-traductionnelles des histones ont le potentiel d'affecter directement le mécanisme de dépôt.

Chez la levure, les dimères H3 – H4 qui sont dirigés vers l'incorporation à la fourche de réplication sont acétylés par l'acétyltransférase Rtt109 sur la lysine 56 de H3 (H3K56<sup>ac</sup>); cette modification sert de marque aux histones nouvellement synthétisées (Li et al,2008. Driscoll et al ,2007).

En revanche, l'acétylation de H3K56 chez l'homme ne semble être nécessaire que pour l'assemblage des nucléosomes associé à la réparation de l'ADN, alors que chez la levure, les histones ciblées sur la fourche de réplication sont acétylées par le cytosolique HAT1 sur H4K5 et H4K12 (Verreault et al,1996 , Sobel et al,1995. Keck et al,2012. Das et al,2009 Nagarajan et al,2013. Ge et al,2013.Ye et al,2015) et par HAT4 sur H4K91 (Yang et al,2011 ).

CAF-1 est proposé pour reconnaître la modification de (H3K56<sup>ac</sup>), basée sur des études biochimiques indiquant que CAF-1 se lie à H3K56 -H4 avec une grande affinité ainsi que les histones non modifiés (Li et al,2008 , Das et al,2009) et XL-MS montrant de nombreuses liaisons croisées entre la CAF-1 et l' hélice N H3 contenant K56 (Liu et al,2016 ).

Les queues N-terminales des deux histones ne sont pas nécessaires pour l'assemblage des nucléosomes par CAF-1 même si elles sont essentielles pour la formation de la chromatine dans un contexte physiologique (Shibahara et al,2000, Verreault et al,1996 . Ling et al,1996 ). Par conséquent, la façon dont CAF-1 reconnaît spécifiquement les modifications sur H4 n'est pas claire (Sauer et al,2018)

#### **4. CAF-1 au cours de la réparation d'ADN**

Dans le processus de réparation des dommages à l'ADN, il est nécessaire de restaurer la structure de la chromatine initiale. CAF-1 et Asf1 sont impliqués dans ce processus, jouant ainsi

un rôle important dans le maintien de la stabilité épi-génétique (Green et Almouzni 2003; Ishii, Koshiyama et al. 2008). Par exemple, CAF-1 est impliqué dans la restauration de la chromatine lors de la réparation de dommages par excision de nucléotides, lors de la réparation des mésappariements et au cours de la réparation des cassures double-brin (Gaillard, Martini et al, 1996) (Schopf, Bregenhorn et al 2012).

Des travaux récents ont montré que CAF-1 joue aussi un rôle précoce au cours de la réparation des dommages, au-delà de son rôle dans la restauration post-réparation de l'état de la chromatine (Schopf, Bregenhorn et al 2012). Une hypothèse intéressante est que CAF-1 agirait d'abord dans le recrutement ou dans la régulation des enzymes de réparation sur les sites des lésions. Après la réparation, la fonction de CAF-1 pourrait basculer vers un mode chaperon d'histones pour promouvoir le dépôt des nucléosomes sur la zone d'ADN réparée (Schopf, Bregenhorn et al 2012).

La restauration de la chromatine post-réparatrice par CAF-1 et Asf1 est nécessaire pour désactiver les mécanismes de surveillance et autoriser la reprise du cycle cellulaire, notamment lors de la réparation des cassures double brin. En effet, le double mutant *asf1-d cac1-d* est incapable de reprendre la progression dans le cycle cellulaire après réparation d'une cassure double-brin, alors que chacun des simples mutants ne présente pas de phénotypes (Kim et Haber 2009). Il a été montré que c'est la présence de la marque d'histone H3K56Ac sur la zone d'ADN réparé qui est nécessaire pour désactiver les mécanismes de surveillance (Wurtele, Kaiser et al 2012). Les mécanismes par lesquels la marque H3K56Ac, sur les nucléosomes déposés après réparation, contribue à l'inactivation des voies de surveillance restent inconnus (Chen, Carson et al. 2008).

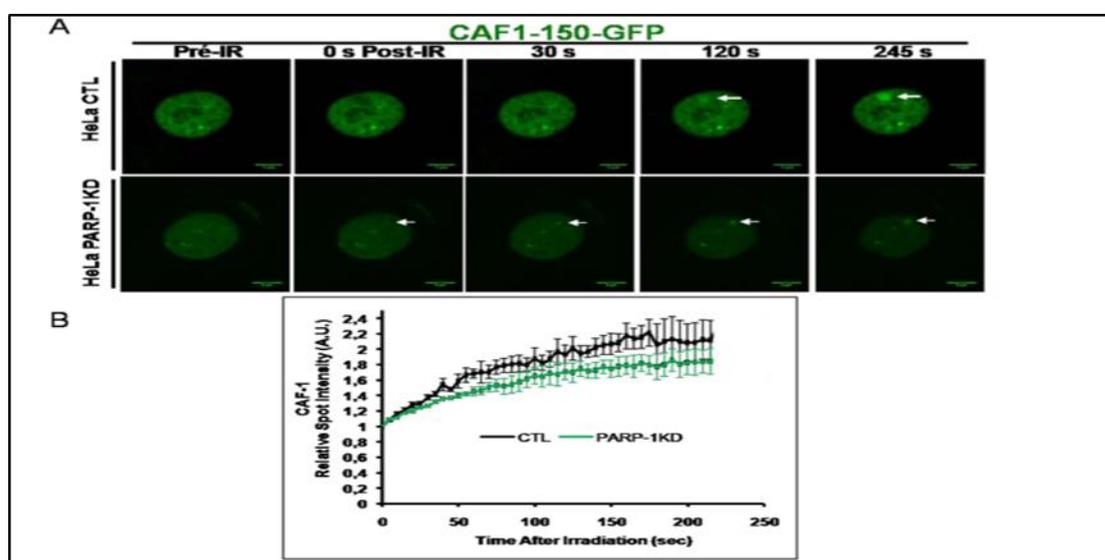
### **5. L'impact d'inhibition d'activité PARP-1 sur les cinétiques de recrutement CAF1 au site du photo-dommage**

Mohammed-Tayyib BOUDRA a étudié l'impact de la déplétion de PARP-1 sur la cinétique de recrutement de CAF1 au site de photo dommage d'ADN, il est utilisé une technique adoptée par le Dr. Denis Biard (Boudra, 2011). Cette technique est basée sur la transfection de différents clones de la lignée Henrietta Lacks cells (HeLa) par des vecteurs pEBV (Epstein-Bar Virus).

Le clone appelé Contrôle est transfecté avec le vecteur pEBV contenant une séquence codante d'un shRNA inefficace (Biard, 2007) (Biard, 2005). Ils ont utilisé des cellules

invalidées pour PARP-1 au moyen de shRNA dirigés contre les ARNm de PARP-1( PARP-1KD) et la transfection des cellules (Contrôles et PARP-1KD) par le plasmide CAF-1 GFP(afin d'exprimer la CAF-1 couplé aux fluorophores)par vidéo-microscopie après induction des dommages d'ADN localisées par micro-irradiation (utilisation d'un laser à 402 nm).

Les courbes des cinétiques de recrutement obtenues avec CAF-1 GFP montrent que la déplétion de PARP-1 provoque une diminution du recrutement de CAF-1GFP au site du photo-dommage dans les cellules PARP-1KD par rapport aux cellules Contrôles (Figure 4) Ceci suggère donc un possible rôle de PARP-1 et/ou de son activité dans le mécanisme de recrutement de CAF-1 en réponse aux dommages d'ADN (Boudra,2011).



**Figure 4 :**Recrutement de CAF-1 aux sites des dommages d'ADN (Boudra,2011)

Recrutement de CAF-1 aux sites des dommages d'ADN dans des cellules HeLa Contrôles et PARP-1kd (A) Des photos obtenues par vidéo-microscopie de cellules vivantes, micro-irradiées et exprimant CAF-1-GFP. Barre = 5 µm. (B) Cinétiques de recrutement d'CAF-1, en fonction de temps, aux sites des micro-irradiations. Les valeurs représentent les moyennes des intensités de fluorescence des foci.

Les inhibiteurs de la PARP sont une nouvelle classe de molécules prometteuse en oncologie, en agissant sur les mécanismes de réparation de l'ADN

## 6. Les poly(ADP-ribose) polymerases

Les PARP sont famille de 17 nucléoprotéines caractérisées par un site catalytique commun qui transfère un groupe ADP-ribose sur une protéine accepteur spécifique en utilisant la NAD comme cofacteur. Il intéressant de noter que la plupart des membres de PARP sont

capables de transférer uniquement un groupe mono-ADP ribose à leurs protéines cibles, alors que PARP1, PARP2, PARP3, PARP5a, PARP5b ajoutent de manière caractéristique des unités ADP-ribose répétées, générant ainsi de longues chaînes poly (ADP-ribose) (PAR) (Barkauskaite et al,2015). Cette modification de protéine post-traductionnelle est appelée PARylation et permet l'implication des PARP dans différentes activités cellulaires. À cet égard, la PARP1 est la PARP la mieux caractérisée. PARP1 module la structure de la chromatine via PARylation des protéines histones de base, ce qui entraîne une relaxation de la chromatine, permettant ainsi des processus de réplication, de réparation et de transcription (Weaver et al,2013).

### 6.1. Structure de PARP-1

PARP-1 se lie à des coupures d'ADN (nicked DNA) comme une protéine homodimérique de MW= 2×113 kDa. La liaison de PARP-1 à l'ADN conduit à l'activation du PARP-1. Le polypeptide possède une organisation hautement conservée composée de trois domaines principaux Figure 5(2A). Le domaine N-terminal de liaison à l'ADN (DBD ;MW= 46 kDa), qui contient deux motifs de doigts de zinc F1 et F2 Figure 5. (2B), le domaine d'automodification (AMD ; MW= 22kDa) ; et la région C-terminale (catPARP, MW= 54 kDa) qui accommodent le centre catalytique Figure 5. (2C) (de Murcia et al,1994a) (de Murcia et al,1994b) (Virag et al,2002).

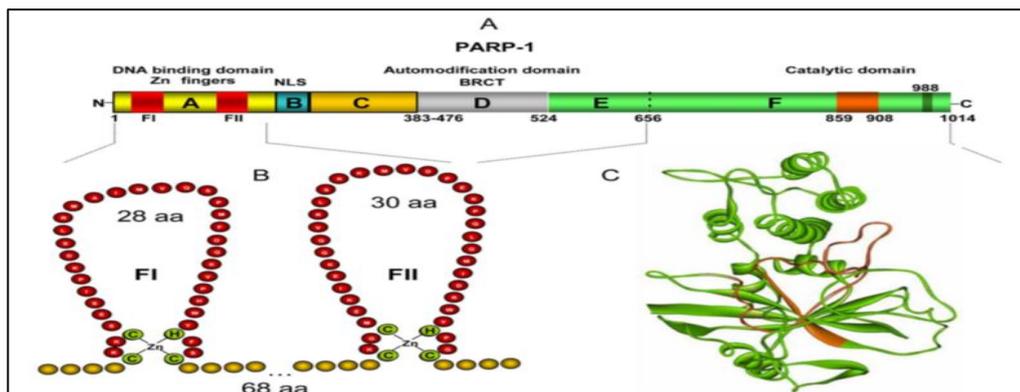
Le domaine DBD agit comme un capteur d'entaille d'ADN, qui contient les deux doigts de zinc et un signal de localisation nucléaire (NLS) inclus dans le site de clivage de la caspase (DEVD). Dans les doigts de zinc, le Zn(II) se coordonne aux résidus de cystéine et d'histidine (Figure 5. (2B)). Il est intéressant de noter que les doigts de zinc PARP-1 humains ne sont pas nécessaires de la même façon pour la reconnaissance des cassures d'ADN et pour l'activation de l'enzyme. Ainsi, une lésion sur le doigt F1 Zn(II) entraîne une perte complète de l'activité enzymatique indépendamment du type de cassures de l'ADN, alors que la destruction du doigt F2 Zn(II) n'évite l'activation du PARP-1 qu'en réponse à des cassures de l'ADN simple brin. Cette fonctionnalité asymétrique des doigts de zinc a inspiré la conception d'une classe spécifique d'inhibiteurs PARP (Cosi et al,2002).

La partie centrale du PARP-1 contient le domaine d'automodification (AMD), qui comprend cinq résidus de glutamate conservés qui fonctionnent comme des accepteurs de poly(ADPribose). L'AMD est considéré comme un segment régulateur car il contient des régions de dimérisation, qui peuvent moduler l'interaction de PARP-1 avec l'ADN et avec les

protéines. Ce domaine présente également le motif terminal de la protéine de susceptibilité au cancer du sein C (BRCT) Figure 5. (2A), très commune dans nombreuses protéines de réparation de l'ADN et de cycle cellulaire, qui agit dans plusieurs interactions protéine-protéine (Ruf et al,1996) ainsi que 15 résidus d'acide glutamique, qui agissent comme sites d'acceptation pour la réaction d'initiation (Marecki et al,2002).

La région C-terminale (MW= 54 kDa) est la partie la plus strictement conservée de l'enzyme (de Murcia et al,1994a) (de Murcia et al,1994b) (Virag et al,2002), et peut être réduite à un polypeptide C-terminal (PARP-CF) sans perdre l'activité catalytique basale (Simonin et al,1993). Les activités catalytiques de ce domaine sont liées à la synthèse du polymère et à sa liaison aux protéines cibles et consistent en l'hydrolyse NAD<sup>+</sup>, l'initiation, l'élongation, la ramification et la terminaison du polymère (ADP-ribose) (Ruf et al,1998) (Cosi et al,2002). Il est intéressant de noter qu'il existe une forte homologie dans la structure primaire de l'enzyme PARP-1 entre différentes espèces, le domaine catalytique (le fragment catalytique PARP, PARP-CF) présentant le plus haut degré de similarité de séquence d'acides aminés. Le PARP-CF est un monomère de 40 kDa qui comprend les résidus 656-1014 Figure 5. (2A). Ce domaine a été exprimé dans des cellules d'insectes, purifié, cristallisé et sa structure tridimensionnelle a été élucidée en présence et en l'absence de l'inhibiteur PARP-1 PD 128763 (Skalitzky et al,2003). Le site actif également appelé "signature PARP" ou "cat PARP" est formé par une séquence de 50 acides aminés et peut généralement être divisé en deux sites : le site accepteur (site adénosine) et le site donneur (site nicotinamide). Le site accepteur (N terminal) est occupé par le fragment ADP de la chaîne poly(ADP-ribose), tandis que le site donneur est pris par le NAD<sup>+</sup> (C terminal). Ce site donneur comprend trois sous-sites : le site de liaison nicotinamide-ribose (site NI), le site de liaison phosphate (site PH) et le site de liaison adénine-ribose (site AD) (Kinoshita et al,2004). Les deux sites de PARP-CF sont fonctionnellement et structurellement différents. Ainsi, le site accepteur est formé par un domaine N-terminal purement  $\alpha$ -hélicale allant du résidu 662 au résidu 784, et le site donneur est un domaine C-terminal allant du résidu 785 au résidu 1010. Le domaine N-terminal est formé par un motif hélicoïdal  $\alpha$  dans lequel les connexions sont longues de 9 à 14 résidus. Le domaine C-terminal appartient à la famille ARTase avec son pli caractéristique  $\beta/\beta$ , y compris le site de liaison NAD<sup>+</sup> (Ruf et al,1998). Le noyau de cette région est constitué d'une feuille  $\beta$  antiparallèle à cinq brins et d'une feuille  $\beta$  mixte à quatre brins. Les deux feuilles sont consécutives, reliées par une seule paire de liaisons hydrogène entre deux brins qui forment un angle de 90°, et entourées par cinq hélices  $\alpha$ , trois  $3_{10}$ -hélices, et par une feuille  $\beta$  à trois et deux brins dans un

tronçon à 37 résidus entre deux brins  $\beta$  centraux (Ruf et al,1996). Le bloc de 50 acides aminés (résidus 859-908) du domaine C-terminal qui sont identiques pour toutes les séquences PARP-1 des vertébrés est contenu dans un segment formé par une feuille  $\beta$ , une hélice  $\alpha$ , une  $3_{10}$ -hélice, une feuille  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ , consécutivement. His862 sur un brin  $\beta$  ainsi que Glu-988 sur un autre brin  $\beta$  sont tous deux impliqués dans la liaison ou la catalyse NAD<sup>+</sup> (Marsischky et al,1995), (Marsischky et al,1995) Il a été suggéré que toutes les ARTases ont un mécanisme de ribosylation ADP similaire, en raison de leur glutamate catalytiquement compétent commun (Glu-988 dans le PARP-1), et de leur liaison analogue au substrat. Le donneur NAD<sup>+</sup> est lié à l'enzyme avec le nicotinamide ribose en conformation 3'-endo. Ensuite, le Glu-988 forme des liaisons hydrogène avec le nucléophile accepteur et avec le NAD<sup>+</sup> donneur en polarisant les deux, de sorte que la nucléophilie de l'accepteur augmente et, par conséquent, l'oxocarbenium du ribose donneur est stabilisé. La contrainte interne du substrat attaché aide à diriger la réaction car elle est soulagée après la rupture de la liaison  $\beta$ -glycosidique. La plupart des inhibiteurs PARP-1 se lient au site catalytique de l'enzyme, en particulier au site de liaison NAD<sup>+</sup>, de manière compétitive. Comme la PARP-1 modifie une variété de protéines, aucune surface d'accostage spécifique pour les protéines ne semble nécessaire. Contrairement à la PARP, les autres ARTases ont des spécificités d'accepteur élevées (Ruf et al,1998) . Depuis la découverte initiale de PARP-1, d'autres enzymes PARP ont été trouvées (PARP-2 ; PARP-3 ; Vault PARP -vPARP- ; Tankyrases -TANK1 et -2), qui présentent des différences dans leurs structures de domaine (Virag et al,2002). Ces formes de PARP récemment décrites présentent de fortes homologies au niveau de leur domaine catalytique C-terminal PARP-1. Par conséquent, il est très important de déterminer la sélectivité des inhibiteurs PARP par rapport à toutes ces enzymes PARP. Par exemple, il a été récemment signalé qu'un nouveau sous-site hydrophobe en forme de corne émerge du site actif de PARP-1 lorsqu'il est complexé avec l'inhibiteur FR 257517(Kinoshita et al,2004). Dans des conditions non dommageables, le PARP-1 catalytiquement inactif réside dans le nucléoplasme (Smith et al,2001). Le PARP-1 et d'autres poly(ADP-ribosyltransférases) se trouvent également dans les mitochondries (Du et al,2003).

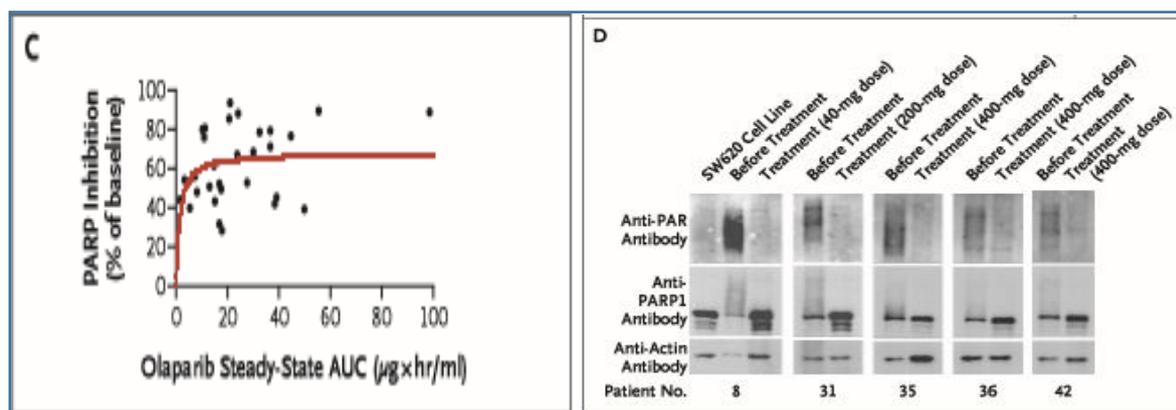


**Figure 5:** La structure de PARP-1 (Cepeda et al. 2006)

Figure 5 (A) : Le PARP-1 a une structure à trois domaines : le domaine de liaison à l'ADN NH<sub>2</sub>-terminal (DBD), le domaine d'automodification (AMD) et le domaine catalytique COOH-terminal. (B). Le domaine DBD contient deux doigts de zinc, qui sont responsables de la liaison de l'ADN et des interactions protéine-protéine. Le DBD contient également un signal de localisation nucléaire (NLS) dans lequel se trouve le site de clivage de la caspase. Le domaine de la DMLA présente un motif de la protéine C terminale de susceptibilité au cancer du sein (BRCT), qui est très courante dans les protéines de réparation et de cycle cellulaire. La PARP-1 se lie à certaines protéines par le biais du motif BRCT. (C) Diagramme en ruban du domaine catalytique de la PARP-1 (acides aminés 656 à 1014). Le domaine catalytique contient le site actif de PARP-1, également appelé "signature PARP", qui est très bien conservé chez les eucaryotes et consiste en une séquence de 50 acides aminés (859 à 908). (Cepeda et al. 2006)

### 6.3. L'inhibition de la PARP

La figure 6(C) illustre le pourcentage moyen d'inhibition de la PARP dans les cellules mononucléaires en association avec des doses croissantes d'olaparib, en fonction de l'exposition à l'olaparib à l'état d'équilibre. L'inhibition du PARP de plus de 90 %, par rapport à la valeur de départ, a été observée dans les cellules des patients traités avec 60 mg ou plus d'olaparib deux fois par jour. La figure 6(D) illustre l'immuno-blotting d'extraits cellulaires préparés à partir de prélèvements de biopsie tumorale recueillis avant l'administration d'olaparib et après 8 jours de traitement à l'olaparib. L'inhibition de la PARP a été mise en évidence par la perte du signal de PAR (un biomarqueur de l'activité de la PARP) après le traitement. (Fong et al. 2009)



**Figure 6 :** le pourcentage moyen d'inhibition de la PARP dans les cellules mononucléaires en association avec des doses croissantes d'olaparib( Fong et al.2009)

## 7. Olaparib

Olaparib (AZD2281, KU-0059436) est un puissant inhibiteur de la PARP qui induit une létalité synthétique dans les cellules tumorales déficientes en BRCA1/2 et est développé en monothérapie orale ainsi qu'en association combinés avec d'autres agents anticancéreux. (Marchetti et al. 2012)

Ce médicament est commercialisé sous le nom Lynparza et bénéficié d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) (ansm)

### 7.1. Chimie

Olaparib (4-[(3-[(4-cyclopropylcarbonyl)piperazin-4-yl]carbonyl)-4 fluorophényl]méthyl(2H) phtalazin-1-one) est une phthalazinone et se présente sous la forme d'une substance de couleur blanc cassé à jaune pale solide cristallin orange, avec un point de fusion de 210 - 211C et un poids moléculaire de 434,47 Da (Menear et al,2008).

### 7.2. Pharmacodynamique

La concentration efficace pour inhiber l'activité PARP cellulaire de > 90 % est d'environ 30 à 100 nM d'olaparib dans plusieurs lignées de cellules tumorales dont l'ovaire A2780, le sein MCF-7 et le colorectal SW620. La concentration efficace médiane (nécessaire pour induire un effet de 50% [CE50]) pour l'Olaparib est d'environ 6 nM. Cette valeur a été déterminée en mesurant l'inhibition de la formation de la chaîne poly (ADP-ribose) (PAR) dans les lysats cellulaires SW620 après incubation de l'Olaparib (0,1 -- 300 nM). On sait que les concentrations

dans la gamme active entre 0,2 et 4  $\mu\text{M}$ , avec une moyenne de 1  $\mu\text{M}$  d'olaparib, sont réalisable dans les tumeurs in vivo (Menaar et al,2008)

### 7.3. pharmacocinétique et métabolisme

Chez les patients cancéreux, après une dose orale d'une seule capsule, l'olaparib a été rapidement absorbé. Le volume de distribution apparent moyen était de 40,3 L, la clairance plasmatique apparente moyenne était de 4,55 L/h et la demi-vie terminale moyenne ( $t_{1/2}$ ) était de 6,10 h. l'exposition a augmenté proportionnellement à la dose jusqu'à 100 mg deux fois par jour, mais a augmenté de façon moins que proportionnelle à des doses plus élevées. Après l'administration de doses de 400 mg bd (deux fois par jour) à des patients atteints de cancer, la population a estimé, La concentration plasmatique maximale à l'état d'équilibre ( $C_{\text{max ss}}$ ) s'échelonnent de 1,45 à 11,0  $\mu\text{g/mL}$  (3,34 -- 25,3  $\mu\text{M}$ ), ce qui équivaut à des concentrations non liées de 0,26 -- 1,99  $\mu\text{g/mL}$  [0,6 -- 4,58  $\mu\text{M}$ ] ; l'aire sous la courbe de la concentration plasmatique en fonction de temps (ASC) à l'état d'équilibre (aire sous la courbe de la concentration plasmatique en temps de zéro à 12 h [ASC<sub>0-12</sub>]) variait de 6,56 à 122  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . après l'administration d'une dose radiomarquée d'Olaparib aux patients cancéreux, l'Olaparib représentait environ 70 % du matériel circulant dans le plasma, le reste étant constitué de trois autres composants (chacun représentant environ 10 % du matériel). Les substances liées à le médicament ont été éliminées dans l'urine (35 à 50 %) et dans les fèces (12 à 60 %) avec 10 à 20 % et 0,6 -- 14% de la substance dosée est récupérée dans l'urine et sous forme de médicament inchangé, respectivement (Fong et al.2009).

## **Chapitre II : les principales approches de la modélisation moléculaire**

### Introduction

L'arrimage moléculaire est devenu un outil de plus en plus important pour la découverte de médicaments.

L'approche d'amarrage moléculaire peut être utilisée pour modéliser l'interaction entre une petite molécule et une protéine au niveau atomique, ce qui nous permet de caractériser le comportement de petites molécules dans le site de liaison des protéines cibles ainsi que d'élucider les processus biochimiques fondamentaux (McConkey et al,2002). Le processus d'amarrage implique deux étapes de base: la prédiction de la conformation du ligand ainsi que sa position et son orientation au sein de ces sites (généralement appelés pose ) et l'évaluation de l'affinité de liaison.

Dans ce chapitre, nous présenterons la méthode de base de la modélisation moléculaire, qui repose sur l'application de méthodes chimiques théoriques, commençant par la mécanique moléculaire, puis la dynamique moléculaire (MD) et enfin nous couvrons les applications d'amarrage moléculaire. Dans chaque section, nous présenterons les méthodes de base, discuterons de certains détails et fournirons d'autres références aux lecteurs qui ont besoin de plus d'informations.

### 1. La mécanique moléculaire

Mécanique moléculaire (MM) assume que les positions relatives des noyaux des atomes formant une structure sont fonction de l'action des forces d'attraction et de répulsion (Hendrickson et al,1961). Différents types d'étirement des liaisons, de flexion angulaire, d'énergie de torsion et d'autres attributs non liés sont calculés en utilisant les équations de la physique classique, ce qui donne diverses interactions et énergies également connues sous le nom de champs de force. Ainsi, l'énergie potentielle totale d'une molécule est exprimée comme la somme de tous les différents types de forces d'attraction et de répulsion entre les atomes de la structure, en tenant compte de l'impact des noyaux et en évitant l'impact des électrons. On utilise un modèle mécanique hypothétique qui considère des sphères reliées par des ressorts mécaniques, où la sphère et le ressort représentent respectivement l'atome et la liaison covalente, ce qui permet l'application des lois de la mécanique classique. Une forme générale de l'équation montrant les composantes de l'énergie totale peut être représentée comme suit :

$$E_{\text{Total}} = \sum E_{\text{Stretching}} + \sum E_{\text{Bond}} + \sum E_{\text{Van Der Waals}} + \sum E_{\text{Coulombic}} + \sum E_{\text{Torsion}}$$

L'énergie stérique des molécules est d'abord calculée à l'aide de champs de force, suivie d'un ajustement de la conformation pour la minimisation de l'énergie stérique. L'une des méthodes de calcul de MM utilise des types d'atomes pour la détermination des fonctions et des paramètres qui composent le champ de force. Un seul élément tel qu'un atome de carbone peut être défini par différents types d'atomes de MM, dont la sélection dépend de diverses caractéristiques telles que l'hybridation et l'environnement chimique. Parmi les exemples de champs de force MM, on peut citer MM2, MM3, MMFF, Amber, Dreiding et UFF, qui sont tous implémentés dans différents logiciels (Allinger et al,1977)(Nemethy et al,1992). Le tableau 1 présente les caractéristiques de base qui sont mises en œuvre dans divers champs de force.

**Tableau 1:** Les différents types de champ de force (Roy et al., 2015)

Champ de force	Caractéristique
Mm2	Il est applicable aux structures moléculaires simples contenant des groupes fonctionnels communs comme les cétones, les éthers et les composés aromatiques. Cependant, le MM2 est plus applicable aux composés organiques ne contenant pas d'hétéroatomes. Afin de caractériser la fonction potentielle réelle d'une liaison chimique, le MM2 ajoute des termes à l'interaction liée en considérant la rupture anharmonique des liaisons. Le champ de force MM2 prend en compte le modèle d'hybridation et les partenaires de liaison pour représenter le changement de longueur et d'angle des liaisons à l'équilibre. Un autre fait important concernant le champ de force MM2 est qu'il utilise l'équation de Buckingham au lieu de l'équation de Lennard-Jones pour le calcul des interactions de van der Waals.
Mm3	Il s'agit d'une version plus sophistiquée du champ de force MM2 qui intègre des fonctions potentielles complexes. Elle prend en compte plusieurs corrections et modifications par rapport à l'algorithme MM2, comme la correction des barrières de rotation élevées dans les hydrocarbures congestionnés, les changements du paramètre de van der Waals pour contourner la forte répulsion H/H non liée lorsqu'elle est placée à courte distance, l'interaction torsion-étirement différenciant la longueur de liaison entre les conformations éclipsées et décalées, et l'application de la correction du moment dipolaire de liaison pour définir le tassement des cristaux dans le benzène.
Mm4	Il effectue un calcul amélioré des fréquences de vibration, des barrières de rotation, etc. pour des composés comme les alcanes et les cycloalcanes, à l'exclusion des systèmes à petits anneaux. Il inclut des interactions spéciales comme le coude de torsion et le coude de torsion-courbe.
mmff	Merck molecular force field (MMFF) is a force field comprising of high-quality data of wide range employed for MM/ dynamics simulation operation. MMFF is supposed to present the structures of organic compounds in the Merck index or the Fine Chemicals Directory. This force field comprises several updated versions; however, the basic parameters include attributes of bond stretching, angle bending, stretchbend interactions, out-of-plane bending at tricoordinate centers, van der Waals force, torsion, and electrostatic interactions.
AMBER	L'algorithme AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) utilise une approche énergétique empirique, permettant la modélisation de petites molécules et de polymères. AMBER comprend diverses sous-unités, à savoir PREP (préparation des résidus), LINK (liaison des résidus), EDIT (modification de la structure, changement des charges, etc.), PARM (ajout de paramètres), MINM (minimisation du partage de l'énergie), ANAL (comparaison des valeurs efficaces), etc. pour un traitement efficace des données.

DREIDING	Il vise à utiliser des constantes de force générales et des paramètres de géométrie tenant compte de l'état d'hybridation au lieu des informations dérivées de la combinaison des atomes. DREIDING utilise les rayons atomiques pour calculer toutes les distances de liaison, ainsi qu'une seule constante de force, pour désigner chaque liaison, angle et inversion accompagnée de six valeurs pour la contrainte de torsion. Les types d'atomes définis par un label mnémotique à cinq caractères sont utilisés comme composants du champ de force de DREIDING, et l'énergie potentielle est considérée comme la somme de l'interaction de valence (Eval) et de non liaison (Enb) qui dépend de la distance atomique. L'étirement de la liaison est défini soit en considérant l'oscillateur harmonique, soit en utilisant la fonction Morse.
UFF	Le champ de force universel (UFF) se concentre sur l'élément, son état d'hybridation et la connectivité qu'il possède. L'UFF permet des déplacements de grande amplitude pour les formes fonctionnelles qui définissent la distorsion angulaire. En plus d'être un champ de force mécanique moléculaire, UFF peut être utilisé dans un algorithme de calcul de l'énergie MD. Les rayons des liaisons atomiques dépendant de l'état d'hybridation, les angles d'hybridation, les paramètres définissant l'interaction de van der Waals, les barrières de torsion et d'inversion, et un ensemble de charges nucléaires efficaces sont utilisés comme paramètres dans le formalisme de l'UFF.
CHARMM	Le département de chimie de HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM) présente un programme de simulation adapté permettant une application polyvalente pour les méthodes d'échantillonnage conformationnel et de cheminement, les estimations d'énergie libre, la minimisation moléculaire, la MD, les techniques d'analyse, ainsi que les capacités de construction de modèles impliquant de nombreux systèmes de particules. CHARMM peut être utilisé pour l'étude de biomolécules comme les peptides, les protéines, les groupes prothétiques, les ligands de petites molécules, les acides nucléiques, les lipides et les glucides. Il peut être utilisé en faisant intervenir diverses fonctions et modèles énergétiques.
OPLS	Les potentiels optimisés pour les simulations de liquides (OPLS) du noyau atomique sont annexés avec le site d'interaction, à l'exception des groupes CH <sub>n</sub> qui sont considérés comme des atomes unis centrés sur le carbone. Des fonctions spéciales sont utilisées pour indiquer la liaison H, et des règles de combinaison standard sont employées pour le potentiel d'interaction Lennard-Jones.
ECEPP	Le programme d'énergie conformationnelle empirique pour les peptides (ECEPP) définit la géométrie des résidus d'acides aminés et les fonctions d'interaction interatomique en utilisant un ensemble de paramètres normalisés et cohérents en interne. L'ECEPP est caractérisé par des données expérimentales et est mis à jour suite au développement de nouvelles données.

## 2. La dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire peut être définie comme une technique de simulation informatique qui permet de prédire l'évolution temporelle d'un système particulier en interaction, impliquant la génération de trajectoires atomiques d'un système en utilisant l'intégration numérique de l'équation de mouvement de Newton pour un potentiel interatomique spécifique défini par une condition initiale et une condition limite. La simulation dynamique fournit également des informations sur la cinétique moléculaire et la thermodynamique. La détermination du mouvement en fonction du temps des particules individuelles d'un système permet de quantifier les propriétés du système donné sur une échelle de temps définie qui est autrement impossible à atteindre (Roy et al.,2015).

## 3. Docking moléculaire

Dans une définition simple,le docking moléculaire est une technique de modélisation moléculaire qui est utilisée pour prédire comment une protéine (enzyme) interagit avec de petites molécules (ligands). La capacité d'une protéine (enzyme) et d'un acide nucléique à interagir avec de petites molécules pour former un complexe supramoléculaire joue un rôle majeur dans la dynamique de la protéine, qui peut améliorer ou inhiber sa fonction biologique. Le comportement des petites molécules dans les poches de liaison des protéines cibles peut être décrit par l'arrimage moléculaire. La méthode vise à identifier les poses correctes des ligands dans la poche de liaison d'une protéine et à prédire l'affinité entre le ligand et la protéine. Selon les types de ligands, l'amarrage peut être classé comme

- Protéine - ligand docking de petite molécule.
- Protein - d'acide nucléique
- Protéine - protéine docking

L'amarrage des petites molécules de protéines (ligands) représente une extrémité plus simple du spectre de la complexité, et il existe de nombreux programmes disponibles qui sont particulièrement performants dans la prédiction des molécules qui peuvent potentiellement inhiber les protéines. L'amarrage des protéines est généralement beaucoup plus complexe. La raison en est que les protéines sont flexibles et que leur espace conformationnel est assez vaste (Roy et al.,2015).

### 3.1 Définition des termes fondamentaux de l'amarrage

Pour mieux comprendre l'étude d'amarrage, il faut connaître les termes fondamentaux liés à l'étude d'amarrage.

**Récepteur** : récepteur est une molécule de protéine ou une structure polymère dans ou sur une cellule qui reconnaît distinctement et se lie à une molécule (ligand) agissant comme un messenger moléculaire. Lorsque ces ligands se lient à un récepteur, ils provoquent une sorte de réponse cellulaire.

**Ligand** : un ligand est la molécule partenaire complémentaire qui se lie au récepteur pour une réponse bimoléculaire efficace. Les ligands sont le plus souvent de petites molécules médicamenteuses, des neurotransmetteurs, des hormones, des lymphokines, des lectines et des antigènes, mais ils peuvent également être un autre biopolymère ou une macromolécule (dans le cas d'un amarrage protéine-protéine)

**L'amarrage** : L'amarrage est une technique de modélisation moléculaire conçue pour trouver la bonne position entre un ligand et son site de liaison (récepteur).

**Dock pose** : une molécule de ligand peut se lier à un récepteur dans plusieurs positions, conformations et orientations. Chacun de ces modes d'amarrage est appelé "dock pose".

**Mode de liaison** : Le mode de liaison est l'orientation du ligand par rapport au récepteur, ainsi que la conformation du ligand et du récepteur lorsqu'ils sont liés l'un à l'autre.

**Score dock** : Processus d'évaluation d'une pose particulière en comptant le nombre d'interactions intermoléculaires favorables telles que les liaisons hydrogène et les contacts hydrophobes. Afin de reconnaître la pose la plus favorable sur le plan énergétique, chaque pose est évaluée en fonction de sa compatibilité avec la cible en termes de forme et de propriétés telles que l'électrostatique et génère le score de dock correspondant. Un bon score de dock pour un ligand donné signifie qu'il est potentiellement un bon liant.

**Classement** : Le classement est le processus de classification des ligands les plus susceptibles d'interagir favorablement avec un récepteur particulier en fonction de l'énergie libre de liaison prévue. Une fois l'amarrage terminé, tous les ligands sont classés en fonction de leurs scores d'amarrage respectifs (c'est-à-dire de leurs affinités prédites). Cette liste classée est

ensuite utilisée pour la synthèse et les recherches biologiques ultérieures uniquement pour les composés dont on prédit qu'ils seront les plus actifs.

**Prédiction de la position** : La prédiction de dose peut être définie comme la recherche du mode de liaison précis d'un ligand, qui est généralement effectuée en réalisant un certain nombre d'essais et en gardant les pose qui sont énergétiquement meilleures.

### 3.2. Algorithmes du docking

En principe, l'amarrage moléculaire peut être effectué directement par le modélisateur manuellement en utilisant une interface graphique pour placer le ligand sur le site actif de la protéine. Ensuite, la géométrie de l'ensemble est optimisée pour corriger les problèmes stériques et obtenir un complexe énergétiquement stable. Cette méthode est appliquée lorsque on a une idée précise du mode réel d'interaction du ligand (Coupez et Lewis ., 2006)

Cependant, dans la plupart des cas, la méthode d'interaction réelle n'est pas claire. Dans ce cas, Un teste manuelle de tous les conformations et orientations des ligands s'avère impossible d'un point de vue pratique même si la protéine est traitée comme un corps rigide. Afin de résoudre ce problème, l'algorithme d'ancrage a été conçu pour rechercher objectivement, rapidement et efficacement le mode d'association protéine-ligand le plus favorable (Leach et al., 2006).

### 3.3. Fonction de score

L'arrimage moléculaire nous permet d'obtenir différents modes d'interaction entre le ligand et le récepteur. Cependant, la sélection du meilleur mode nécessite l'appelle à les fonction ou de paramètres de selection , qui est le scoring. La fonction de score est une méthode d'approximation mathématique qui estime l'affinité de liaison en trouvant le ligand ayant la plus forte affinité pour la cible (Graves et al., 2005). Depuis l'introduction de la recherche sur l'amarrage, de nombreuses fonctions de score ont été développées. Les fonctions de score sont généralement regroupées selon leurs méthodes de calcul. Nous avons: la fonction de score basée sur le champ de force, la fonction de score knowledge-based et la fonction de score empirique (Schneider et Böhm., 2002; Schulz-Gasch., 2004). L'association protéine-ligand est liée à plusieurs paramètres thermodynamiques: interaction hydrophobe, interaction électrostatique et les liaison hydrogène (Foloppe et Hubbard, 2006).

### 3.4. Les étapes de base de l'amarrage moléculaire

Fondamentalement, l'amarrage est un processus en trois étapes, indépendamment du logiciel et des algorithmes d'amarrage (Venkatesan et al,2010). Les étapes sont les suivantes :

**Préparation du ligand** : La première étape consiste à préparer les ligands. Au cours de ce processus, toutes les structures en double doivent être éliminées, et les options de changement d'ionisation, de tautomère, de génération d'isomères et de générateur 3D doivent être définies dans la plate-forme logicielle de travail pour les ligands respectifs.

**Préparation de protéines** : Des atomes d'hydrogène doivent être ajoutés et la protéine doit être réduite au minimum en utilisant des FF spécifiques au logiciel, suivis de l'élimination des molécules d'eau, sauf dans le site actif. La protéine doit être ajustée en corrigeant toute erreur grave comme des résidus incomplets près du site actif. Les charges et les types d'atomes pour tout atome de métal doivent être réglés correctement, si nécessaire. S'il existe des liaisons avec des ions métalliques, les liaisons doivent être supprimées, puis les charges formelles des atomes qui étaient attachés au métal, ainsi que le métal lui-même, doivent être ajustées. La molécule de protéine, ainsi préparée, est le récepteur total prêt pour l'amarrage.

**Ligand-protein docking** : Après s'être assuré que les protéines et les ligands sont sous la forme correcte pour l'amarrage, dans quelques cas, les fichiers de grille de récepteurs sont générés à l'aide d'un programme de génération de récepteurs de grille pour l'amarrage basé sur la grille. La grille est généralement générée au niveau du centroïde du ligand lié au site actif du récepteur. Dans d'autres cas, des poches actives de la protéine sont identifiées pour fixer le ligand préparé dans ces poches identifiées. Au départ, toutes les molécules de l'ensemble de données doivent être ancrées dans le site actif de la protéine et les énergies d'interaction entre chaque ligand et le récepteur peuvent être calculées. Les résultats obtenus doivent ensuite être comparés à ceux du ligand lié de la structure de la protéine cristallisée afin d'évaluer si les molécules s'adaptent ou non au site actif spécifié du récepteur. Un nombre déterminé de poses du ligand doit être enregistré pour chaque conformation du ligand. Un nombre prédéfini de poses d'amarrage ainsi sauvegardées pour chaque conformation du composé peut être classé selon leur fonction de dock score, puis leur interaction avec le récepteur peut être analysée. À partir des études d'amarrage, les interactions récepteur-ligand sont corrélées avec l'activité biologique des composés de l'ensemble des données. La validation structurelle de la procédure d'amarrage est réalisée en extrayant le ligand cocrystallisé du site actif du récepteur et en le

réamarrant au récepteur pour s'assurer qu'il se lie au même site actif et interagit avec les mêmes résidus d'acides aminés qu'auparavant (Roy et al.,2015).

## **Chapitre III : Étude de l'interaction protéine – ligand**

### **Introduction**

Les poly(ADP-ribose) polymérasés (PARP) sont définies comme une famille d'enzymes de signalisation cellulaire présentes dans les eucaryotes, qui sont impliquées dans la poly(ADP-ribosylation) des protéines de liaison à l'ADN (Cepeda et al. 2006).

L'olaparib est le premier inhibiteur PARP-1 de sa catégorie commercialisé en 2014 en tant que monothérapie pour le cancer de l'ovaire avancé avec déficit en BRCA. (Yuan,2017)

La méthodologie de l'arrimage moléculaire explore le comportement des petites molécules dans le site de liaison d'une protéine cible. Alors que de plus en plus de structures protéiques sont déterminées expérimentalement par cristallographie à rayons X ou par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), l'arrimage moléculaire est de plus en plus utilisé comme outil dans la découverte de médicaments (Roy et al.,2015).

Les premières méthodes de docking moléculaire basé sur le concept « clé-serrure » proposée par M.Fischer indiquant que le ligand et le récepteur peuvent être traités comme des corps rigides et que leur affinité est directement proportionnelle à un ajustement géométrique entre leurs formes (Roy et al.,2015).

Les logiciels de docking moléculaire exécutent un algorithme de recherche dans lequel la conformation du ligand est évaluée de manière récursive jusqu'à ce que la convergence vers l'énergie minimale soit atteinte.

Notre étude consiste à étudier les interactions entre l'olaparib et PARP-1 par les méthode de la modélisation moléculaire

### **1. Matériels et Méthodes**

#### **1.1. Matériels**

##### **1.1.1 Ressources informatiques**

- Ordinateur : Nom de l'ordinateur : dell-Pc
  - Système d'exploitation : Windows 10 (64 bites)
  - Processeur : Intel(R) core (TM) i7-3770 CU @ 3.40 GHz 3.40 GHz
  - Mémoire installée (RAM) : 4.00 Go (3.87 Go utilisable)

### 1.1.2 Logiciels utilisés

- **Spdbv**

Swiss-PdbViewer a été développé depuis 1994 par Nicolas Guex .est un logiciel qui fournit une interface conviviale permettant d'analyser plusieurs protéines en même temps. Les protéines peuvent être superposées afin de déduire des alignements structuraux et de comparer leurs sites actifs ou toute autre partie pertinente. Les mutations des acides aminés, les liaisons H, les angles et les distances entre les atomes sont faciles à obtenir grâce à l'interface graphique et aux menus intuitifs.(spdbv home)

- **Autodock Tools**

AutoDockTools, est l'interface graphique gratuite pour AutoDock, développée par le même laboratoire qui a mis au point AutoDock. Il est utilisé pour configurer, exécuter et analyser les ancrages AutoDock et les cartes d'affinité AutoGrid isocontour, ainsi que pour calculer les surfaces moléculaires, afficher les rubans de structure secondaire, calculer les liaisons hydrogène et faire bien d'autres choses utiles.

- **Discovery studio**

Discovery Studio est une suite logicielle complète pour l'analyse et la modélisation des structures moléculaires, des séquences et d'autres données pertinentes pour les chercheurs en sciences de la vie. Le produit comprend des fonctionnalités permettant de visualiser et d'éditer les données ainsi que des outils permettant d'effectuer une analyse de base des données.

## 1.2. Méthode

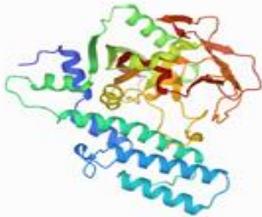
### 1.2.1 Présentation de protéine

La poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) est une enzyme nucléaire, impliquée dans la réparation de l'ADN et la régulation transcriptionnelle des gènes qui régule la survie et la mort des cellules (Amé et al,2004). La réponse de la PARP1 est provoquée par un stress génotoxique sur l'ADN. Elle détecte les cassures de l'ADN et catalyse l'addition d'ADPribose sur différentes protéines nucléosomiques ainsi que sur elle-même, sous forme de chaînes PAR linéaires ou ramifiées, en utilisant NAD<sup>+</sup> comme substrat (Muthurajan et al,2014).

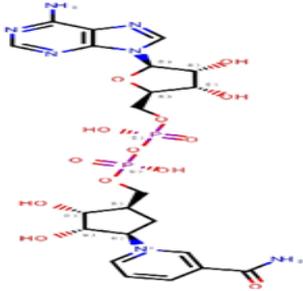
## CHAPITRE III : ÉTUDE DE L'INTERACTION PROTEINE – LIGAND

Dans cette étude on a téléchargé la structure PDB de la protéine PARP à partir de la base des données PDB « Protein Data Bank » ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)), cette protéine est Co-cristallisée avec d'autre ligand a une affinité similaire à NAD<sup>+</sup>

**Tableau 2:** Les données cristallographiques de la protéine PARP

Molécule	Chaînes	Longueur de Séquence	Organisme	Détails	Image
POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE	A	361	Gallus gallus	Mutation(s): 0 Nom de Gene: PARP1, ADPRT EC: 2.4.2.30 (PDB Primary Data), 2.4.2 (UniProt)	

**Tableau 3 :** Les données cristallographiques de ligand co-cristallisé avec le PARP-1

ID	chaînes	Nom / Formule / InChI Key	Diagramme 2D
CNA Query on CNA	A	CARBA-NICOTINAMIDE-ADENINE-DINUCLEOTIDE <chem>C22H30N7O13P2</chem> DGPLSUKWXXSBCU-VGXGLJLSA-O	

**Tableau 4 :** Cellule unitaire

Longueur ( Å )	Angle ( ° )
a = 59.04	$\alpha = 90$
b = 64.44	$\beta = 90$
c = 96.72	$\gamma = 90$

**Tableau 5 :**Software package

Nom du Logiciel	objectif
X-PLOR	Construction de modèles
X-PLOR	raffinement
XDS	réduction des données
XSCALE	Mise à l'échelle des données
X-PLOR	phassing

### 1.2.2 Présentation de ligand

L'olaparib est un inhibiteur de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) indiqué pour le traitement de : Cancer des ovaires, Cancer du sein Ce médicament est commercialisé sous le nom Lynparza. Son nom chimique est 4-[(3-{[4-(cyclopropylcarbonyl)pipérazin-1-yl]carbonyl}-4-fluorophényl) méthyl]phtalazin-1(2H)-one et il présente la structure chimique suivante

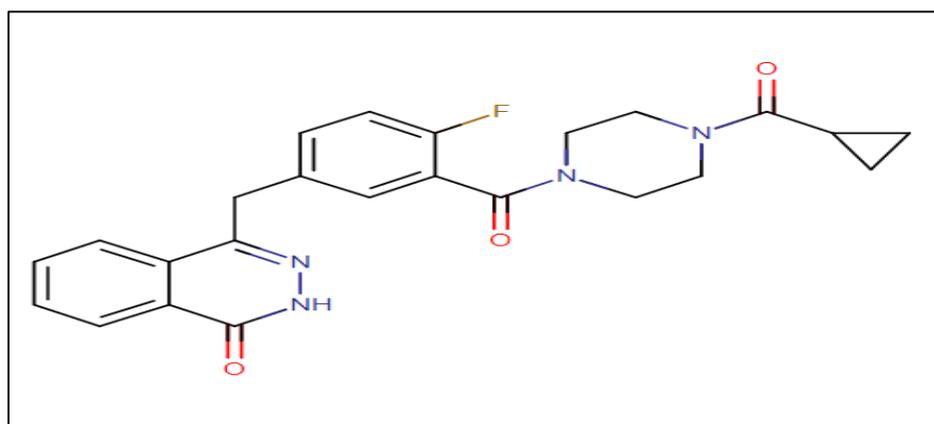


Figure 7:la structure chimique de l'olaparib (pubchem)

La formule moléculaire empirique de Lynparza est C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> et la masse moléculaire relative est de 434,46 g/mol.

L'olaparib appartient à la classe des N-acylpipérazine, un membre des cyclopropanes, un membre des monofluorobenzènes et un membre des phtalazines. (PubChem)

1.2.3 Protocole de calcul

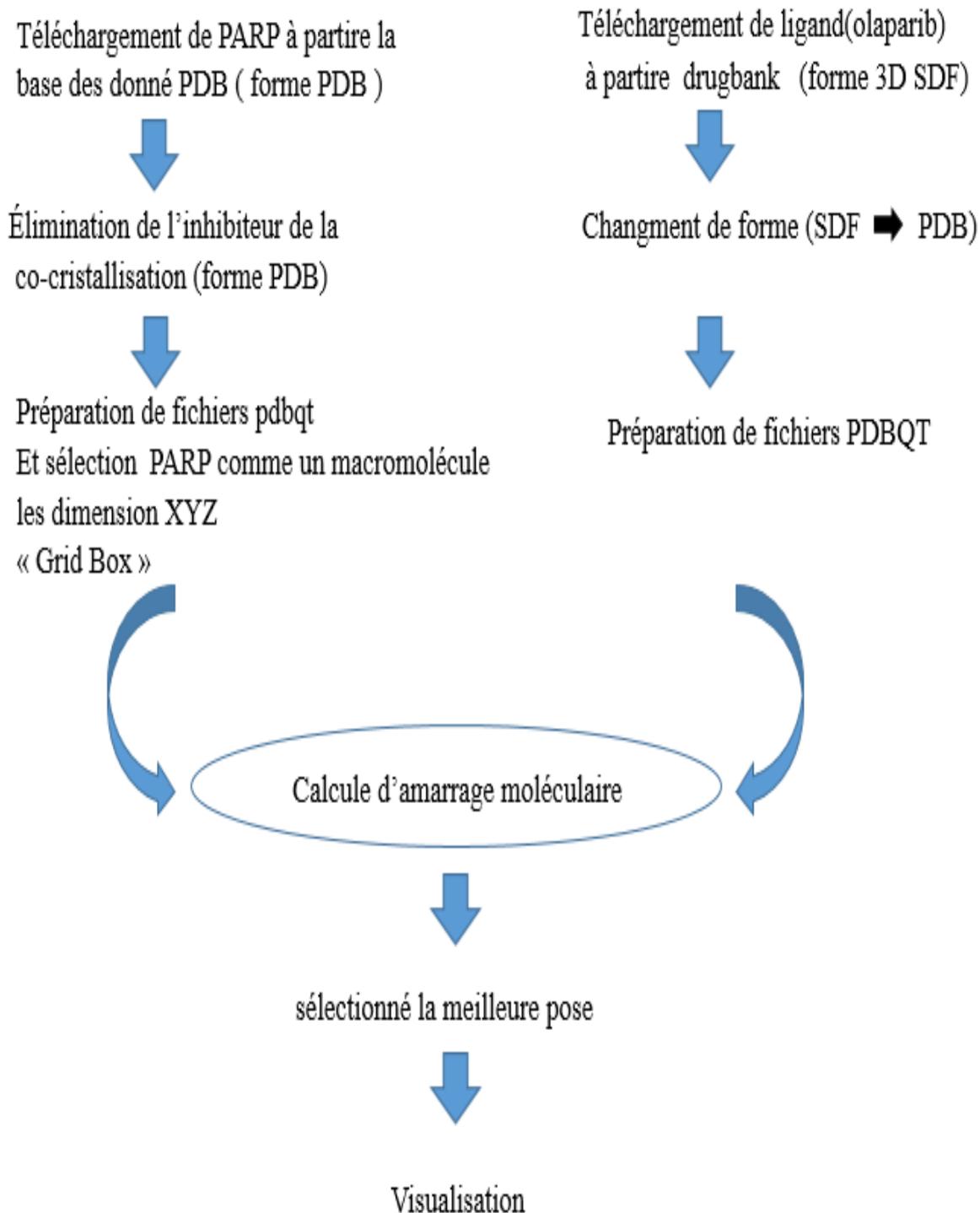


Figure 8:Protocole de calcul

## 2. Résultat

L'amarrage moléculaire de l'olaparib dans PARP-1 a révélé un mode de liaison optimal caractérisé par une affinité de l'énergie de liaison minimale avec -10.9 kcal/mol. Comme l'illustrent dans le tableau 3

**Tableau 6 :** Différentes poses obtenu lors du docking moléculaire

mode	Affinity(kcal/mol)	Dist from rmsd l.b.	Best mode rmsd u.b.
1	-11.4	0.000	0.000
2	-10.9	4.287	8.136
3	-10.2	3.039	4.191
4	-10.2	4.337	7.490
5	-10.1	3.960	5.963
6	-10.1	6.275	10.665
7	-10.0	5.542	8.972
8	-10.0	7.002	11.395
9	-9.9	5.537	9.847

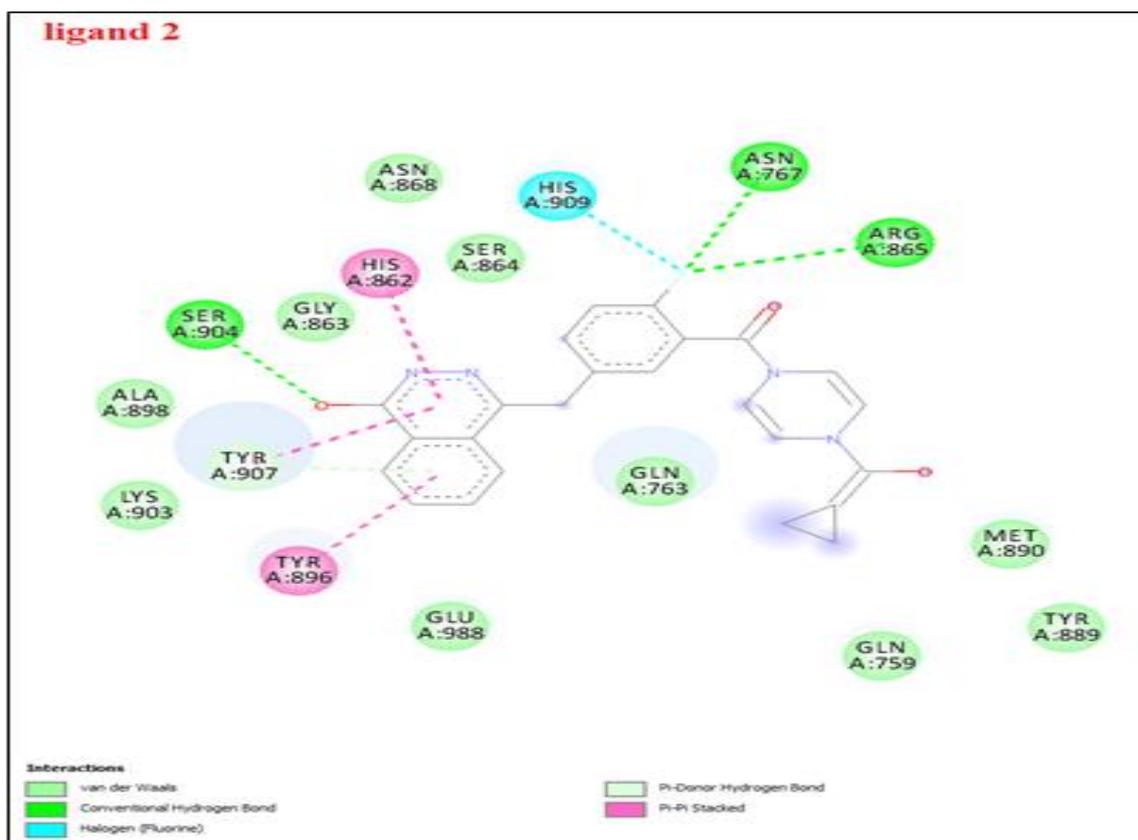
Nous avons pu identifier dix liaisons qui peuvent lier le ligand au récepteur qui sont : deux liaison hydrogène bond halogène, une liaison hydrogène , deux liaison halogène , une liaison hydrogène bond , quatre liaison hydrophobe

Les résultats montre que les acide aminé impliqué sont ASN767, ARG865, SER904, ASN767, HIS909, HIS862, TYR896, TYR907 .

## CHAPITRE III : ÉTUDE DE L'INTERACTION PROTEINE – LIGAND

**Tableau 7:** Les acide aminé impliqué dans l'interaction

Name	visible	color	distance	Category	Types	From	From Chemistry	To	To Chemistry
A:ASN767:ND2:UNK0:F	yes		3.49669	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond;Halogn(Fluorine)	A:ASN767:ND2	H-Donor;Halogen Acceptor	:UNK0:F	H-Acceptor; Halogen
A:ARG865:NE-:UNK0:F	yes		3.65253	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond;Halogn(Fluorine)	A:ARG865:NE	H-Donor;Halogen Acceptor	:UNK0:F	H-Acceptor; Halogen
A:SER904:OG-:UNK0:O	yes		2.71406	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	A:SER904:OG	H-Donor	:UNK0:O	H-Acceptor
A:ASN767:OD1:UNK0:F	yes		3.30827	Halogen	Halogen (Fluorine)	A:ASN767:OD1	Halogen Acceptor	:UNK0:F	Halogen
A:HIS909:NE2-:UNK0:F	yes		3.3586	Halogen	Halogen (Fluorine)	A:HIS909:NE2	Halogen Acceptor	:UNK0:F	Halogen
A:TYR907:OH-:UNK0	yes		3.9304	Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond	A:TYR907:OH	H-Donor	:UNK0	Pi-Orbital
A:HIS862-:UNK0	yes		4.72458	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked	A:HIS862	Pi-Orbitals	:UNK0	Pi-Orbital
A:TYR896-:UNK0	yes		5.07768	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked	A:TYR896	Pi-Orbitals	:UNK0	Pi-Orbital
A:TYR907-:UNK0	yes		4.04516	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked	A:TYR907	Pi-Orbitals	:UNK0	Pi-Orbital
A:TYR907-:UNK0	yes		4.14488	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked	A:TYR907	Pi-Orbitals	: UNK0	Pi-Orbital



**Figure 9** :Diagramme2D d'interactions

Les résultats montre que Il y a 3 type d'interaction : interaction hydrophobique ,interaction par liaison hydrogène , et interaction par liaison hydrogène halogène

Les résultats montre qu'il y a deux liaison hydrogène bond halogène entre les acide aminé ASN 767 et ARG 865 avec l'atome de fluor. En plus une Liaison Hydrogène entre l'acide aminé SER 904 avec l'atome de l'oxygène. Il y a aussi deux Liaison halogène entre les acide aminé ASN767 et HIS909 avec l'atome de fluor. Ainsi qu'une Liaison hydrogène bond TYR 907. De même quatre Liaison hydrophobique entre les acide aminé HIS862 TYR896 TYR 907 et l'hétérocyclique « phthalazine ».

**Remarque :** Il faut noter que l'acide aminé TYR907 est lier par deux type de liaison qui sont une liaison hydrogène et 2 liaison hydrophobe

### 3. Discussion

Permi les travaux sur la protein PARP et l'olaparib l'étude de Cheng-zhi Gao qui étudié l'interaction de l'olaparib et d'autres inhibiteur avec le récepteur PARP-1 (code pdb :5DS3) : l'amarrage moléculaire de (E)-4-{{3-[4-(3-(3-nitrophenyl) acryloyl) piperazine-1-carbonyl]-4-fluorophenyl] methyl} -2H -phthalazin-1-one (5l) a montré qu'il s'insérait dans le site actif de l'enzyme presque à la même position que le Olaparib. Trois liaisons hydrogène dans le complexe 5l-PARP-1 ont été formées dans le cycle phtalazinone qui était bien reconnu comme un échafaudage principalement responsable de l'activité inhibitrice de PARP-1, le groupe carbonyle comme accepteur de la liaison H avec le groupe A-NH Gly863 et le groupe A-OH Ser904 le groupe -NH en tant que donneur de liaisons H avec le groupe Gly863 A-C=O. La quatrième liaison hydrogène identique a été établie entre le groupe C=O de la fraction acryloyle et le groupe Arg878 A-NH. Le groupe nitro nouvellement introduit a formé une liaison hydrogène avec le groupe A-NH Gly871. Cependant, un autre groupe C=O lié à la fraction pipérazine n'a pas formé de liaison hydrogène avec le groupe A-NH Tyr896 par rapport à l'Olaparib, ce qui est peut-être l'une des raisons pour lesquelles 5l a eu un effet moins puissant sur l'inhibition de la PARP-1 que l'Olaparib, comme le montrent les expériences in vitro. Outre l'interaction de la liaison hydrogène, le composé 5l a formé des interactions hydrophobes avec les résidus Tyr907, Lys903, Phe897, Tyr896, His862, Ile895, Gly894, Leu877 et Asn868. l'amarrage moléculaire de (E)-4-{{3-[4-(3-(4-methoxyphenyl) acryloyl) piperazine-1-carbonyl]-4-fluorophenyl] methyl} -2H-phthalazin-1-one (5c) et (E)-4-{{3-[4-(3-(3-fluorophenyl) acryloyl) piperazine-1-carbonyl]-4-fluorophenyl] methyl} -2H -phthalazin-1-one (5i) dans le PARP-1 ont formé deux et trois liaisons hydrogène correspondantes avec le PARP-1, qui étaient similaires à celles du 5l et de l'Olaparib : le groupe carbonyle comme accepteur de la liaison H avec le groupe Ser904 A-OH ou le groupe Gly863A-NH, le groupe -NH comme donneur de la liaison H avec le groupe Gly863 A - C=O. Cependant, dans les autres fractions de 5c et 5i, une seule position a formé une liaison hydrogène avec le PARP-1, contre deux positions dans celles de 5l et Olaparib (Gao et al. 2019)

Le travail de Jian Li qui étudié l'interaction de l'olaparib avec le récepteur PARP-1 (code pdb :4UND) et ils sont trouver que l'olaparib s'est lié au PARP-1 en formant 3 liaisons hydrogène avec le NE et le NH<sub>2</sub> de ARG878, le N<sub>2</sub> de l'olaparib a formé une autre liaison hydrogène avec le GLY863 (Li et al, 2016) (Gao et al. 2019).

On remarque que les autres études ont montré qu'il y a une liaison entre GLY863 et l'olaparib mais ce n'est pas le cas dans notre étude (Li et al,2016) (Gao et al. 2019)

Notre travail a révélé que l'olaparib interagissent directement avec les acides aminés de PARP-1 tels que ASN767 ,ARG865 ,SER904 ,ASN767 ,HIS909 ,HIS862 ,TYR896 ,TYR907. Et forme 3 type d'interaction : interaction hydrophobique ,interaction par liaison hydrogène , et interaction par liaison hydrogène halogène

Les résultats prouvent que L'atome de fluor joue un rôle important et unique en influençant la conformation moléculaire. Du point de vue des effets stériques, l'influence du fluor devrait être marginale, et le fluor est un petit atome d'un rayon de van der Waals de 1,47 Å, qui est proche du rayon de 1,20 Å de l'hydrogène (Shen et,2013)(O'Hagan et al,2008). En outre, le fluor est un outil puissant pour moduler le pKa (Hunter et al,2010)(Eastman et al,2014) Les modifications du pKa peuvent se manifester par des changements de puissance, de sélectivité, de toxicité et de propriétés pharmacocinétiques (PK), y compris l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) .De toute évidence, l'incorporation de fluor dans les molécules médicamenteuses est une stratégie couramment utilisée pour augmenter l'activité pharmacologique et optimiser le profil ADME(Eastman et al,2014)

Notre étude peut être utile pour la compréhension d'un mécanisme possible qui soutient la sélectivité des inhibiteurs de PARP-1 pour le but d'inhiber la molécule caf 1 (inhibition en succivité) pour le maintien de la totipotence pour faciliterait considérablement notre compréhension des processus de développement fondamentaux et offrirait un grand potentiel pour la médecine régénérative

## **Conclusion et Perspective**

### 1. Conclusion

Les protéines de remodelage de la chromatine jouent un rôle important dans les processus de maintenance du génome, y compris la réparation et la réplication de l'ADN, également impliquées dans le développement et la progression de plusieurs tumeurs malignes humaines. Le facteur d'assemblage de la chromatine 1 (CAF-1) est un « chaperon d'histone » impliquées dans les processus de réparation et de réplication de l'ADN

Récemment, la présence de défauts dans les gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologe a ouvert la voie à l'utilisation d'inhibiteurs de PARP comme une stratégie thérapeutique

Dans ce travail, nous avons étudié les interactions moléculaires entre la Poly (ADP-ribose) polymérase et l'olaparib à l'aide des méthodes de la modélisation moléculaire. Notre étude a révélé que l'olaparib interagissent directement avec les acides aminés d de PARP-1 tels que ASN767, ARG865, SER904, ASN767, HIS909, HIS862, TYR896, TYR907. Et forme 3 type d'interaction : interaction hydrophobique, interaction par liaison hydrogène, et interaction par liaison hydrogène halogène

### 2. Perspective

Ce travail n'est cependant pas encore terminé, les prochaines étapes consisteront :

- A utiliser d'autre programmes de docking moléculaire, parmi les plus récents et les plus performants, pour taster d'autre inhibiteurs PARP.
- La conception d'une Proteolysis Targeting Chimeras (PROTAC) ciblé la molécule CAF 1.
- Enfin une étude expérimental in vitro devra permettre de vérifier la véracité des résultats théorique obtenus.

## **Références Bibliographique**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alabert C, Groth A. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:153-67; PMID:22358331
- Allinger NL. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J Am Chem Soc* 1977;99:812734
- Amé JC, Spenlehauer C, De Murcia G. The PARP superfamily. *BioEssays* 2004; 26: 882-893.
- Ansm.<https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/ATU-de-cohorte-en-cours/Liste-des-ATU-de-cohorte-en-cours/LYNPARZA-100-mg-comprime-pellicule>
- Azmi, I.F., Watanabe, S., Maloney, M.F., Kang, S., Belsky, J.A., MacAlpine, D.M., Peterson, C.L. and Bell, S.P. (2017) Nucleosomes influence multiple steps during replication initiation. *Elife*, 6, e22512.
- Barkauskaite E, Jankevicius G, Aheill. Structures and mechanisms of enzymes employed in the synthesis and degradation of PARP-dependent protein ADP-ribosylation. *Mol Cell* 2015; 58:935–46.
- Benson, L.J., Gu, Y., Yakovleva, T., Tong, K., Barrows, C., Strack, C.L., Cook, R.G., Mizzen, C.A. and Annunziato, A.T. (2006) Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange. *J. Biol. Chem.*, 281, 9287–9296
- Biard D.S. Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic acids research* 35(11):3535-3550, 2007.
- Biard D.S., Despras E., Sarasin A. and Angulo J.F. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 3(9):519-529, 2005.
- Boskovic A, Eid A, Pontabry J, Ishiuchi T, Spiegelhalter C, Raghu Ram EV, Meshorer E, Torres-Padilla ME (2014) Higher chromatin mobility supports totipotency and precedes pluripotency in vivo. *Genes Dev* 28:1042–1047
- Boudra, Mohammed-Tayyib .2011. « Facteurs modulant la radiosensibilité: rôle des protéines PARP-1, PARP-2 et Cdk5 et implication de la chromatine ».
- Cepeda, Victoria et al. 2006. « Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors in Cancer Chemotherapy ». *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 1(1): 39-53.
- Cheloufi, S., Elling, U., Hopfgartner, B., Jung, Y.L., Murn, J., Ninova, M., Hubmann, M., Badaux, A. I., Euong Ang, C., Tenen, D., Wesche, D. J., Abazova, N., Hogue, M., Tasdemir, N., Brumbaugh, J., et al. (2015) The histone chaperone CAF-1 safeguards somatic cell identity. *Nature* 528, 218–224

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chen, C. C., J. J. Carson, et al. (2008). "Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair." *Cell* 134(2): 231-243.
- Chu F, Baker PR, Burlingame AL, Chalkley RJ. 2010. Finding chimeras: a bioinformatics strategy for identification of cross-linked peptides. *Molecular and Cellular Proteomics* 9:25–31. doi: 10.1074/mcp.M800555-MCP200
- Cosi C. New inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and their potential therapeutic targets. *Exp Opin Therapeut Pat* 2002 12(7): 1047-71.
- Coupez B, Lewis R: Docking and scoring-Theoretically easy, practically impossible? *Current medicinal chemistry* 2006, 13(25):2995-3003.
- Das,C., Lucia,M.S.S., Hansen,K.C.K.C.C. and Tyler,J.K.K.J.K. (2009) CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature*, 459, 113–117.
- de Murcia G, Menissier de Murcia J. Poly(ADP-Ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994; 19(4): 172-6. (a)
- de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, et al. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 1994 138(1-2): 15-24.(b)
- Devbhandari,S., Jiang,J., Kumar,C., Whitehouse,I. and Remus,D. (2017) Chromatin constrains the initiation and elongation of DNA replication. *Mol. Cell*, 65, 131–141.
- Driscoll,R., Hudson,A. and Jackson,S.P. (2007) Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science*, 315, 649–652.
- Du L, Zhang X, Han YY, et al. Intra-mitochondrial poly(ADPribosylation) contributes to NAD<sup>+</sup> depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 2003; 278(20): 1842633.
- Eastman KJ, Gillis EP, Meanwell NA. Tactical applications of fluorine in drug design and development. *Fluorine in Heterocyclic Chemistry, Volume 1, 5-Membered Heterocycles and Macrocycles*; Nenajdenko V. Ed.; Springer International: Cham, Switzerland, 2014; 1–54.
- Evsikov AV, de Vries WN, Peaston AE, Radford EE, Fancher KS, Chen FH, Blake JA, Bult CJ, Latham KE, Solter D et al (2004) Systems biology of the 2-cell mouse embryo. *Cytogenet Genome Res* 105:240–250
- Exner,V.,Taranto,P.,Schönrock,N.,Gruissem,W.,andHennig,L.(2006) ChromatinassemblyfactorCAF-1isrequiredforcellulardifferentiation duringplantdevelopment.*Development*133,4163–4172
- Foloppe N, Hubbard R: Towards predictive ligand design with free-energy based computational methods? *Current medicinal chemistry* 2006, 13(29):3583-3608.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumours from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361:123-34
- Gaillard, P. H., E. M. Martini, et al. (1996). "Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I." *Cell* 86(6): 887-896.
- Gao, Cheng-Zhi et al. 2019. « Synthesis, Preliminary Biological Evaluation and Molecular Docking Study of New Olaparib Analogues as Multifunctional PARP-1 and Cholinesterase Inhibitors ». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34(1): 150-62.
- Gasser,R., Koller,T. and Sogo,J.M. (1996) The stability of nucleosomes at the replication fork. *J. Mol. Biol.*, 258, 224–239
- Ge,Z., Nair,D., Guan,X., Rastogi,N., Freitas,M.A. and Parthun,M.R. (2013) Sites of acetylation on newly synthesized histone H4 are required for chromatin assembly and DNA damage response signaling. *Mol. Cell. Biol.*, 33, 3286–3298.
- Gerard,A., Koundrioukoff,S., Ramillon,V., Sergere,J.C., Mailand,N., Quivy,J.-P.P., Almouzni,G., G´erard,A., Koundrioukoff,S., Ramillon,V. et al. (2006) The replication kinase Cdc7-Dbf4 promotes the interaction of the p150 subunit of chromatin assembly factor 1 with proliferating cell nuclear antigen. *EMBO Rep.*, 7, 817–823.
- Graves AP, Brenk R, Shoichet BK: Decoys for docking. *Journal of medicinal chemistry* 2005, 48(11):3714-3728.
- Green, C. M. and G. Almouzni (2003). "Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo." *EMBO J* 22(19): 5163-5174.
- Hendrickson JB. Molecular geometry. I. Machine computation of the common rings. *J Am Chem Soc* 1961;83:453747.
- Hunter L. The C–F bond as a conformational tool in organic and biological chemistry. *Beilstein J Org Chem* 2010; 6: 38.
- Ishii, S., A. Koshiyama, et al. (2008). "Interaction between Lim15/Dmc1 and the homologue of the large subunit of CAF-1: a molecular link between recombination and chromatin assembly during meiosis." *FEBS J* 275(9): 2032-2041.
- Ishiuchi T, Torres-Padilla ME. Towards an understanding of the regulatory mechanisms of totipotency. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23:512-8; PMID:23942314
- Jeffery DC, Wyse BA, Rehman MA, Brown GW, You Z, Oshidari R, Masai H, Yankulov KY. Analysis of epigenetic stability and conversions in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a novel role of CAF-I in position-effect variegation. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:8475-88; PMID:23863839
- Jeffery,D.C.B., Kakusho,N., You,Z., Gharib,M., Wyse,B., Drury,E., Weinreich,M., Thibault,P., Verreault,A., Masai,H. et al. (2015) CDC28 phosphorylates Cac1p and

regulates the association of chromatin assembly factor I with chromatin. *Cell Cycle*, 14, 74–85.

- Jones,D.T. and Cozzetto,D. (2015) DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics*, 31, 857–863.
- Kato,T., Sato,N., Hayama,S., Yamabuki,T., Ito,T., Miyamoto,M., Kondo,S., Nakamura,Y. and Daigo,Y. (2007) Activation of holliday Junction–Recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. *Cancer Res.*, 67, 8544–8553.
- Kaufman PD, Kobayashi R, Kessler N, Stillman B. 1995. The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* 81:1105–1114. doi: 10.1016/ S0092-8674(05)80015-7
- Kaufman PD. Want reprogramming? Cut back on the chromatin assembly! *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22:64850; PMID:26333710;
- Kaufman,P.D., Cohen,J.L. and Osley,M.A. (1998) Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 4793–4806.
- Kaur J and Singh P. Acridine derivatives: a patent review (2009-2010). *Expert Opin Ther Pat* 2011; 21(4): 437- 454.
- Keck,K.M. and Pemberton,L.F. (2012) Histone chaperones link histone nuclear import and chromatin assembly. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, 1819, 277–289. 105
- Keller,C. and Krude,T. (2000) Requirement of Cyclin/Cdk2 and protein phosphatase 1 activity for chromatin assembly factor 1-dependent chromatin assembly during DNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 275, 35512–35521.
- Kim, J. A. and J. E. Haber (2009). "Chromatin assembly factors Asf1 and CAF-1 have overlapping roles in deactivating the DNA damage checkpoint when DNA repair is complete." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(4): 1151-1156.
- Kim,D., Setiaputra,D., Jung,T., Chung,J., Leitner,A., Yoon,J., Aebersold,R., Hebert,H., Yip,C.K. and Song,J.-J. (2016) Molecular architecture of yeast chromatin assembly factor 1. *Sci. Rep.*, 6, 26702.
- Kinoshita T, Nakanishi I, Warizaya M, et al. Inhibitor-induced structural change of the active site of human poly(ADP-ribose) polymerase. *FEBS Lett* 2004; 556(1-3): 43-6.
- Krawitz,D.C., Kama,T. and Kaufman,P.D. (2002) Chromatin assembly factor I mutants defective for PCNA binding require Asf1/Hir proteins for silencing. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 614–625.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kurat,C.F., Yeeles,J.T.P., Patel,H., Early,A. and Diffley,J.F.X. (2017) Chromatin controls DNA replication origin selection, lagging-strand synthesis, and Replication fork rates. *Mol. Cell*, 65, 117–130.
- Leach AR, Shoichet BK, Peishoff CE: Prediction of protein– ligand interactions. Docking and scoring: Successes and gaps. *Journal of medicinal chemistry* 2006, 49(20):5851-5855.
- Leitner A, Walzthoeni T, Kahraman A, Herzog F, Rinner O, Beck M, Aebersold R. 2010. Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics. *Molecular & Cellular Proteomics* 9: 1634–1649. doi: 10.1074/mcp.R000001-MCP201
- Lejon,S., Thong,S.Y., Murthy,A., AlQarni,S., Murzina,N. V, Blobel,G.A., Laue,E.D. and Mackay,J.P. (2011) Insights into association of the NuRD complex with FOG-1 from the crystal structure of an RbAp48.FOG-1 complex. *J. Biol. Chem.*, 286, 1196–1203.
- Li Q, Zhou H, Wurtele H, Davies B, Horazdovsky B, Verreault A, Zhang Z. 2008. Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell* 134:244–255. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.018
- Li, Jian, Nan Zhou, Peiling Cai, et Jinku Bao. 2016. « In Silico Screening Identifies a Novel Potential PARP1 Inhibitor Targeting Synthetic Lethality in Cancer Treatment ». *International Journal of Molecular Sciences* 17(2): 258.
- Li,Q., Zhou,H., Wurtele,H., Davies,B., Horazdovsky,B., Verreault,A. and Zhang,Z. (2008) Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell*, 134, 244–255. 102.
- Ling,X., Harkness,T.A.A., Schultz,M.C., Fisher-Adams,G. and Grunstein,M. (1996) Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: Redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev.*, 10, 686–699.
- Liu WH, Churchill ME. 2012. Histone transfer among chaperones. *Biochemical Society Transactions* 40:357–363. doi: 10.1042/BST20110737
- Liu,W.H., Roemer,S., Port,A. and Churchill,M. (2017) CAF-1-induced oligomerization of histones H3/H4 and mutually exclusive interactions with Asf1 guide H3/H4 transitions among histone chaperones and DNA. *Nucleic Acids Res.*, 45, 9809
- Liu,W.H., Roemer,S.C., Port,A.M. and Churchill,M.E.A. (2012) CAF-1-induced oligomerization of histones H3/H4 and mutually exclusive interactions with Asf1 guide H3/H4 transitions among histone chaperones and DNA. *Nucleic Acids Res.*, 40, 11229–11239
- Liu,W.H., Roemer,S.C., Zhou,Y., Shen,Z.-J., Dennehey,B.K., Balsbaugh,J.L., Liddle,J.C., Nemkov,T., Ahn,N.G., Hansen,K.C. et al. (2016) The Cac1 subunit of

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

histone chaperone CAF-1 organizes CAF-1-H3/H4 architecture and tetramerizes histones. *Elife*, 5, 1–26.

- Liu, Y.W., Huang, H.D., Zhou, B.O., Wang, S.-S.S., Hu, Y.X., Li, X., Liu, J.P., Zang, J.Y., Niu, L.W., Wu, J.H. et al. (2010) Structural analysis of Rtt106p reveals a DNA binding role required for heterochromatin silencing. *J. Biol. Chem.*, 285, 4251–4262.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251–260.
- Marchetti, Claudia et al. 2012. «Olaparib, PARP1 Inhibitor in Ovarian Cancer ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 21(10): 1575-84.
- Müller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., Simon, J.A. et al. (2002) Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell*, 111, 197–208.
- Malay, A.D., Umehara, T., Matsubara-Malay, K., Padmanabhan, B. and Yokoyama, S. (2008) Crystal structures of fission yeast histone chaperone Asf1 complexed with the Hip1 B-domain or the Cac2 C terminus. *J. Biol. Chem.*, 283, 14022–14031.
- Marecki JC, McCord JM. The inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase enhances growth rates of ataxia telangiectasia cells. *Arch Biochem Biophys* 2002; 402(2): 227-34.
- Marsischky GT, Wilson BA, Collier RJ. Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribose polymerase toxins. *J Biol Chem* 1995; 270(7): 3247-54.
- Marsischky GT, Wilson BA, Collier RJ. Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribose polymerase toxins. *J Biol Chem* 1995; 270(7): 3247-54.
- Martínez-Balbas, M.A., Tsukiyama, T., Gdula, D. and Wu, C. (1998) *Drosophila* NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 132–137.
- Masson MV, Rolli FD, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase: structure-function relationship. *Biochimie* 1995; 77(6): 456-61.
- Masson MV, Rolli FD, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase: structure-function relationship. *Biochimie* 1995; 77(6): 456-61.
- Mattioli, F., Gu, Y., Balsbaugh, J.L., Ahn, N.G. and Luger, K. (2017) The Cac2 subunit is essential for productive histone binding and nucleosome assembly in CAF-1. *Sci. Rep.*, 7, 46274.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mattioli, F., Gu, Y., Yadav, T., Balsbaugh, J.L., Harris, M.R., Findlay, E.S., Liu, Y., Radebaugh, C.A., Stargell, L.A., Ahn, N.G. et al. (2017) DNA-mediated association of two histone-bound CAF-1 complexes drives tetrasome assembly in the wake of DNA replication. *Elife*, 6, e22799.
- McConkey BJ, Sobolev V, Edelman M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science*. 2002;83:845–855.
- Mejlvang, J., Feng, Y., Alabert, C., Neelsen, K.J., Jasencakova, Z., Zhao, X., Lees, M., Sandelin, A., Pasero, P., Lopes, M. et al. (2014) New histone supply regulates replication fork speed and PCNA unloading. *J. Cell Biol.*, 204, 29–43.
- Mello, J.A., Sillje, H.H., Roche, D.M., Kirschner, D.B., Nigg, E.A. and Almouzni, G. (2002) Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.*, 3, 329–334.
- Menear KA, Adcock C, Boulter R, et al. 4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2Hphthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Med Chem* 2008;51(20):6581-91
- Moggs, J.G., Grandi, P., Quivy, J.P., Jónsson, Z.O., Hübscher, U., Becker, P.B. and Almouzni, G. (2000) A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 1206–1218.
- Nagarajan, P., Ge, Z., Sirbu, B., Doughty, C., Agudelo Garcia, P.A., Schleder, M., Annunziato, A.T., Cortez, D., Kenner, L. and Parthun, M.R. (2013) Histone acetyltransferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4. *PLoS Genet.*, 9, e1003518.
- Nakano, S., Stillman, B. and Horvitz, H.R. (2011) Replication-coupled chromatin assembly generates a neuronal bilateral asymmetry in *C. elegans*. *Cell*, 147, 1525–1536
- Nowak, A.J., Alfieri, C., Stirnimann, C.U., Rybin, V., Baudin, F., Ly-Hartig, N., Lindner, D. and Müller, C.W. (2011) Chromatin-modifying complex component Nurf55/p55 associates with histones H3 and H4 and polycomb repressive complex 2 subunit Su(z)12 through partially overlapping binding sites. *J. Biol. Chem.*, 286, 23388–23396.
- O'Hagan D. Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond. *Chem Soc Rev* 2008; 37: 308–19.
- Poepsel, S., Kasinath, V. and Nogales, E. (2018) Cryo-EM structures of PRC2 simultaneously engaged with two functionally distinct nucleosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 25, 154–162.
- Probst AV, Santos F, Reik W, Almouzni G, Dean W (2007) Structural differences in centromeric heterochromatin are spatially reconciled on fertilisation in the mouse zygote. *Chromosoma* 116: 403–415

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pubchem .Computed by LexiChem 2.6.6 (PubChem release 2019.06.18) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Olaparib#section=IUPAC-Name&fullscreen=true>. (accessed checked on 22/09/2020)
- Quivy,J.P., Grandi,P. and Almouzni,G. (2001) Dimerization of the largest subunit of chromatin assembly factor 1: Importance in vitro and during *Xenopus* early development. *EMBO J.*, 20, 2015–2027
- Ray-Gallet,D., Woolfe,A., Vassias,I., Pellentz,C., Lacoste,N., Puri,A., Schultz,D.C., Pchelintsev,N.A., Adams,P.D., Jansen,L.E.T. et al. (2011) Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome Gap-Filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol. Cell*, 44, 928–941.
- Richmond,T.J. and Davey,C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423, 145–150.
- Ridgway,P.,andAlmouzni,G.(2000)CAF1andtheinheritanceofchromatinstates:atthecrossroadsofDNAreplicationandrepair.*J.CellSci.* 113,2647–2658
- Rolef Ben-Shahar,T., Castillo,A.G., Osborne,M.J., Borden,K.L.B., Kornblatt,J. and Verreault,A. (2009) Two fundamentally distinct PCNA interaction peptides contribute to chromatin assembly factor 1 function. *Mol. Cell. Biol.*, 29, 6353–6365.
- Roy K, Kar S, Das RN: Understanding the basics of QSAR for applications in pharmaceutical sciences and risk assessment: Academic press; 2015.
- Ruf A, de Murcia G, Schulz . Inhibitor and NAD<sup>+</sup> binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling. *Biochemistry* 1998; 37(11): 3893-900.
- Ruf A, Mennissier de Murcia J, de Murcia G, Schulz GE. Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(15): 7481-5.
- Ruf AR, de Murcia G, Schulz GE. The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *J Mol Biol* 1998; 278(1): 57-65
- Sauer, Paul V et al. 2018. « Mechanistic Insights into Histone Deposition and Nucleosome Assembly by the Chromatin Assembly Factor-1 ». *Nucleic Acids Research* 46(19): 9907-17.
- Sauer,P.V., Timm,J., Liu,D., Sitbon,D., Boeri-Erba,E., Velours,C., M'ucke,N., Langowski,J., Ochsenbein,F., Almouzni,G. et al. (2017) Insights into the molecular architecture and histone H3–H4 deposition mechanism of yeast chromatin assembly factor 1. *Elife*, 6, e23474.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Schmitges, F.W., Prusty, A.B., Faty, M., Stützer, A., Lingaraju, G.M., Aiwazian, J., Sack, R., Hess, D., Li, L., Zhou, S. et al. (2011) Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol. Cell*, 42, 330–341
- Schneider G, Böhm H-J: Virtual screening and fast automated docking methods. *Drug discovery today* 2002, 7(1):64-70.
- Schopf, B., S. Bregenhorn, et al. (2012). "Interplay between mismatch repair and chromatin assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(6): 1895-1900.
- Schulz-Gasch T, Stahl M: Scoring functions for protein–ligand interactions: a critical perspective. *Drug Discovery Today: Technologies* 2004, 1(3):231-239.
- Sharp JA, Franco AA, Osley MA, Kaufman PD. Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 2002; 16:85-100; PMID:11782447
- Shen Y, Rehman FL, Feng Y, Boshuizen J, Bajrami I, Elliott R, et al. BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5003–15
- Shibahara, K. and Stillman, B. (1999) Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell*, 96, 575–585
- Shibahara, K., Verreault, A. and Stillman, B. (2000) The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor-1-mediated nucleosome assembly onto replicated DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 7766–7771.
- Simonin FL, Hofferer PL, Panzeter SM, de Murcia G, Althaus FR. The carboxyl-terminal domain of human poly(ADP-ribose) polymerase. Overproduction in *Escherichia coli*, large scale purification, and characterization. *J Biol Chem* 1993; 268(18): 13454-61.
- Skalitzky DJ, Marakovits JT, Maegley KA, et al. Tricyclic benzimidazoles as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *J Med Chem* 2003; 46(2): 210-3.
- Slade, Dea. 2020. « PARP and PARG Inhibitors in Cancer Treatment ». *Genes & Development* 34(5-6): 360-94.
- Smith, S. The world according to PARP. *Trends Biochem Sci*. 2001 26(3): 174-9.
- Sobel, R.E., Cook, R.G., Perry, C.A., Annunziato, A.T. and Allis, C.D. (1995) Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 1237–1241.
- Sogo, J.M., Stahl, H., Koller, T. and Knippers, R. (1986) Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J. Mol. Biol.*, 189, 189–204

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Song,J.-J., Garlick,J.D. and Kingston,R.E. (2008) Structural basis of histone H4 recognition by p55. *Genes Dev.*, 22, 1313–1318.
- Spdbv home.<https://spdbv.vital-it.ch/>.(accessed checked on 22/09/2020)
- Tagami,H., Ray-Gallet,H, G. Almouzni, Y. Nakatani, Histone H3.1 and H3.3 com510 plexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of 511 DNA synthesis, *Cell* 116 (2004) 51–61. 512
- Tang,Y., Poustovoitov,M. V, Zhao,K., Garfinkel,M., Canutescu,A., Dunbrack,R., Adams,P.D. and Marmorstein,R. (2006) Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 921–929.
- Tarkowski AK (1959) Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 184:1286–1287
- Taunton,J., Hassig,C.A. and Schreiber,S.L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 272, 408–411.
- Thiru,A., Nietlispach,D., Mott,H.R., Okuwaki,M., Lyon,D., Nielsen,P.R., Hirshberg,M., Verreault,A., Murzina,N.V. and Laue,E.D. (2004) Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J.*, 23, 489–499.
- Tyler,J.K., Collins,K.A., Prasad-Sinha,J., Amiott,E., Bulger,M., Harte,P.J., Kobayashi,R. and Kadonaga,J.T. (2001) Interaction between the drosophila CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 6574–6584.
- Uwada,J., Tanaka,N., Yamaguchi,Y., Uchimura,Y., Shibahara,K., Nakao,M. and Saitoh,H. (2010) The p150 subunit of CAF-1 causes association of SUMO2/3 with the DNA replication foci. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391, 407–413.
- Venkatesan SK, Shukla AK, Dubey VK. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. *J Comput Chem* 2010;31(13):2463.
- Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87,95–104
- Verreault,A., Kaufman,P.D., Kobayashi,R. and Stillman,B. (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell*, 87, 95–104.
- Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54(3): 375-429.
- Walzthoeni T, Leitner A, Stengel F, Aebersold R. 2013. Mass spectrometry supported determination of protein complex structure. *Current Opinion in Structural Biology* 23:252–260. doi: 10.1016/j.sbi.2013.02.008

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Warren,C. and Shechter,D. (2017) Fly fishing for Histones: Catch and release by histone chaperone intrinsically disordered regions and acidic stretches. *J. Mol. Biol.*, 429, 2401–2426.
- WeaverAN, YangES. Beyond DNA repair: additional functions of PARP-1 in cancer. *Front Oncol* 2013;3:290. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00290>.
- Wen,P., Quan,Z. and Xi,R. (2012) The biological function of the WD40 repeat-containing protein p55/Caf1 in *Drosophila*. *Dev. Dyn.*, 241, 455–464
- Winkler DD, Zhou H, Dar MA, Zhang Z, Luger K. 2012b. Yeast CAF-1 assembles histone (H3-H4)<sub>2</sub> tetramers prior to DNA deposition. *Nucleic Acids Research* 40:10139–10149. doi: 10.1093/nar/gks812
- Winkler,D., Zhou,H., Dar,M., Zhang,Z. and Luger,K. (2017) Yeast CAF-1 assembles histone (H3–H4) 2 tetramers prior to DNA deposition. *Nucleic Acids Res.*, 45, 9811–9812.
- Winkler,D.D., Zhou,H., Dar,M.A., Zhang,Z. and Luger,K. (2012) Yeast CAF-1 assembles histone (H3–H4)<sub>2</sub> tetramers prior to DNA deposition. *Nucleic Acids Res.*, 40, 10139–10149.
- Wurtele, H., G. S. Kaiser, et al. (2012). "Histone H3 lysine 56 acetylation and the response to DNA replication fork damage." *Mol Cell Biol* 32(1): 154-172.
- Xiao,H., Mizuguchi,G., Wisniewski,J., Huang,Y., Wei,D. and Wu,C. (2011) Nonhistone Scm3 binds to AT-Rich DNA to organize atypical centromeric nucleosome of budding yeast. *Mol. Cell*, 43, 369–380.
- Xue,Y., Wong,J., Moreno,G.T., Young,M.K., Côté,J. and Wang,W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell*, 2, 851–861.
- Yang,X., Yu,W., Shi,L., Sun,L., Liang,J., Yi,X., Li,Q., Zhang,Y., Yang,F., Han,X. et al. (2011) HAT4, a Golgi Apparatus-Anchored B-Type histone acetyltransferase, acetylates free histone H4 and facilitates chromatin assembly. *Mol. Cell*, 44, 39–50.
- Yankulov K. Dynamics and stability: epigenetic conversions in position effect variegation. *Biochem Cell Biol* 2013; 91:6-13; PMID:23442136 Ye,J., Ai,X., Eugeni,E.E., Zhang,L., Carpenter,L.R., Jelinek,M.A., Freitas,M.A. and Parthun,M.R. (2005) Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly. *Mol. Cell*, 18, 123–130.
- Zhang,K., Gao,Y., Li,J., Burgess,R., Han,J., Liang,H., Zhang,Z. and Liu,Y. (2016) A DNA binding winged helix domain in CAF-1 functions with PCNA to stabilize CAF-1 at replication forks. *Nucleic Acids Res.*, 44, 5083–5094
- Zhang,W., Tyl,M., Ward,R., Sobott,F., Maman,J., Murthy,A.S., Watson,A.A., Fedorov,O., Bowman,A., Owen-Hughes,T. et al. (2013) Structural plasticity of histones

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

H3–H4 facilitates their allosteric exchange between RbAp48 and ASF1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20, 29–35.

## Résumé :

Les cellules totipotentes embryonnaires peuvent produire des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires et générer des organismes entiers.

Dans un article récent ont rapporté que la déplétion d'un chaperon d'histone appelé Chromatin Assembly Factor I (CAF-I) augmente considérablement la proportion de cellules de type 2C-like dans les cultures de cellule souche embryonnaire . Le (CAF-1) est un «protéine chaperon d'histone » impliquées dans les processus et de réplication et de la réparation d'ADN par recombinaison homologue (HR).

la présence de défauts dans les gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN par (HR) a ouvert la voie à l'utilisation d'inhibiteurs de la poly-ADP-ribose-polymérase-1 (PARP) .

Les inhibiteurs de la PARP sont des molécules actuellement en développement en oncologie.

Dans ce travail, nous avons étudié les interactions moléculaires entre la Poly (ADP-ribose) polymérase et l'olaparib à l'aide des méthodes de la modélisation moléculaire. Notre étude a révélé que l'olaparib interagissent directement avec les acides aminés de PARP-1 et forme 3 type d'interaction : interaction hydrophobique, interaction par liaison hydrogène, et interaction par liaison hydrogène halogène.

**Mot clé :** Les cellules totipotent ,CAF-1,PARP-1,Olaparib

## Abstrat

Embryonic totipotent cells can produce embryonic and extra-embryonic tissue and generate whole organisms.

In a recent article reported that depletion of a histone chaperone called Chromatin Assembly Factor I (CAF-I) significantly increases the proportion of 2C-like cells in embryonic stem cell cultures. The (CAF-1) is a "histone chaperone protein" involved in the processes and replication and DNA repair by homologous recombination (HR).

the presence of defects in genes involved in the repair of DNA damage by (HR) paved the way for the use of poly-ADP-ribose-polymerase 1 (PARP) inhibitors

PARP inhibitors are molecules that are currently in development in oncology.

In this work, we studied the molecular interactions between Poly (ADP-ribose) polymerase and olaparib using molecular modeling methods. Our study revealed that olaparib interacts directly with the amino acids of PARP-1 and forms 3 types of interactions: hydrophobic interaction, hydrogen bonding interaction, and halogen hydrogen bonding interaction.

**Key word :** Totipotent cells, CAF-1,PARP-1,Olaparib

## المخلص:

يمكن للخلايا الجذعية كاملة التكوين الجنينية أن تنتج نسيجًا جنينيًا وملحقات الجنين كما يمكنها ان تنتج كائنات حية كاملة.

مقالة حديثة ذكرت أن نقص مستوى ناقل الهيستونات المسمى عامل تجميع الكروماتين يزيد بشكل كبير من نسبة الخلايا الشبيهة بالخلايا الجذعية في مزارع الخلايا الجذعية الجنينية. عامل تجميع الكروماتين 1 هو "بروتين ناقل للهيستونات" يشارك في عمليات تكرار الحمض النووي وإصلاحه عن طريق إعادة التركيب المتماثل.

وجود عيوب في الجينات المشاركة في إصلاح تلف الحمض النووي بواسطة التركيب المتماثل مهد الطريق لاستخدام مثبتات بولي ادب ريبوز بوليميريز

مثبتات بولي ادب ريبوز بوليميريز هي جزيئات قيد التطوير حاليًا في علم الأورام.

في هذا العمل ، درسنا التفاعلات الجزيئية بين بولي ادب ريبوز بوليميريز وأولاباريب باستخدام طرق النمذجة الجزيئية. وجدت دراستنا أن أولاباريب يتفاعل مباشرة مع الأحماض الأمينية لـ PARP-1 ويشكل 3 أنواع من التفاعلات: تفاعل كاره للماء ، تفاعل رابطة الهيدروجين ، تفاعل رابطة الهالوجين الهيدروجين.

**الكلمات الرئيسية :** الخلايا الجذعية كاملة التكوين ، عامل تجميع الكروماتين 1 . بولي ادب ريبوز بوليميريز. أولاباريب