

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de Biologie

Mémoire

Présenté par

Mlle. **KHEDIM Nihel**

Mlle. **TALEB BENDIAB Meriem**

En vue de l'obtention du

Diplôme de **MASTER**

En Sciences Biologique

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

Contrôle du trafic du fer par inhibition du récepteur tfr1 de la transferrine : cas du cancer du sein

Soutenu devant le jury :

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

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

Examineur *Mme. Bouanane Samira* *Pr Université de Tlemcen*

Année universitaire 2021/2022

Abstract

Transferrin receptor 1 (TfR1) is a cell membrane-associated glycoprotein involved in cellular iron uptake and regulation. Recent studies have shown the high expression levels of TfR on cancer cells compared to normal cells. The high expression levels of this receptor in malignancies, which is the accessible extracellular protein, may be an intriguing target for cancer therapy.

This study was designed to inhibit Tfr1 in breast cancer using docking and molecular dynamics methods by peptides with recognized therapeutic effect.

In order to estimate the inhibitory potential of these peptides, molecular docking studies were performed using the Cluspro server. A total of 13 peptides were docked with the Tfr1 protein. Three peptides: AP00029, AP01007, AP01011 showed the best affinities towards this protein showing a high inhibition potential.

In order to evaluate the stability and dynamic behavior of the protein in complex with the best docking result, molecular dynamics simulations were performed on the peptide AP00029 which showed the highest affinity. Our results indicate a good stability of the TFR1-AP00029 complex with an RMSD around 0.4 nm.

The ap00029 peptide could be a good candidate to inhibit tfr1, further in vitro and in vivo studies could confirm these results.

RESUME

Le récepteur de la transferrine 1 (TfR1) est une glycoprotéine associée à la membrane cellulaire, impliquée dans l'absorption cellulaire du fer et la régulation de la croissance cellulaire. Des études récentes ont montré des niveaux d'expression élevés de TfR1 sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. Les niveaux d'expression élevés de ce récepteur dans les cellules malignes, constitue une cible intéressante pour le traitement du cancer.

Cette étude a pour but l'inhibition de la Tfr1 dans le cas du cancer du sein en utilisant des méthodes de docking et de dynamique moléculaire par des peptides à effet thérapeutique reconnu.

Afin d'estimer le potentiel inhibiteur de ces peptides, des études de docking moléculaire ont été réalisées en utilisant le serveur Cluspro. Un total de 13 peptides ont été dockés avec la protéine Tfr1. Trois peptides : AP00029, AP01007, AP01011 ont montré les meilleures affinités envers cette protéine faisant preuve d'un potentiel d'inhibition élevé.

Dans le but d'évaluer la stabilité et le comportement dynamique de la protéine en complexe avec le meilleur résultat obtenu par docking, on a pratiqué des simulations de dynamique moléculaire sur le peptide AP00029 qui montrait le plus d'affinité. Nos résultats indiquent une bonne stabilité du complexe TFR1-AP00029 avec un RMSD autour de 0.4 nm.

Le peptide ap00029 pourrait être un bon candidat pour inhiber la tfr1, des études ultérieures *in vitro* et *in vivo* pourraient confirmer ces résultats.

المخلص

مستقبل الترانسفيرين 1 (Tfr1) هو بروتين سكري مرتبط بغشاء الخلية يشارك في امتصاص الحديد الخلوي وتنظيم. أظهرت الدراسات الحديثة المستويات العالية من التعبير عن Tfr على الخلايا السرطانية مقارنة بالخلايا الطبيعية. قد تكون المستويات العالية من التعبير عن هذا المستقبل في الأورام الخبيثة ، وهو البروتين الذي يمكن الوصول إليه خارج الخلية ، هدفًا مثيّرًا للاهتمام لعلاج السرطان.

صممت هذه الدراسة لتثبيط Tfr1 في حالة سرطان الثدي باستخدام طرق الالتحام والديناميكيات الجزيئية بواسطة البيبتيدات ذات التأثير العلاجي المعترف به.

من أجل تقدير الإمكانيات المثبطة لهذه البيبتيدات ، أجريت دراسات الالتحام الجزيئي باستخدام خادم Cluspro. تم إلتحام إجمالي 13 ببتيداً ببروتين Tfr1. أظهرت ثلاثة بيبتيدات: AP00029 ، AP01007 ، AP01011 أفضل الصلات تجاه هذا البروتين تظهر قدرة تثبيط عالية.

من أجل تقييم الاستقرار والسلوك الديناميكي للبروتين في المعقد مع أفضل نتيجة تم الحصول عليها عن طريق الالتحام ، أجرينا محاكاة الديناميكيات الجزيئية على البيبتيد AP00029 الذي أظهر أكبر قدر من التقارب. تشير نتائجنا إلى استقرار جيد لمركب TFR1-AP00029 مع RMSD حوالي 0.4 نانومتر.

يمكن أن يكون البيبتيد ap00029 مرشحًا جيدًا لتثبيط tfr1 ، ويمكن أن تؤكد الدراسات الأخرى في المختبر وفي الجسم الحي هذه النتائج.

INTRODUCTION

La protéine 1 du récepteur de la transferrine (TfR1) est le principal récepteur responsable de la régulation de l'absorption cellulaire du fer par la transferrine.

La protéine TfR1 est exprimée dans toutes les cellules nucléées du corps, mais à différents niveaux. De plus, elle est souvent fortement exprimée dans les cellules en prolifération et dans les cancers du pancréas, du côlon, du poumon, du sein, de la vessie et de l'estomac, ainsi que dans les lymphocytes. Cela reflète le besoin en fer en tant que cofacteur pour les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN, conduisant à une prolifération et une division cellulaire rapide. De ce fait, la TfR1 est le récepteur le plus étudié pour l'administration ciblée de médicaments et est une cible attrayante pour développer des stratégies anticancéreuses qui peuvent être utilisées en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques (1).

Le cancer du sein est principalement un adénocarcinome, principalement un carcinome intra canalaire et parfois un carcinome lobulaire. Son développement est d'abord in situ, puis invasif, puis métastatique. Dans 90% des cas, le cancer du sein est détecté lors d'un dépistage organisé (ou individuel), et dans 10% des cas, les signes avant-coureurs suivants sont détectés à l'examen clinique : masse palpable, écoulement séreux mamelonnaire, maladie de Paget du mamelon (2).

Le cancer du sein se développe principalement à partir des cellules épithéliales mammaires ou des cellules souches mammaires. Comme tout autre cancer, le cancer du sein est un processus en plusieurs étapes causé par l'accumulation de mutations génétiques dans les cellules (3).

La protéine TfR1 est fortement exprimée dans les cellules proliférantes et le cancer du sein.

TfR1 est impliqué dans l'absorption de Fe-Tf dans toutes les cellules animales (Schneider et al., 1982). Initialement, Fe³⁺ se lie à la transferrine (Tf) pour former le complexe Fe³⁺-Tf, qui se lie au récepteur de la transferrine TfR1. L'ensemble est intériorisé par endocytose.

Dans les endosomes, l'acidification par la pompe à protons ATPase entraîne un changement conformationnel de la transferrine et la libération de Fe³⁺ de Tf, apo-Tf (Tf sans fer) encore liée à TfR1 (4).

Le Fe³⁺ endosomal est réduit en Fe²⁺ par la ferroréductase STEAP3 (six transmembrane epithelial antigen 3 of the prostate) et transporté dans le cytoplasme par le DMT1 (divalent metal transporter 1) (5).

Le complexe apoTf-TfR1 est recyclé vers la membrane. Une fois que Fe²⁺ est entré dans le cytoplasme, il se combine avec des ligands de fer pour former un pool de fer cytoplasmique instable (6).

Ce fer peut être stocké sous forme de ferritine, transféré dans les mitochondries et même exporté des cellules via la ferroportine 1. LCN2 : lipocaline 2 ; IL-6 : interleukine 6 ; FPN : ferroportine (7).

La dérégulation de l'homéostasie du fer dans les cellules cancéreuses a été largement rapportée. Le fer peut agir comme un initiateur de la tumorigenèse en induisant un stress oxydatif, qui augmente le taux de dommages à l'ADN et aux protéines en augmentant la production de

radicaux hydroxyles et de peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton). Il agit également comme un facteur de croissance, permettant aux cellules cancéreuses de maintenir leur indice de prolifération élevé. Ainsi, les cellules cancéreuses présentent un avantage prolifératif en s'adaptant au métabolisme du fer, y compris les modifications de l'absorption, de l'efflux et du stockage du fer (8).

Dès les années 1980, divers travaux soulignaient l'importance du fer pour la prolifération des cellules cancéreuses. D'une part, l'expression de la ribonucléotide réductase, une ADN synthase, qui nécessite un apport constant de fer pour son activité, est augmentée dans le cancer. D'autre part, les anticorps anti-TfR1 étaient capables d'inhiber la prolifération cellulaire *in vitro* (9, 10).

Dans le cancer du sein, la surexpression de TfR1 a été décrite comme un marqueur de mauvais pronostic et prédit une réponse indésirable au tamoxifène (11).

De plus, la surexpression de TfR1 induite dans les cellules tumorales leur a conféré un avantage prolifératif, tandis que sa régression a réduit la prolifération cellulaire et l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (12).

La ferritine est également détruite dans les cellules cancéreuses. Dans le cancer du sein, des niveaux élevés de chaîne lourde de ferritine sont associés à une atteinte des ganglions lymphatiques et à un potentiel métastatique accru.

La susceptibilité familiale qui touche 5 à 10 % des cas de cancer du sein est le plus souvent associée à des mutations inactivatrices des gènes codant pour les protéines de réparation de l'ADN (BRCA1 et BRCA2). Les mutations germinales des gènes PALB2, TP53, CDH1, STK11 ou PTEN sont également sensibles.

La Tf humaine est une glycoprotéine de 80kDa divisée en 2 lobules N et C de 40kDa chacun, selon leur localisation dans le Nter ou le Cter de la protéine.

Ces lobes sont séparés par une courte séquence de liaison, chacune pouvant lier un atome de fer, Fe³⁺.

La Tf sans fer est appelée ferritine porteuse (apo-Tf). Lorsque la Tf capture un atome de fer, elle est appelée Tf monoferroïque, mais lorsqu'elle est couplée à 2 atomes de fer, elle est appelée holo-transferrine (holo-Tf) ou Tf différentielle.

Une étude de la structure du complexe Tfr1-Tf a révélé une modification de la conformation de la transferrine lorsqu'elle se lie à Tfr1. Le lobe N-terminal est situé entre la membrane et le domaine extracellulaire de Tfr1, et le lobe C-terminal se connecte au domaine hélicoïdal. En revanche, à pH acide, le site de liaison du fer s'ouvre, facilitant sa libération (7).

TfR1 est une protéine transmembranaire homodimérique constituée de deux sous-unités glycosylées identiques de même masse, d'environ 95 kDa, chaque sous-unité est liée par deux liaisons disulfure liées pour former des dimères. Chacune de ses sous-unités polypeptidiques contient 760 acides aminés et consiste en un court domaine cytoplasmique N-terminal (résidus 1-67). Un domaine transmembranaire hydrophobe (résidus 68 à 88) et un grand domaine extracellulaire C-terminal globulaire (résidus 89 à 760). La cristallographie du domaine

extracellulaire, qui contient le site de liaison de la transferrine, montre qu'il a une forme de papillon capable de se lier à la transferrine.

Le fragment non modélisé de TfR1 comprend un court domaine cytoplasmique N-terminal (résidus 1-6). Contient le motif d'internalisation 20YTRF23 qui fait partie de la première variante naturelle (p.Tyr20His) causée par une mutation faux-sens dans TFRC codant pour TfR1. Cette mutation altère l'endocytose des récepteurs, entraînant une forme génétiquement non diagnostiquée d'immunodéficiência combinée. Cette découverte suggère un nouveau rôle pour TfR1 dans l'immunité. De plus, le domaine cytoplasmique comprend des modifications post-traductionnelles, telles que l'acylation de Cys62 et la phosphorylation de Ser24, qui aident à réguler l'endocytose.

La deuxième partie du fragment non modélisé de TfR1 est le domaine transmembranaire (résidus 68-88), qui ancre TfR1 à la membrane et dirige l'insertion du polypeptide signal dans la membrane.

La dernière partie est le pédoncule d'environ 30Ao (résidus 89-120), qui suit immédiatement le canal transmembranaire et relie l'ectodomaine au domaine cytoplasmique, fournissant ainsi un espace suffisamment grand pour que les molécules de Tf se fixent. Le pédoncule contient deux liaisons disulfure intermoléculaires, l'une formée par Cys89 et l'autre par Cys98 (1).

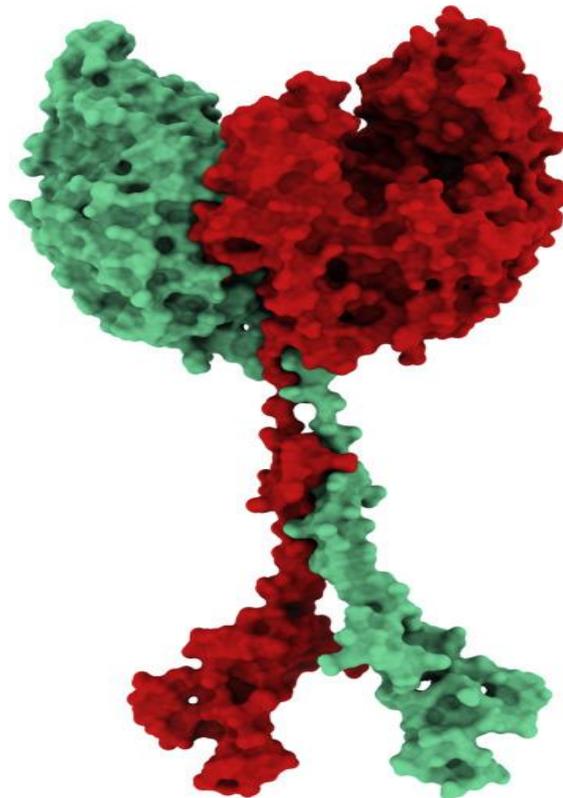


Figure 1 : Structure modélisée du complexe TfR1 selon Maha Ateeq AL-RefaeiRania Marwan MakkiHani Mohammed Ali, 2020.

En raison de sa surexpression à la surface des cellules tumorales et de son internalisation efficace dans les vésicules endosomales, TfR1 apparaît comme une cible attractive en oncologie. TfR1 peut en effet être bloqué avec des anticorps antagonistes qui imitent le ligand naturel de TfR, qui inhibe l'entrée du fer dans les cellules et conduit à la mort cellulaire.

Dès les années 1990, l'IgA 42/6 murine a montré une activité antiproliférative *in vitro* contre les lignées cellulaires leucémiques. Un essai de phase I chez 27 patients atteints de divers cancers qui n'ont répondu à aucun traitement a rapporté peu d'effets secondaires mais n'a observé qu'une efficacité antitumorale partielle. Cet échec a été attribué à l'élimination trop rapide des IgA circulantes et au développement d'une réponse immunitaire contre celles-ci.

Récemment, des anti-TfR humanisés ont montré des effets antitumoraux dans le carcinome épidermoïde oral *in vitro* et *in vivo*. En France, Inatherys est actuellement au stade préclinique, dans le cadre de la thérapie anticancéreuse, en développant la molécule d'anticorps humanisé anti-TfR1 INA01 (numéro de brevet WO2017013230). Un anti-TfR1 à chaîne unique a également été développé. Les anticorps 3TF12 et 3GH7 inhibent la prolifération de l'érythroleucémie et du lymphome de Burkitt jusqu'à 75 %. En revanche, ces anti-TfR n'ont montré aucune activité antitumorale contre les lignées tumorales mammaires.

D'autres thérapies utilisent également des peptides comme moyen d'inhibition des récepteurs protéiques. Certains peptides appelé « Lytic peptide » capables de se fixer à TfR1 sont de plus en plus étudiés, ils sont capables de provoquer la lyse cellulaire de cellules cancéreuses sans provoquer de dommages aux cellules saines (13).

L'étude *in silico* est un néologisme d'inspiration latine désignant une recherche ou un essai effectué au moyen de calculs complexes informatisés ou de modèles informatiques. Elle est associée à la bio-informatique qui englobe la collecte, l'organisation et l'analyse de données biologiques au moyen d'outils informatique (https://fr.wikipedia.org/wiki/In_silico). C'est un domaine qui prend de plus en plus d'importance avec le développement des analyses a grande échelle (14).

Dans ce travail, nous allons évaluer les capacités inhibitrices de certains peptides riches en acides aminés « LYS » à activités biologiques connues sur le récepteur TfR1 en utilisant des techniques *in silico*.

L'étude *in silico* que nous présentons consiste à utiliser principalement le docking moléculaire et la dynamique moléculaire pour évaluer la capacité de ces peptides à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein en ciblant le récepteur TfR1 .

Matériel et méthodes :

1. Préparation de la protéine

La structure cristalline tridimensionnelle de la protéine 3S9L a été téléchargée depuis la base de données de protéines " Protein Data Bank PDB (RCSB)" site <https://www.rcsb.org/> avec une bonne résolution de 3,22 Å°.

Cette structure 3D possède 4 chaînes A, B, C, D et doit donc être préparée avant de commencer le processus d'amarrage moléculaire. Cela a été fait en utilisant le programme Chimera UCSF (version 1.14) (15), qui permet la suppression des chaînes C, D et des molécules CA, CO3, FE, NAG ainsi que les molécules d'eau. Enfin, la structure 3D 3S9L préparée est enregistrée au format PDB.

2. Sélection des peptides « inhibiteurs »

Les structures tridimensionnelles des peptides riches en Lysine ont été extraites de la base de données AMP au format PDB <https://aps.unmc.edu/>.

Une bibliothèque moléculaire a été alors constituée. Elle contient des peptides riches en Lys possédant une structure cristallographique ou RMN connue.

3. L'amarrage moléculaire

Pour l'amarrage moléculaire, la protéine 3S9L a été préparée à l'aide de l'outil de préparation DockPrep du programme Chimera UCSF (15). L'outil permet d'ajouter des atomes d'hydrogène, des charges et d'appliquer une énergie minimale ΔG .

Parmi les 128 peptides riches en lysine sélectionnés, 13 seulement possèdent une structure tridimensionnelle connue. Ils ont été ajoutés séquentiellement pour la préparation de l'amarrage moléculaire (c'est-à-dire que le degré d'affinité de liaison des différents peptides à la protéine principale a été déterminé).

Pour tester l'effet inhibiteur de ces peptides sur la protéine 3S9L, l'interaction de liaison réelle a été testée par l'amarrage moléculaire à l'aide du serveur ClusPro <https://cluspro.bu.edu/login.php> (16).

Les chaînes du complexe peptide-protéine ont été renommées selon l'ordre A, B, C à l'aide du serveur www.canoz.com/sdh/renamepdbchaine.pl.

4. Identification des interactions

Des analyses avec l'outil LIGPLOT (15) ont été réalisées pour comprendre le mode d'interaction des peptides amarrés et les chaînes de la protéine TFR1. Ligplot est un outil essentiel pour comprendre les interactions hydrophobes ainsi que le schéma des liaisons hydrogène.

5. Simulation de la dynamique moléculaire

Au moyen du logiciel GROMACS (Ver 5.1), que l'on a mis en place sur un système Linux, et en recourant également au champ de force CHARMM36, il a été procédé à des simulations de dynamique moléculaire (17, 18). Il est à noter que tout d'abord, la structure topologique de la protéine est préparée en employant l'outil pdb2gmx. La solvatisation pour les complexes protéiques a été réalisée en milieu dodécaèdre.

L'énergie du système a été réduite grâce à l'algorithme nommé : Steepest descent algorithm (19). On a soumis la protéine à une solvatisation au moyen du modèle de solvant TIP3, et on a ajouté un ion Na^+ au système de façon à neutraliser tout le système. Le système présente un écart minimum de 1 Å entre chaque bord et chaque atome protéique.

On a employé des températures correspondant à 300 K ainsi qu'une pression totale de 1 bar afin que le système se stabilise. Une dynamique moléculaire finale de 10 ns est appliquée au système, avec des étapes de 2 fs.

6. L'analyse de trajectoire et L'analyse énergétique de l'interaction protéine-peptide

On a employé successivement les outils gmx rms et gmx rmsf afin de mesurer la déviation quadratique moyenne (RMSD), les fluctuations de la moyenne quadratique (RMSF) de la protéine et le rayon de giration (gyrate).

Résultats et discussion :

La structure tridimensionnelle cristallisée du récepteur de la cellule cancéreuse du cancer du sein TfR1 (PDB ID : 3S9L) a été mis à disposition dans le site Web de la banque de données sur les protéines « RCSB PDB (Protein Data Bank) » <https://www.rcsb.org/>.

Des détails sur les treize peptides étudiés sont listés dans le **Tableau 01**. Le Docking de ces peptides a été réalisé contre le site actif de la protéine 3s9l, ce qui a permis de dégager plusieurs configurations retenues comme définissant des modes de liaison avantageux et favorables énergétiquement parlant.

Tableau 01 : Propriétés des peptides riches en Lysine extraits de la base AMP

Code et Nom	RMN /X-Ray	Nombre de Lysine	Nombre d'acide aminé	Structure primaire
1-AP00029 / Cecropin A(1-8)-Magainin 2(4-12) hybrid peptide (CE-MA) (Lys-rich; CAMEL; synthetic, UCLL; BBL)	RMN	7	17	KWKLFKKIKFLHS AKKF
3-AP00366 / BMAP-27 (Lys-rich; BMAP27, bovine myeloid antimicrobial peptide 27; bovine cathelicidin, cattle, ruminant, mammals, animals; ZZHs; ZZP; UCLL1; Derivatives: bomidin; BMAP-18 and BMAP-15)	RMN	7	27	GRFKRFRKKFKKLF KKLSPVIPLLHLX
8-AP00429 / Porcine NK-Lysin (saposin-like protein, SAPLIP, pigs, mammals; animals; BBMm, BBL, ZZP; 3S=S; UCSS1a;	RMN	10	50 28	GYFCESCRKIIQKL EDMVGQPQPNEDTV TQAASQVCDKILKIL RGLCKKIMR SFLRRISWDILTGK KPQAICVDIKICKE

Derivatives: NK-2; NK-18)				
11-AP00496 / HP 2-20 (Lys-rich; synthetic)	RMN	6	20	AKKVFKRLEKLFS KIQNDKX
22-AP01007 / CM15 (a hybrid peptide of Cecropin1-8 + Melittin3-9; Lys-rich; Synthetic; Other derivatives: CAMEL, CP-29)	RMN	5	15	KWKLFKKIGAVLK VL
23-AP01010 / Latarcin 1 (Ltc1, Ltc 1, Lys-rich; BBMm; spiders, arachnids, Chelicerata, arthropods, invertebrates, animals; UCLL1a)	RMN	8	26	SMWSGMWRRKLLK KLRNALKKKLLKGE K
24-AP01011 / Latarcin 2a (Ltc2a, Ltc 2a, Lys-rich; BBMm; spiders, arachnids, Chelicerata, arthropods, invertebrates, animals; UCLL1a)	RMN	7	26	GLFGKLIKFKGRKA ISYAVKKARGKH
28-AP01158 / RP-1 (Lys-rich; synthetic)	RMN	7	18	ALYKKFKKKLLKS LKRLG
29-AP01161 / Human granulysin (GNLY, huGran, NKG5; formerly 519; a saposin-like protein, SAPLIP; 3S=S; UCSS1a; primates, mammals, animals; ZZP; VIHNN; BBMm; BBL; JJsn; Derivatives: G13)	X-Ray	4	50 24	GRDYRTCLTIVQKL KKMVDKPTQRSVS NAATRVCRTGRSR WRDVCRNFM RYQSRVIQGLVAG ETAQQICEDLR
39-AP01958 / Lasioepsin (Lys-rich; insects, arthropods, invertebrates, animals; 2S=S)	RMN	8	27	GLPRKILCAIAKKK GKCKGPLKLVCCK
46-AP02146 / ALFpm3 (ALF-Pm3; P. monodon anti-lipopolysaccharide factor 3; UCSS1a; Crustaceans, arthropods,	RMN	10	50 50	EAYVQGWAEVAA AVASKIVGLWRNE KTELLGHECKFTV KPYLKRQVYYK

invertebrates, animals; 1S=S; BBS; Domain: ALFPm3-LBD)			2	GRMWCPGWTAIRG EASTRSQSGVAGK TAKDFVRKAFQKG LISQQEANQWL SS
58-AP02257 / Lysozyme (lectin-binding enzyme, antimicrobial protein; human, primates, mammals, animals; BBS; JJsn; UCSS1a)	X-ray	5	50 50 30	KVFERCELARTLKR LGMDGYRGISLAN WMCLAKWESGYN TRATNYNAGDR STDYGIFQINSRYW CNDGKTPGAVNAC HLSCSALLQDNIAD AVACAKRVV RDPQGIRAWVAWR NRCQNRDVRQYVQ GCGV

Les peptides et la protéine ont été dockés par ClusPro et **Le tableau 2** représente les résultats des trois peptides les plus intéressants : AP00029, AP01007, AP 01011. Les résultats de ces peptides présentant le plus d'affinité pour le site actif de la protéine 3s9l ont été retenus.

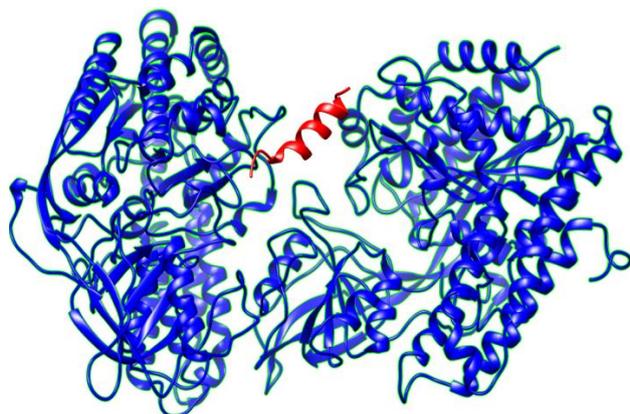


Figure 2 : Interaction du ap00029 avec le site actif de la protéine 3s9l

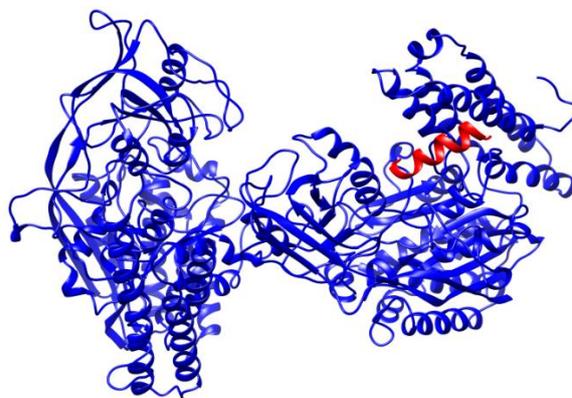


Figure 3 : Interaction du ap01007 avec le site actif de la protéine 3s9l

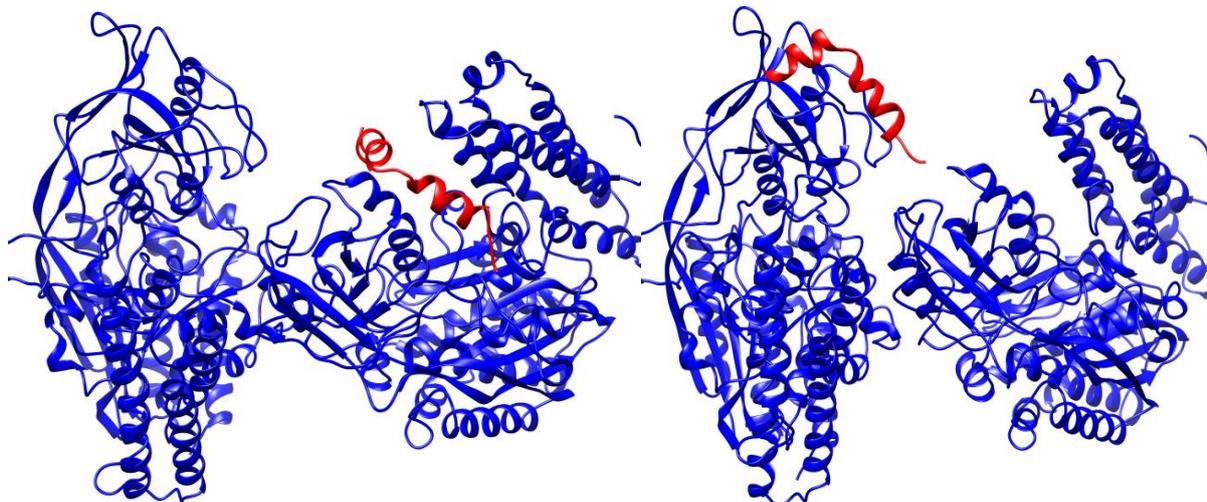


Figure 4 : Interaction du ap01011 en cluster 9 avec le site actif de la protéine 3s9l

Figure 5 : Interaction du ap01011 en pose 7 avec le site actif de la protéine 3s9l

Tableau 2 : Energies de liaison de trois peptides AP00029, AP01007, AP01011 amarrés à la protéine du cancer du sein 3s9l.

	Cluster	weighted score
Ap01007	9	-708.9
Ap01011	9	-790.7
	7	-803,1
Ap00029	5	-890,3

Plus l'énergie de liaison est réduite, plus l'efficacité de la liaison est élevée, résultant en une inhibition accrue. On a choisi de classer les peptides selon le nombre de cluster (critère CLUSPRO). Dans la présente étude ce qui a donné un score respectif de chaque peptide, le AP00029 a présenté le meilleur score de liaison -8.9 kcal/mol avec un cluster 5, Le AP01007 a présenté un score de liaison -7.08 kcal/mol avec un cluster 9, et pour le AP01011 avec un cluster 7 un score de liaison -8.03 Kcal/mol et en cluster 9 un score de liaison -7.90 Kcal/mol.

Les techniques de docking sont habituellement peu précises et ne peuvent être mises en œuvre que rapidement. Ils ne tiennent cependant pas compte de la flexibilité des protéines, ce qui peut affecter la précision des complexes peptide-protéine résultant. Des techniques de simulation de dynamique moléculaire plus précises pourraient donc s'avérer un meilleur complément au docking. Il s'agit d'une technique informatique (in-silico) prouvée et efficace permettant de recueillir des données dynamiques avec une résolution spatiale atomique. Elle est habituellement employée afin de déterminer le mouvement des macromolécules, en se fondant sur la mécanique traditionnelle et les équations newtoniennes du mouvement qui permettent de mesurer la position et la vitesse de tous les atomes du système étudié. Par conséquent, la

dynamique moléculaire effectue un contrôle situationnel et conformationnel d'une manière plus approfondie qu'un docking, décrivant ainsi avec plus de précision le mouvement des protéines. Au regard des éléments exposés ci-dessus (liaisons), Les complexes peptide-protein amarrés avec le principal composé qui présentaient une haute affinité et une faible énergie de liaison : AP00029, a été sujet à des simulations de dynamique moléculaire durant 10 ns en vue d'analyser la stabilité des complexes.

On a utilisé par la suite les graphiques RMSD, RMSF et Rayon de Gyration dans le but de connaître la stabilité du complexe, la flexibilité structurale et le degré de fluctuation.

RMSD (Root-Mean-Square Deviation) :

L'écart quadratique moyen des positions atomiques, ou simplement l'écart quadratique moyen, est une mesure de la distance moyenne entre les atomes de protéines qui se chevauchent.

(https://en.wikipedia.org/wiki/Root-mean_square_deviation_of_atomic_positions)

En bio-informatique, RMSD est utilisé pour comparer des superpositions de structures protéiques. En fait, une fois les deux structures alignées, les scientifiques ont rapidement besoin de savoir à quel point l'alignement est "bon". Cependant, une mesure simple consiste à calculer la RMSD en prenant comme valeur la position de l'atome dans l'espace.

Les tracés RMSD sont souvent utilisés pour comprendre la stabilité du complexe, sachant que plus le RMSD est faible, plus la stabilité de la protéine est grande (20).

RMSF (Root-Mean-Square fluctuation) :

Il s'agit d'une mesure numérique similaire à la RMSD, mais au lieu d'indiquer les différences de position dans le temps entre des structures entières, elle calcule la flexibilité de résidus individuels ou la quantité de déplacement (fluctuation) d'un résidu particulier au cours d'une simulation. Le RMSF pour chaque résidu est généralement tracé en fonction du nombre de résidus et peut indiquer structurellement quels acides aminés d'une protéine contribuent le plus au mouvement moléculaire (21).

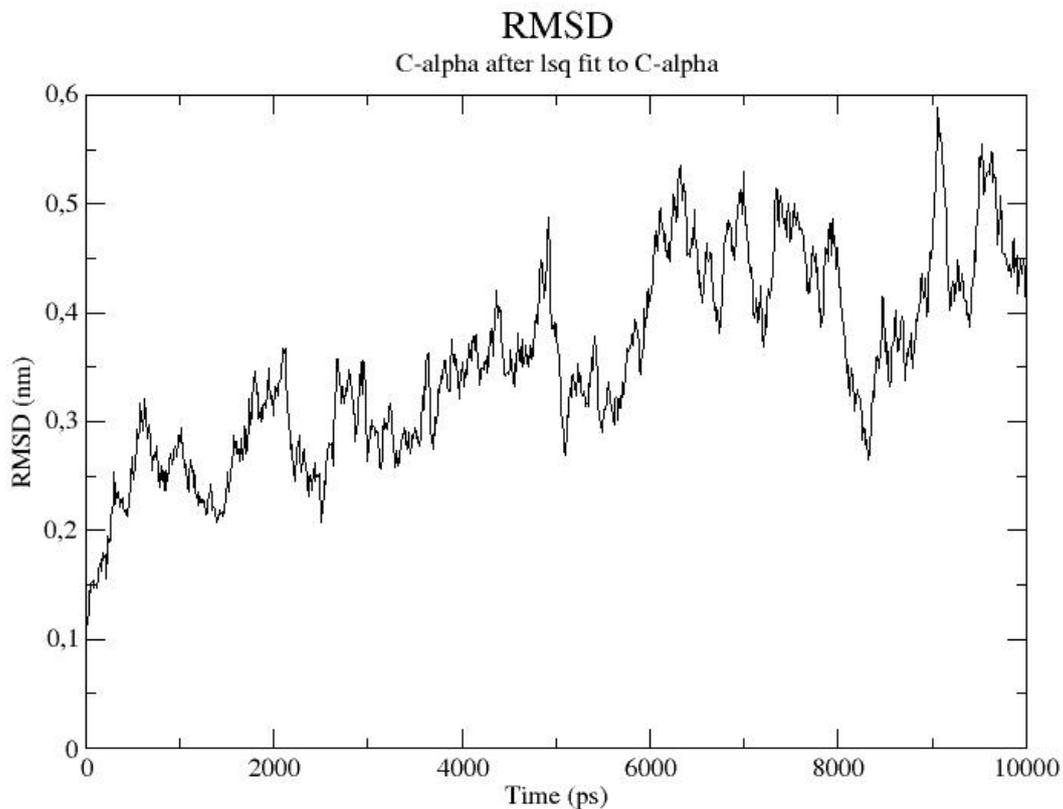
Les graphiques RMSF sont utilisés pour comprendre la flexibilité et la stabilité de la structure. Cela correspond à une flexibilité accrue et à une liaison instable lorsque la trajectoire fluctue fortement. À l'inverse, si la valeur est faible ou si de légères fluctuations sont observées, cela indique qu'il existe des régions structurellement correctes dans le complexe et donc moins de déformation (22).

Gyration Radius :

La distance à l'axe à laquelle la masse de l'objet peut être supposée concentrée et où le moment d'inertie sera égal au moment d'inertie de la masse réelle autour de cet axe, égal à la racine carrée du quotient de la le moment d'inertie et la masse.

Lorsque la valeur Rg est grande et présente un degré de fluctuation important, cela indique une diminution de la compacité de la conformation entropique. A l'inverse, des valeurs de Rg faibles, avec des fluctuations faibles et régulières tout au long de la simulation, correspondent

à un degré de compacité élevé, c'est-à-dire à un nombre de couches plus élevé, indiquant une stabilité et une rigidité importantes de la structure (23).



Figures 6 : Graphiques RMSD pour le complexe 3s9l avec la AP00029 pendant 10 ns.

Lors de la simulation de 10 ns, La 3s9l en complexe avec la AP00029 a montré une RMSD plus stable autour de 0.45 nm. Entre 6000 ps et 8000 ps le peptide a subi une légère augmentation de la valeur RMSD jusqu'à 0,5 nm. L'existence de ces différences de squelette RMSD dans la AP00029 indique que la 3s9l ne subit pas des changements de conformation. Ainsi, le complexe protein- AP00029 semble stable sur la durée de la simulation.

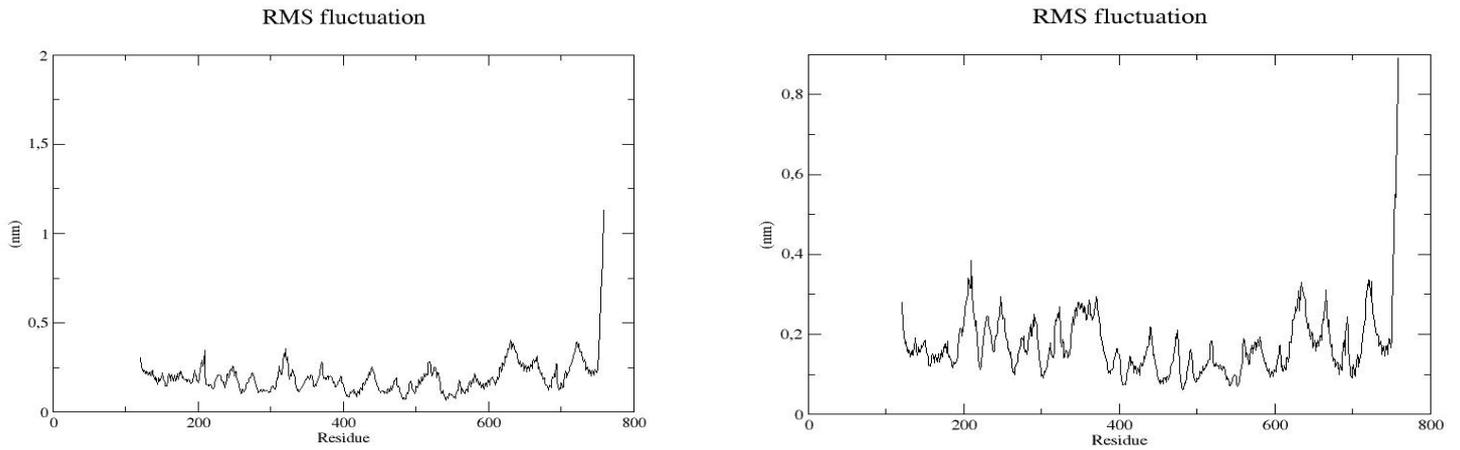


Figure 7 : Graphiques RMSF pour le complexe 3s9l avec la AP00029 Chaîne A et B pendant 10 ns.

La valeur RMSF du complexe de la 3s9l avec la AP00029 concernant la chaîne A et B est demeurée en tour de 0,2 nm tout au long de la simulation, cela confirme la Stabilité de la molécule.

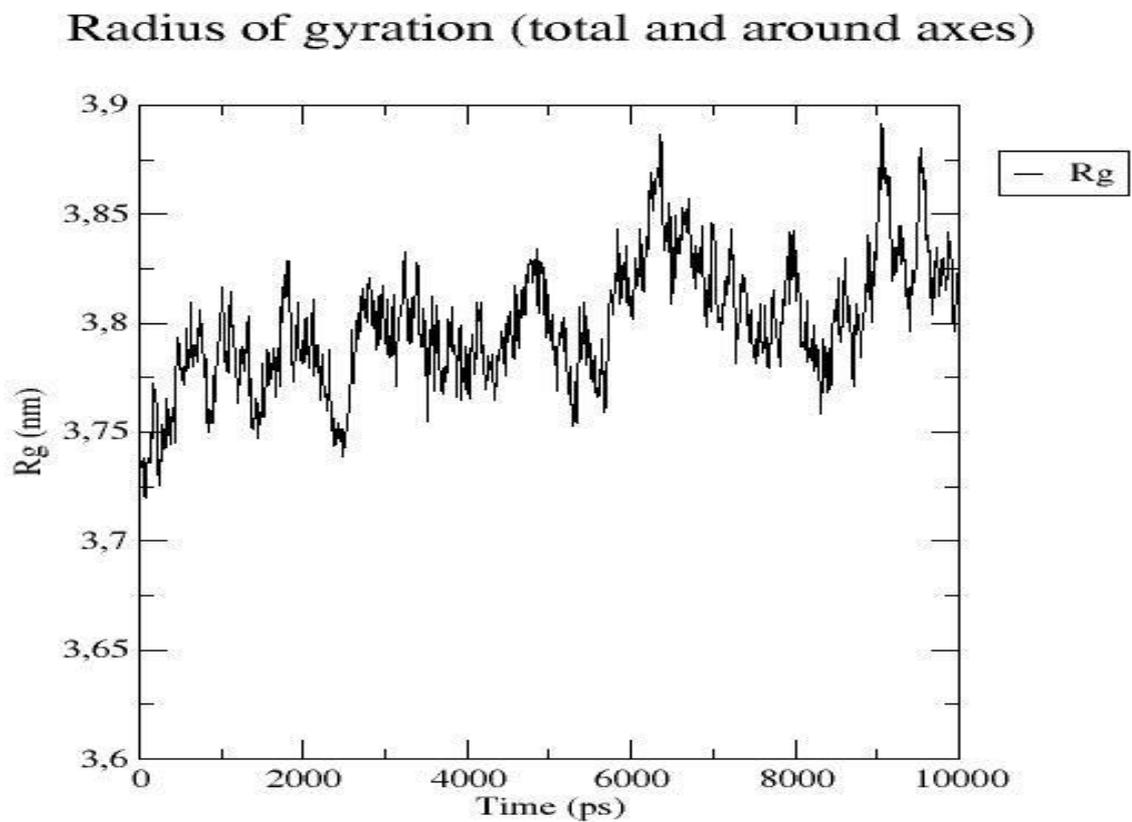


Figure 8 : Graphiques Rg pour le complexe de la 3s9l avec la AP00029 pendant 10 ns.

Pour le complexe de la 3s91 avec le peptide AP00029, les valeurs de simulation Rg varient entre 3.72 et 3.88 nm. Cette légère variation du Rg démontre la stabilité de la protéine dans le complexe.

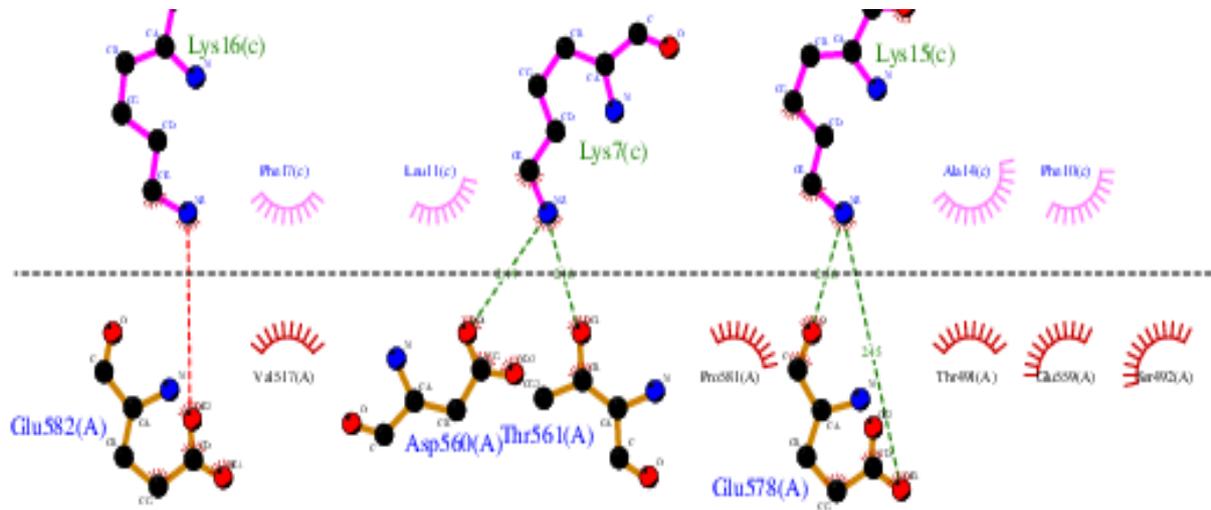


Figure 9 : Interaction 2D de la chaîne A du peptide AP00029 avec le récepteur 3s91 du cancer de sein.

Le peptide AP00029 contient trois Lys, deux parmi eux Lys 7,15 qui présentent quatre liaisons d’hydrogène avec les acides aminés de la chaîne A de la protéine 3s91 Asp 560, Thr 561, Glu 578.

En plus des liaisons hydrophobes entre les acides aminés du peptide AP00029 Phe 17, Leu 11, Ala 14, Phe 10 et les acides aminés de la chaîne A de la protéine 3s91 Val 517, Pro 581, Thr 491, Glu 559, Ser 492.

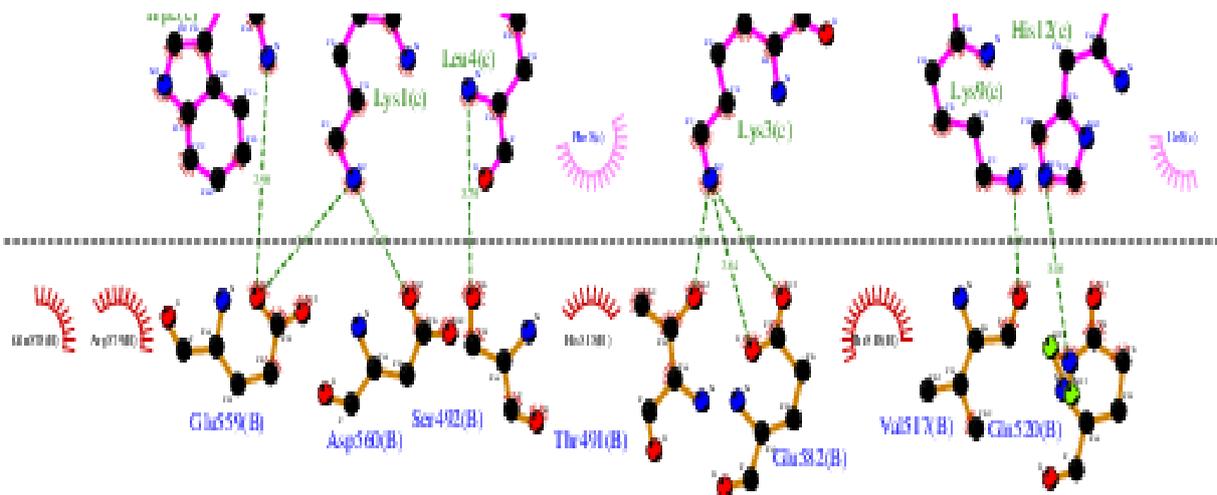


Figure 10 : Interaction 2D de la chaîne B du peptide AP00029 avec le récepteur 3s91 du cancer de sein.

En plus des liaisons Hydrophobes entre les acides aminés du peptide AP01011 en position 7 Arg 23, Gly 24, His 26 et les acides aminés de la chaîne A de la protéine 3s9l Thr 248, Val 366.

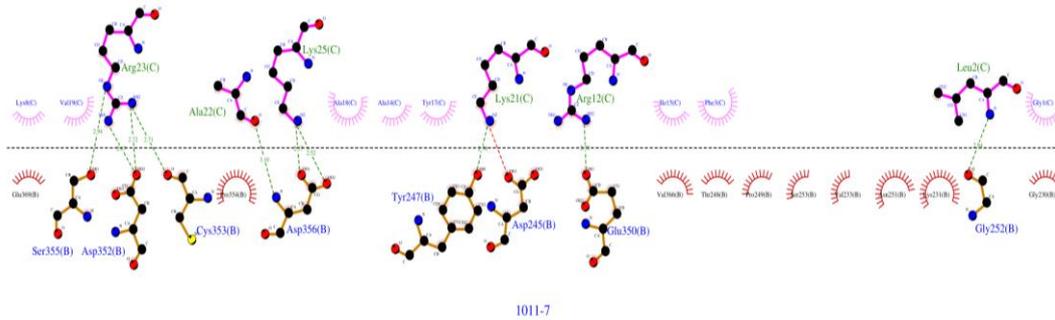


Figure 13 : Interaction 2D de la chaîne B du peptide AP01011 en position 7 avec le récepteur 3s9l du cancer de sein.

Le peptide AP01011 en position 7 se lie grâce à six acides aminés Arg 23, Ala 22, Lys 25, Lys 21, Arg 12, Leu 2 qui présente dix liaisons d'hydrogène avec les acides aminés de la chaîne B de la protéine 3s9l Ser 255, Asp 352, Cys 353, Asp 356, Tyr 247, Glu 350, Gly 252.

En plus des liaisons Hydrophobes entre les acides aminés du peptide AP01011 en position 7 Lys 8, Val 19, Ala 18, Ala 14, Tyr 17, Ile 15, Phe 3, Gly 1 et les acides aminés de la chaîne B de la protéine 3s9l Glu 369, Pro 354, Val 366, Thr 248, Pro 249, Ser 253, Val 233, Asn 251, Lys 231, Gly 230.

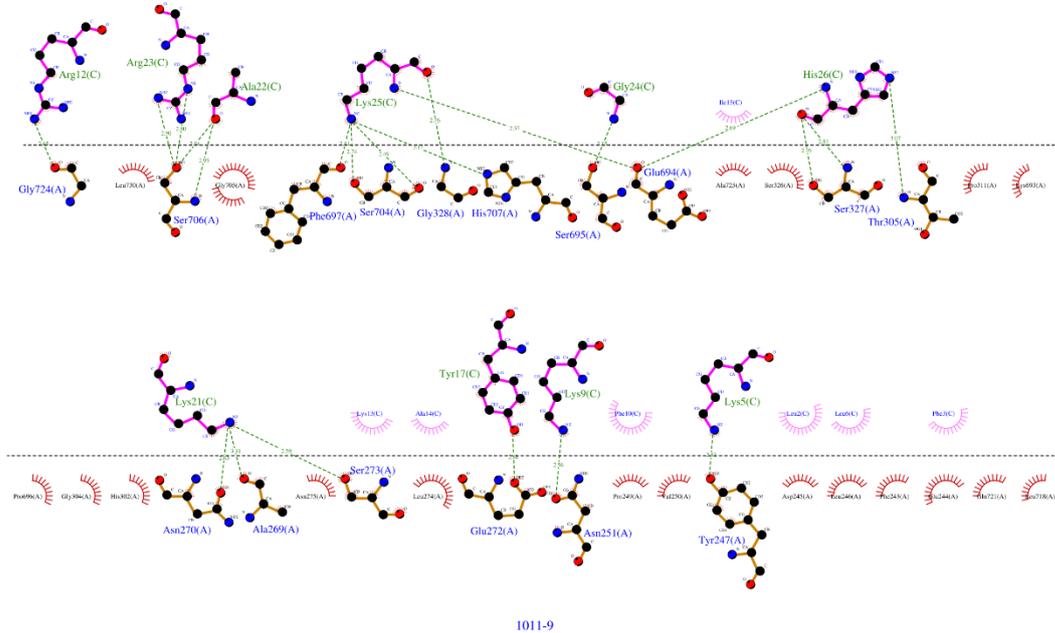


Figure 14 : Interaction 2D de la chaîne A du peptide AP01011 en position 9 avec le récepteur 3s9l du cancer de sein.

Le peptide AP01011 en position 9 se lie également grâce à six acides aminés Arg 12, Arg 23, Ala 22, Lys 25, Gly 24, His 26 qui présente seize liaisons d'hydrogène avec les acides aminés

de la chaîne A de la protéine 3s9l Gly 724, Ser 706, Phe 697, Ser 704, Gly 328, His 707, Ser 695, Glu 694, Ser 327, Thr 305 et dans une zone différente le peptide contient quatre acides aminés Lys 21, Lys 9, Lys 5, Tyr 17 qui présente six liaisons d'hydrogène avec les acides aminés de la même chaîne A Asn 270, Ala 269, Ser 273, Glu 272, Asn 251, Tyr 247.

En plus des liaisons Hydrophobes entre l'acide aminé du peptide AP01011 en position 9 Ile 15 et les acides aminés Leu 2, Leu 6, Phe 3 avec les acides aminés de la protéine Pro 696, Gly 304, His 302, Asn 275, Leu 274, Pro 249, Val 250, Asp 245, Leu 246, Phe 243, Glu 244, Gln 721, Leu 718.

Selon l'article

<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0000051#pbio-0000051-t001> (24)

les acides aminés les plus fréquemment concernés par les liaisons sont Leu 619, Trp 641, Gly 647, Arg 651. Notre étude a montré que les peptides riches en lysine étudiés sont susceptibles de contracter des liaisons avec des acides aminés différents et sur des positions différentes mais qui restent cependant proches du site de fixation initial. On peut donc dire que l'inhibition par les peptides utilisés est intéressante du point de vue positionnel et énergétique.

Conclusion

Le cancer du sein a suscité ces dernières années un intérêt croissant permettant de proposer de nouveaux traitements médicamenteux dans le cadre de la campagne de lutte contre cette maladie.

La présente étude avait pour but d'évaluer la stabilité et le comportement de la protéine Tfr1 en complexe avec des peptides à effet thérapeutique connu et les évaluer par docking moléculaire en utilisant plusieurs logiciels et serveurs pour élucider les interactions entre ces peptides et la protéine 3S9L. On a pratiqué ensuite des simulations de dynamique moléculaire sur le peptide AP00029 ayant présenté la meilleure affinité pour la protéine TFR1.

Nos résultats indiquent une bonne stabilité du complexe TFR1-AP00029 avec un RMSD autour de 0.4 nm. Selon Anthony M Giannetti et al. Les acides aminés les plus fréquents sont Leu 619, Trp 641, Gly 647, Arg 651 ce qui est en accord avec les résultats de notre étude où les acides aminés concernés par la liaison aux peptides sont dans la proximité des acides aminés précédemment cités.

On peut donc dire que l'inhibition de la tfr1 par les peptides choisis notamment le peptide ap00029 pourrait être proposés pour d'éventuelles études ultérieures *in vitro et in vivo* pourrait confirmer nos résultats.

REFERENCES

1. AL-REFAEI, Maha Ateeq, MAKKI, Rania Marwan, et ALI, Hani Mohammed. Prédiction de la structure de la protéine 1 du récepteur de la transferrine (TfR1) par modélisation d'homologie, amarrage et études de simulation de dynamique moléculaire. Hélyon , 2020, vol. 6, n° 1, p. e03221.
2. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-04/refces_k_du_sein_vf.pdf
3. PASSILDAS JAHANMOHAN, Judith. Les cancers du sein agressifs: conséquences de la ménopause chimio-induite chez les femmes jeunes atteintes d'un cancer du sein non métastatique et facteurs pronostiques de la rechute du cancer du sein triple négatif. 2019. Thèse de doctorat. Université Clermont Auvergne.(2020-2017)
4. Whitney Lewis, majeure en chimie au Saint Mary's College, promotion 2020 et Mary Green, majeure en biologie au Saint Mary's College, promotion 2018.
5. BIRSEN, Rudy, GRIGNANO, Eric, CHAPUIS, Nicolas, et al. Ferroptose et cancer- Implications physiopathologiques et thérapeutiques. médecine/sciences, 2021, vol. 37, no 8-9, p. 726-734.
6. BELOT, Audrey. Régulation du métabolisme du fer et nouvelles stratégies thérapeutiques. 2020. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
7. COULON, Séverine. Rôle des immunoglobulines A1 dans la régulation positive de l'érythropoïèse. 2009. Thèse de doctorat. Université Paris Sud-Paris XI.
8. Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 2013;13:342—55
9. Trowbridge IS, Lopez F. Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:1175—9
10. Shen Y, Li X, Dong D, Zhang B, Xue Y, Shang P. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *Am J Cancer Res* 2018;8:916—31
11. Habashy HO, Powe DG, Staka CM, Rakha EA, Ball G, Green AR, et al. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119:283—93
12. Gao J, Lovejoy D, Richardson DR. Effect of iron chelators with potent anti-proliferative activity on the expression of C. Callens molecules involved in cell cycle progression and growth. *Redox Rep* 1999;4:311—2
13. Kawamoto, Megumi, et al. "A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells." *BMC cancer* 11.1 (2011): 1-13.
14. Noria Bouras, Abdelkader Bousahba, Ahlam Megaiz, Florence de Fraipont, Tewfik Sahraoui, Fatima Zohra El Kebir. Étude in silico d'une mutation : application à la mutation fonctionnelle G12D du gène KRAS, retrouvée dans les cancers bronchiques non à petites cellules. *Annales de Biologie Clinique*. 2019;77(3):287-294. doi:10.1684/abc.2019.1441

15. Pettersen, E.F., et al., UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 2004. 25(13): p. 1605-1612.
16. KOZAKOV, Dima, HALL, David R., XIA, Bing, et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature protocols*, 2017, vol. 12, no 2, p. 255-278.
17. Kutzner, C., et al., More bang for your buck: Improved use of GPU nodes for GROMACS 2018. *Journal of computational chemistry*, 2019. 40(27): p. 2418-2431.
18. Abraham, M.J., et al., GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 2015. 1: p. 19-25.
19. Benson, N.C. and V. Daggett, A comparison of multiscale methods for the analysis of molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012. 116(29): p. 8722-8731.
20. <https://bioinfo-fr.net/comparaison-de-structures-le-rmsd#:~:text=RMSD%20signifie%20Root%2DMean%2DSquare,%C3%A9conomie%2C%20en%20psychologie%2C%20etc.>
21. <https://ctlee.github.io/BioChemCoRe-2018/rmsd-rmsf/>
22. <https://www.computabio.com/rmsd-rmsf-analysis-service.html>
23. <https://www.dictionary.com/browse/radius-of-gyration>
24. <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0000051#pbio-0000051-t001>
25. Giannetti AM, Snow PM, Zak O, Björkman PJ (2003) Mechanism for Multiple Ligand Recognition by the Human Transferrin Receptor. *PLOS Biology* 1(3): e51