

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de BIOLOGIE



MÉMOIRE

Présenté par

BENAEI MEDJAHED Fatima Zohra

SAIDANI Aicha

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

***Etude in silico* de l'interaction protéine Stathmine et monoterpènes, composants parfumés de l'huile essentielle du « *Thymus vulgaris* » dans le processus cancéreux**

Soutenu le 14/06/2023 devant le jury composé de :

Président	SAHI-DALI YUCEF Majda	Professeur	Université de TLEMCEN
Encadrant	TABET- HELAL Sana	Maître de conférences A	Université de TLEMCEN
Examineur	BERRAHOUI Samira	Maître de conférences B	Université de TLEMCEN

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Avant tout développement sur notre travail, nous tenons à remercier Allah le tout puissant pour la patience, l'aide et la ténacité qui nous a donné et avoir permis de réaliser cette thèse.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein de l'Université Tlemcen et le département biologie, nous tenons donc tout d'abord à remercier l'ensemble du personnel enseignant et administratif pour leur accueil et leur convivialité.

A Mme TABET- HELAL Sana

Qui a acceptée d'encadrer et de diriger ce travail pour l'intérêt porté à notre travail, leur disponibilité, leur conseil et surtout leur grande patience qu'elle veuille bien trouver ici mes vifs remerciements, L'expression de ma profonde reconnaissance et de ma sincère considération.

A Mme SAHI-DALI YUCEF Majda

Professeur à l'université de Tlemcen, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de jury.

A Mme BERRAHOU Samira

Maitre de conférences B à l'université de Tlemcen, qui a acceptée d'apprécier ce travail et de participer au jury de ce mémoire. En témoignage de ma reconnaissance, sincères remerciements.

*Je tiens à exprimer également toute ma reconnaissance à **Mr CHERRAK Sabri** pour m'avoir guidé durant la réalisation du travail avec une disponibilité permanente et de m'avoir fait bénéficier de ses connaissances dans le domaine de docking moléculaire.*

Dédicace

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail et avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail.

- ✓ *À mon cher père Boumediene, Qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager pour que je puisse atteindre mes Objectifs.*
- ✓ *À celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoirs, ma chère mère Halima.*
 - ✓ *A ma famille*
 - ✓ *A mes chers frères*
 - ✓ *A mes sœurs : Khadîdja, Asma, Hayat*
 - ✓ *A mon cher neveu : Ilyas, Ishak*
 - ✓ *À ma chère collègue dans ce travail : Aicha*
 - ✓ *À tous mes amis : Kanza, Donia, Fatma*

Fatima Zohra

Dédicace

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; mes parents que j'adore.

À mon âme et partenaire de ma vie, mon cher mari.

À ma plus belle histoire d'amour, Mes filles Alae Roumaissa et Rymesse et mon fils Nidhal (Allah ychafih), Je sais pourquoi j'existe.

À mes frères et mes sœurs.

À mes amis et ma collègue de travail fatima zohra.

Aicha

الملخص

من بين البروتينات التي يتم التعبير عنها بشكل مفرط أثناء السرطان، ستاثمين هو بروتين فوسفوري عصاري خلوي من 17 كيلو دالتون والذي يعزل التوبولين في مركب غير قابل للبلمرية يتكون من اثنين من التوبولين غير المتجانسة لكل جزيء ستاثمين (مركب ت2س) الذي ينظم بشكل سلبي جميع الأنابيب الدقيقة.

ترتبط هجرة الخلايا ارتباطا وثيقا بالستاثمين، مما يعطل ديناميكيات الأنابيب الدقيقة عن طريق زيادة إزالة البلمرية. يرتبط الإفراط في التعبير عن ستاثمين ارتباطا وثيقا بعدوانية الورم. لذلك فهو يشكل هدفا علاجيا مثيرا للاهتمام في مكافحة السرطان.

مونوترينيس لها وظيفة الفينول التي تشكل واحدة من العائلات البيوكيميائية الرئيسية للزيوت الأساسية للنباتات الطبية. لديهم أنشطة بيولوجية مضادة للالتهابات ومضادة للميكروبات ومضادة للفيروسات ومضادة للسرطان وهذا في العديد من أنواع السرطان.

الهدف من دراستنا هو دراسة تفاعل المكونات العطرية الأحادية الحلقية للزيت العطري لـ " الغدة الزعترية الشائعة " مع ستاثمين ومحاولة تثبيط نشاطها على تجميع التوبولين الذي من شأنه أن يمنع غزو الخلايا أثناء عملية تكاثر السرطان.

التفاعل بين ستاثمين (مستقبلات) ومونوترينيس دوري (الرابط) تم عن طريق التحفيز الجزيئي عبر برنامج الإرساء الجزيئي من أجل إعادة وضع أفضل مونوترينيس يظهر ارتباطات تفاعل مع ستاثمين.

من بين 277 أحادي التربين الدوري المستخدم، يبدو أن كارفاكول والثيمول هما الأكثر استقرارا، حيث كشف الالتحام الجزيئي عن تقارب ملزم بين هذه الروابط وستاثمين.

ومع ذلك، فإن التقارب الملزم لهذه المواد الطبيعية مع المتحور ستاثمين ك9 / 15أ / ك9 / 15ر في الجزء الطرفي ن كان أقل استقرارا.

وأخيرا، فإن تحليلات المحاكاة الجزيئية الأكثر تقدما ودراسة في الجسم الحي ضرورية لتأكيد التفاعل والتأثير المثبط المحتمل للكارفاكول والثيمول على ستاثمين.

الكلمات الرئيسية: السرطان، كارفاكول، الالتحام الجزيئي، مونوترينيس، ستاثمين، الثيمول

Résumé

Parmi les protéines surexprimées au cours du cancer, la Stathmine une phosphoprotéine cytosolique de 17 kDa qui séquestre la tubuline dans un complexe non polymérisable formé de deux hétérodimères de tubuline par molécule de Stathmine (complexe T₂S) ce qui régule négativement l'assemblage des microtubules (MTs).

La migration cellulaire est étroitement associée à la Stathmine, qui perturbe la dynamique des MTs en augmentant leur dépolymérisation. La surexpression de la Stathmine est fortement corrélée à l'agressivité tumorale. Elle constitue donc une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre le cancer.

Les monoterpènes ont une fonction phénol constituant l'une des grandes familles biochimiques des huiles essentielles des plantes médicinales. Ils présentent des activités biologiques anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales et anticancéreuses et cela dans plusieurs cancers.

Le but de notre étude, est d'étudier l'interaction des monoterpènes cycliques composants parfumés de l'huile essentielle du « *Thymus vulgaris* » avec la Stathmine et tenter d'inhiber son activité sur l'assemblage de la tubuline ce qui bloquerait l'invasion cellulaire au cours du processus prolifératif cancéreux.

L'interaction entre Stathmine (récepteur) et monoterpènes cycliques (ligands) a été faite par stimulation moléculaire via des logiciels de Docking Moléculaire afin de repositionner le meilleur monoterpène présentant des affinités d'interaction avec la Stathmine.

Parmi les 277 monoterpènes cycliques utilisés, le carvacrol et le thymol semblent être les plus stables, puisque le Docking moléculaire a révélé une affinité de liaison entre ces ligands et Stathmine.

Néanmoins, l'affinité de liaison de ces substances naturelles avec la stathmine mutée K9R/A15R/K9RA15R en partie N-terminale a été moins stable.

Enfin, des analyses de simulation moléculaire plus poussées, et une étude in vivo sont nécessaires pour confirmer l'interaction et l'effet inhibiteur potentiel du carvacrol et thymol sur la stathmine.

Mots clés: Cancer, carvacrol, Docking moléculaire, monoterpène, Stathmine, Thymol

Abstract

Among overexpressed proteins during cancer, Stathmin, a cytosolic phosphoprotein of 17 kDa, which sequesters tubulin in a non-polymerizable complex, consisting of two tubulin heterodimers per stathmin molecule (T2S complex) which negatively regulates the assembly of microtubules (MTs).

Cell migration is closely associated with Stathmin, which disrupts the dynamics of MTs by increasing their depolymerization. Stathmin overexpression is strongly correlated with tumor aggressiveness. It therefore constitutes an interesting therapeutic target against cancers.

Monoterpenes have a phenol function constituting one of the major biochemical families of essential oils in medicinal plants. They exhibit anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral and anticancer biological activities in several cancers.

The aim of our study was to study the interaction of the cyclic monoterpenes scented components of the essential oil of "Thymus vulgaris" with stathmin and try to inhibit its destabilizing MTs activity during tumoral invasion.

The interaction between stathmin (receptor) and cyclic monoterpenes (ligands) has been investigated by molecular stimulation via molecular docking software in order to determine the best ligand that presents interaction affinities with stathmin.

Among the 277 cyclic monoterpenes used, carvacrol and thymol seem to be the most stable, since molecular docking revealed binding affinity between these ligands and Stathmin.

Nevertheless, these natural substances did not show effective binding effects with the N-terminal mutated stathmin K9R/A15R/K9RA15R.

Finally; further molecular simulation analyzes and an in vivo study are needed to confirm the interaction and the potential inhibitory effect of carvacrol and thymol on stathmin

Keywords: Cancer, carvacrol, molecular docking, monoterpene, stathmin, thymol.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 15

CHAPITRE I : LA STATHMINE

I.1. Introduction	17
I.2. Organisation des gènes et distribution des protéines de la famille Stathmine	17
I.3. Localisation intracellulaire de stathmine	18
I.4. Expression de stathmine	19
I.5. Distribution subcellulaire	21
I.6. Structure de stathmine	22
I.7. Phosphorylation de la stathmine	24
I.8. Phosphorylation des autres protéines de la famille la stathmine	24

CHAPITRE II : STATHMINE ET CANCER

II.1. Introduction	26
II.2. Définition de cancer	26
II.3. Cancérogénèse	26
II.3.1. Les étapes de cancérogenèse	27
II.3.1.1. Initiation	27
II.3.1.2. Promotion	27
II.3.1.3. Progression	27
II.4. Altération génétique du cancer	28
II.5. Stathmine et cancer	28
II.6. Expression au cours des cancers	28
II.7. Phosphorylation de la stathmine au cours du cancer	30

CHAPITRE III : CARVACROL ET THYMOL

III.1. Généralités	32
III.2. Carvacrol et Thymol	34
III.3. Effets du carvacrol et thymol	34
III.3.1. Activité antioxydante	34
III.3.2. Activité antimicrobienne	35

III.3.3. Activité antitumorale	35
III .4. Carvacrol et protéines Kinase	38
CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES	
IV.1. Docking moléculaire	40
IV. 2. Programmes de Docking	40
IV.3. Outils du docking moléculaires	41
IV.3.1. Matériel Biologique	41
IV.3.1.1. Récepteur	41
IV.3.1.2. Ligand	42
IV.4. Processus de Docking	44
IV.4.1. PyRx	44
IV.4.2. UCSF Chimera	45
IV.4.3. Biovia Discovery Studio2021	45
CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS	
V.1. Résultats du criblage moléculaire	52
V.2. Résultats du Docking moléculaire	52
V.2.1. Interaction STAM1 Wild Type et Thymol, Carvacrol	54
V.2.1.1. Contacts rapprochés (Close contacts)	54
V.2.1.1.1. Liaisons Hydrogènes	55
V.2.1.1.2. Interactions Hydrophobiques	56
V.2.2. Interaction de STAM1 mutée et Thymol, Carvacrol	57
V.2.2.1-Liaisons Hydrogènes	59
V.2.2.2. Interactions Hydrophobiques	60
V.3. Discussions	61
Conclusions & perspectives	65
Références bibliographiques	66

Abréviations

μM : micro Mètre

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

Aa : Acide aminé

ADT : AutoDock Tools

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

Arg : arginine

CID : Identifiant de composé chimique (Compound identifier)

DOCK: Docking moléculaire

GDP: Guanosine diphosphate

Gln : glutamine

Glu : acide glutamique

GTP : Guanosine triphosphate

H-Bond: Hydrogène-Bond

HE: Huile essentielle

Iso : isoleucine

Kcal/mol : Kilocalories/mole

KDa : Kilo-Daltons

Leu : leucine

MAPK : protéine kinase activée par un agent mitogène

MTs : Microtubules

PDB : Protein Data Bank

Phe : phénylalanine

PLIP : Protein-Ligand Interaction Profiler

RE-DOCK: Re-Docking

RMN: Résonance Magnétique Nucleaire

RMSD: Root Mean Square Dérivation

Ser : Sérine

SLD : Stathmin Like Domain

STMN : Stathmine

Val : valine

Liste des figures

Figure 1.	Organisation exon-intron des gènes de la stathmine en différents groupes.....	18
Figure 2.	Voies de signalisation médiées par stathmine dans la différenciation, la prolifération cellulaire et l'invasion du cancer et les métastases.....	21
Figure 3.	Séquence d'acides aminés de stathmine humaine divisée dans son domaine de coiffage N-terminal et Domaine hélicoïdal C-terminal (A). (E) Spectres de corrélation 15N, 1H des contours) et stathmine marqué 15N lié à la tubuline (contours rouges). (F) Interprétation des données indiquées aux points (A–E)	23
Figure 4.	Étapes de la cancérogénèse.....	27
Figure 5.	Analyse IHC de l'expression de la stathmine dans des échantillons de patients atteints de CCR métastatique chez l'homme.....	30
Figure 6.	Structure et classifications des monoterpènes (acyclique, monocyclique,bicyclique)	32
Figure 7.	Structure chimique des monoterpènes antitumoraux présents dans les HE.....	33
Figure 8.	Structure de carvacrol.....	34
Figure 9.	« Thymus vulgaris », feuil et fleurs.....	34
Figure 10.	Mécanisme anticancéreux possible du thymol dans les cellules de mammifères via les voies d'apoptose et d'antiapoptose.....	37
Figure 11.	Carvacrol, structure moléculaire et ses multiples propriétés biologiques.....	38
Figure 12.	Modèle hypothétique des mécanismes anticancéreux induits par le carvacrol dans les cellules de choriocarcinome humain (JAR et JEG3).....	39
Figure 13.	Principe général de Docking moléculaire.....	40
Figure14.	Structure 3D de stathmine (STAM1 –HUMAIN)	42
Figure 15.	Représentation schématique de la stathmine humaine et du peptide I19L dérivé du domaine N-terminal d'interaction de stathmine avec la tubuline...	42
Figure 16.	Structure chimique 2D de carvacrol.....	43
Figure 17.	Structure 3D de carvacrol	43
Figure 18.	Structure chimique 2D de Thymol.....	43
Figure 19.	Structure 3D de Thymol.....	43
Figure 20.	Structure 2D de ligand 1 de Carvacrol.....	44

Figure 21.	Structure 2D de ligand 2 de Carvacrol.....	44
Figure 22.	Structure 2D de ligand 3 de Thymol.....	44
Figure 23.	Structure 2D de ligand 4 de Thymol.....	44
Figure 24.	Les scores donnés par UCSF Chimera (Thymol)	53
Figure 25.	Les scores donnés par UCSF Chimera (Carvacrol)	53
Figure 26.	Complexe STAM1-Thymol.....	54
Figure 27.	Complexe STAM1-Carvacrol.....	54
Figure 28.	Les interactions entre le site actif de STAM1 et le ligand 2 de Thymol....	55
Figure 29.	Les interactions entre le site actif de STAM1 et le ligand 3 de Carvacrol.....	55
Figure 30.	Les interactions entre le site actif de STAM1 mutée et le ligand 2 de Thymol.....	58
Figure 31.	Les interactions entre le site actif de STAM1 mutée et le ligand 3 de Carvacrol.....	59

Liste des tableaux

Tableau 1.	Principaux programmes de Docking moléculaire.....	41
Tableau 2.	Les meilleurs scores ΔG révélés par le screening moléculaire.....	52
Tableau 3.	Interactions H-Bond entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1.	55
Tableau 4.	Interactions H-Bond entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1.	56
Tableau 5.	Carbone H-Bond interaction entre le ligand 3 Carvacrol et le STAM1.	56
Tableau 6.	Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1...	56
Tableau 7.	Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1...	56
Tableau 8.	Pi-Alkyl interaction entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1.....	57
Tableau 9.	Pi-Alkyl interaction entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1.....	57
Tableau 10.	Interactions H-Bond entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1 mutée...	59
Tableau 11.	Interactions H-Bond entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1 mutée..	59
Tableau 12.	Carbone H-Bond interaction entre le ligand 2 Thymol et le STAM1 mutée.....	59
Tableau 13.	Carbone H-Bond interaction entre le ligand 3 Carvacrol et le STAM1 mutée.....	60
Tableau 14.	Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1 mutée	60

Tableau 15.	Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1 mutée.....	60
Tableau 16.	Pi-Alkyl interaction entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1 mutée...	60
Tableau 17.	Pi-Alkyl interaction entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1 mutée..	61

Introduction générale

La stathmine est une phosphoprotéine cytoplasmique phosphorylable de 17 kDa qui fut d'abord proposée comme un relais pour la transduction de divers signaux d'origine extracellulaire (**Sobel, 1991**) et un régulateur clé de la division cellulaire par dépolymérisation dépendante de la phosphorylation des MTs. L'assemblage correct du fuseau mitotique nécessite une déphosphorylation et une inactivation de la stathmine avant que les cellules n'entrent en mitose, suivies d'une réactivation de la stathmine pendant la cytokinèse (**Larsson et al., 1995; Marklund et al., 1996; Melander Gradin et al., 1997**).

Cette protéine est surexprimée dans plusieurs cancers notamment le cancer colorectal et de la vessie (**Nie et al., 2022**).

A noter, les autres protéines de la famille Stathmine peuvent également lier deux tubulines hétérodimères à travers leur SLD (Stathmin-Like Domain), mais de manière différente, les complexes SLD affichent des stabilités variables. Comme la stathmine, RB3-SLD est capable de lier deux hétérodimères de tubuline, mais présente des cinétiques de liaison à la tubuline très différentes, RB3-SLD formant un complexe plus stable avec la tubuline (**Charbaut et al., 2001**).

Dans le cancer, des taux élevés de stathmine sont associés à des caractéristiques agressives (**Brattsand, 2000; Curmi et al., 2000; Obayashi et al., 2017**) et une survie réduite (**Baquero et al., 2012**); une surexpression est rapportée dans une variété d'autres tumeurs malignes humaines (**Rana et al., 2008; Belletti and Baldassarre, 2011; Biaoxue et al., 2016**).

En ce qui concerne le traitement, les études indiquent que l'expression de la stathmine est associée à l'activation de PI3K, ce qui suggère qu'elle pourrait être un marqueur potentiel de sous-groupes de patients ciblés. Les lignées cellulaires de cancer surexprimant la stathmine présentent une sensibilité réduite au paclitaxel et à la vinblastine (**Alli et al., 2002**) et une combinaison de traitement anti-stathmine et de taxol s'est avérée plus efficace que la thérapie anti-stathmine seule (**Miceli et al., 2013**). Dans une étude sur le cancer du sein localement avancé, de faibles taux de stathmine prédisaient la réponse au traitement néo-adjuvant contenant du docétaxel.

Les monoterpènes 2-isopropyl-5-méthylphénol et 5-isopropyl-2-méthylphénol, également connus sous le nom de thymol et de carvacrol, ont été l'attention ces dernières années (**Kachur and Suntres, 2020; Alagawany et al., 2021**). On les trouve dans de nombreuses plantes,

notamment « *Origanum* », « *Thymus vulgaris* » ; « *Satureja*, *Thymbra* » et « *Coridothymus* » (Salehi et al., 2018; Gunes Bayir et al., 2019).

En outre, les plantes présentant des niveaux élevés de ces deux composés ont été utilisées en médecine traditionnelle dans de nombreuses régions du monde (Han et al., 2017; Miara et al., 2019). Il reste encore beaucoup à apprendre sur leurs propriétés bioactives, notamment l'activité antimicrobienne, antioxydante et antitumorale ainsi que leurs propriétés de promotion sur la santé (Sharifi-Rad et al., 2018; Diniz Do Nascimento et al., 2020).

De ce fait, nous avons tenté par une approche *in silico*, en utilisant les logiciels de Docking moléculaire, d'étudier les interactions de différents monoterpènes cycliques (carvacrol, thymol, bornéol, camphène et isothymol) avec la stathmine, afin d'approfondir nos connaissances sur l'implication des domaines de la stathmine, en particulier sa partie N terminale sur l'activation de la stathmine, une nouvelle approche d'améliorer rationnellement l'efficacité des médicaments dérivés des monoterpènes cycliques de la plante médicinale « *Thymus vulgaris* » dans le processus tumoral.

Chapitre 01 : La Stathmine

I.1. Introduction

Au début des années 1980 ; la Stathmine a été décrite dans le processus visant à identifier des protéines cytoplasmiques dont la phosphorylation pourrait être régulée positivement lors de la stimulation cellulaire par des agents extracellulaires (**Sobel and Tashjian, 1983**).

Le membre archétypal de cette famille, STMN, est une protéine cytoplasmique d'un poids moléculaire de 17 KDa qui est exprimée de manière ubiquitaire et contribue largement à la régulation de la prolifération, de la migration et de la survie des cellules (**Yip et al., 2014**).

La stathmine porte plusieurs noms : p20/p21/p23 (**Peyron et al., 1989**), 18 (Op18) (**Hailat et al., 1990**) p19 (**Pasmantier et al., 1986**), Prosolines (**Cooper et al., 1989**), et la métablastine. En 1996, Belmont et Mitchison ont rapporté que Stathmine se lie à la tubuline et régule la dynamique des MTs (**Belmont and Mitchison, 1996**).

La stathmine est une protéine régulatrice importante censée contrôler la dynamique des microtubules (MTs) à travers le cycle cellulaire d'une manière dépendante de la phosphorylation. Elle interagit avec deux molécules de tubuline α β pour former un complexe ternaire serré T2S, sédimentant à 7,7 S (**Jourdain et al., 1997**). Il est maintenant clair que la stathmine déstabilise le MT en séquestrant la tubuline. C'est un complexe non polymérique selon le degré de phosphorylation et est lui-même régulé par les voies de signalisation cellulaire.

I.2. Organisation des gènes et distribution des protéines de la famille Stathmine

Stathmine comprend une diversité structurelle des gènes stathmine, nous avons comparé leurs structures exon-intron. Cinq introns relativement conservateurs sont représentés à la **figure 1** et sont nommés respectivement I-a, I-b, I-c, I-d et I-e. La distribution de phase et l'insertion des introns I-d et I-e ont également été conservées dans ces quatre groupes, suggérant leur origine commune. Certains événements de gain et de perte d'introns ont également été trouvés dans l'évolution des gènes de la stathmine. . STMN1 a perdu l'intron I-a, qui était encore présent dans trois autres groupes.

De plus, plusieurs introns non conservés ont également été observés dans le domaine variable. Une étude a montré que lorsque la position de l'intron change, l'extension ou le raccourcissement de l'exon est la source de la variation de séquence. Par conséquent, les différences de structure des gènes augmentent la divergence des gènes familiaux dans le processus évolution (**Cao and Cheng, 2020**).

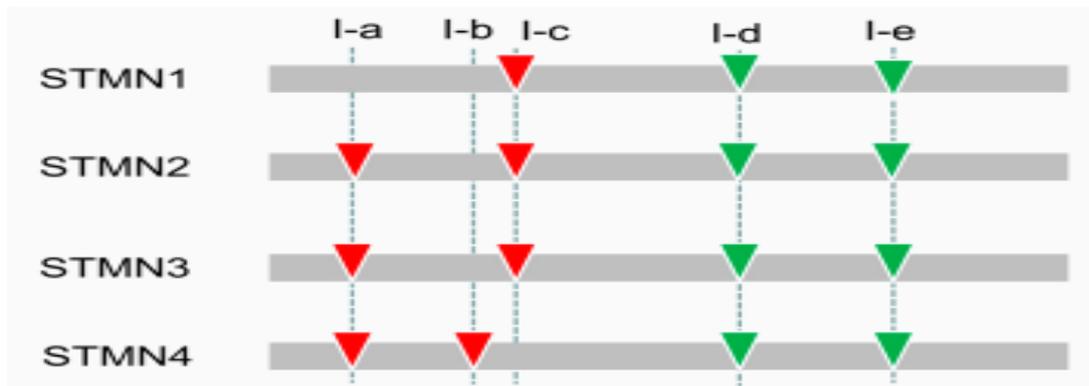


Figure 1 : Organisation exon-intron des gènes de la stathmine en différents groupes (Cao and Cheng, 2020). Les triangles inversés avec des marques vertes et rouges indiquent les positions d'insertion des introns de phase 0 et 1, respectivement. Cinq introns conservés (I-a, I-b, I-c, I-d et I-e) ont également été nommés et marqués.

I.3. Localisation de la stathmine

La stathmine est une petite phosphoprotéine régulatrice intégrant diverses voies de signalisation intracellulaires. C'est aussi l'élément générique d'une famille de protéines comprenant les protéines neuronales SCG10, SCLIP, RB3 et ses deux variantes d'épissage RB3' et RB3'' . Il a été démontré que la stathmine elle-même interagissait *in vitro* avec la tubuline d'une manière dépendante de la phosphorylation, séquestrant la tubuline libre et favorisant ainsi la dépolymérisation des MTs .

A noter que la stathmine n'est pas associée aux MTs interphasiques dans les cellules HeLa, une fraction de celle-ci est concentrée au niveau du fuseau mitotique après la configuration antisérums spécifiques aux phosphoformes de stathmine, ce qui a permis de visualiser la régulation de la phosphorylation-déphosphorylation au cours des stades successifs de la mitose, et la localisation partielle de la stathmine phosphorylée sur la sérine 16 au niveau du fuseau mitotique .

Les résultats d'expériences de surexpression de mutants de stathmine de type sauvage et de sites de phosphorylation nouveaux suggèrent en outre qu'elle induit la dépolymérisation des MTs interphasiques et mitotiques à l'état non phosphorylé, mais qu'elle est inactivée par phosphorylation en mitose. La phosphorylation des mutants 16A25A et 38A63A sur les sites 38 et 63 ou 16 et 25, respectivement, était suffisante pour la formation d'un fuseau fonctionnel, tandis que le mutant 16A25A38A63E conservait une activité de dépolymérisation des MTs

(Gavet et al., 1998). L'expression transitoire de chacune des phosphoprotéines neurales de la famille des stathmines a montré qu'elles sont au moins partiellement associées à l'appareil de Golgi et non à d'autres compartiments membranaires majeurs, probablement à travers leurs différents domaines terminaux NH₂, comme décrit pour SCG10. Plus important encore, comme la stathmine et le SCG10, SCLIP, RB3 et RB3 ' surexprimés ont pu dépolymériser les MTs interphasiques. Dans l'ensemble, nos résultats démontrent in vivo la conservation fonctionnelle du domaine stathmine au sein de chaque protéine de la famille des stathmine, avec une activité déstabilisante des MTs très probablement essentielle pour leur(s) fonction(s) biologique(s) spécifique(s) (Tabet-Helal et al., 2014).

La localisation subcellulaire des autres protéines de la famille stathmine après transfection dans des cellules HeLa interphasique par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre le domaine C-terminal a révélé une région périnucléaire constituée de cytoplasme et de vésicules et de structures tubulaires et golgiennes (Gavet et al., 1998).

I.4. Expression de la stathmine

La stathmine est un membre des protéines microtubulaires déstabilisantes qui régulent la dynamique des MTs .elle favorise la dépolymérisation des MTs pendant l'interphase et la fin mitose. L'activité microtubule-dépolymérisante de la stathmine est régulée par des changements dans son degré de phosphorylation se produisant au cours de la progression du cycle cellulaire. Ces modifications jouent un rôle critique dans la régulation de l'équilibre dynamique des MTs au cours des différentes phases du cycle cellulaire.

Chez les eucaryotes supérieurs, la famille des stathmines des régulateurs de MTs comprend la stathmine cytosolique omniprésente (Sobel, 1991)et trois produits géniques étroitement apparentés spécifiques aux neurones et associés à la croissance neuronale appelés RB3 (cerveau de rat-3), SCG10 (protéine supérieure des ganglions cervicaux 10) et SCLIP (protéine de type SCG10). La stathmine hautement conservé (SLD : Stathmin Like Domain) (Mori and Morii, 2002)qui présentent une identité d'acides aminés de 65 à 75 % avec stathmine y compris la α -hélice prévue (figure 2) (Charbaut et al., 2001).

La stathmine est une protéine de 17 kDa exprimée dans tous les types cellulaires, allant de 0,005% à 0,5 % de la protéine totale dans la cellule (Brattsand et al., 1993). Les proportions

les plus élevées se trouvent dans les cellules à prolifération rapide comme les cellules cancéreuses ; les plus faibles sont présents dans les cellules différenciées en phase terminale comme les neurones (**Rowlands et al., 1995**). Contrairement à la stathmine cytosolique ubiquitaire, les autres membres de la famille Stathmine, à l'exclusion de SCLIP, sont fortement exprimés dans le système nerveux (**Ozon et al., 1999**); où ils se trouvent dans l'appareil de Golgi et le cône de croissance (**Grenningloh et al., 2004**).

Une caractéristique des membres de la famille neuronale est une terminaison N hydrophobe qui comprend deux résidus Cystéine servant de sites de palmitoylation. Ce terminus N sert comme médiateur pour l'association aux membranes intracellulaires, principalement au niveau de l'appareil de Golgi, mais aussi au sein de cônes de croissance (**Lutjens et al., 2000**). D'autre part, la protéine stathmine n'a pas la partie hydrophobe de l'extrémité N terminale et présente une distribution cytosolique étendue.

La stathmine serait impliquée dans le règlement de prolifération cellulaire. Il a été démontré qu'une induction rapide de l'expression de la stathmine accompagnait la régénération du foie. Cela semble être une indication de stimulation de la prolifération cellulaire en réponse à une hépatectomie partielle, car ces changements dans son expression sont liés à l'expression de Ki67, un antigène lié à la prolifération, et ne sont pas détectables dans les hépatocytes au repos.

De plus ; la phosphorylation médiée par la kinase PKC et l'activation de la stathmine se produisaient lors de l'exposition du lymphome Nb2 à la prolactine (PRL) en même temps que la prolifération induite par la PRL. Comme indiqué précédemment, non seulement l'EGF induit l'expression de la stathmine , mais le facteur de croissance induit sa phosphorylation (**Meyer et al., 1992**).

Plus récemment, des preuves ont émergé indiquant l'implication de la stathmine dans les voies de signalisation cellulaire, conduisant à la prolifération et à l'organisation du cytosquelette, via la tyrosine kinase (**figure 2**) (**Hummert et al., 2001**) .

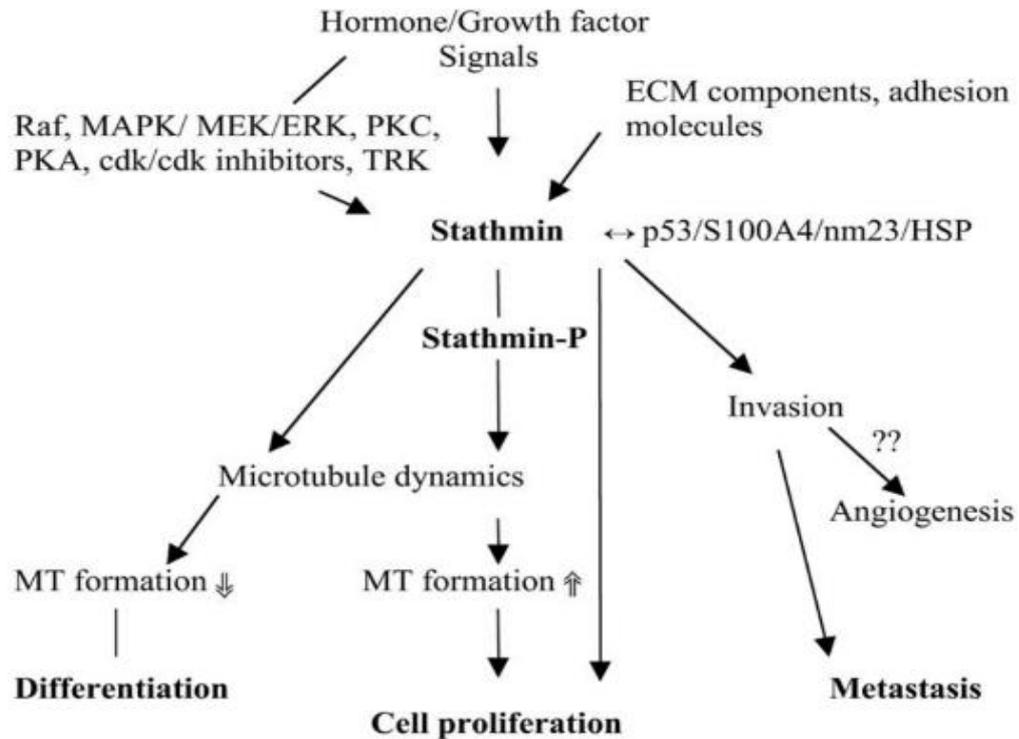


Figure 2 : Voies de signalisation médiées par stathmine dans la différenciation, la prolifération cellulaires et l'invasion du cancer et les métastases (**D'après Hummert et al., 2001**). MAPK: protéine kinase activée par le mitogène; MEK :MAPK/ERK-kinase; ERK: kinase régulée par le signal extracellulaire; TSG : gène de susceptibilité tumorale; HSP: protéine de choc thermique; MT: microtubule; PKC : protéine kinase C; TRK: kinases du récepteur de la tyrosine. ECM : matrice extracellulaire.

I.5. Distribution subcellulaire

Nous avons utilisé la microscopie à double immunofluorescence avec des anticorps spécifiques pour la stathmine et SCG10 en combinaison avec des anticorps pour les protéines marqueurs axonales, microtubulaires et synaptiques. Stathmine et SCG10 ont été coexprimés dans des neurones individuels. Alors que les deux protéines étaient fortement exprimées dans les cultures en développement au cours de la différenciation, leur localisation subcellulaire était étonnamment différente. La stathmine a montré une distribution cytosolique, principalement dans les corps cellulaires, alors que SCG10 a fortement marqué les cônes de croissance des axones et des dendrites (**Di Paolo et al., 1997**).

I.6. Structure de stathmine

Les prédictions de structure secondaire définissent deux régions de la chaîne polypeptidique de stathmine humaine (Steinmetz et al., 2000 . Wallon et al., 2000) : une terminaison N relativement peu structurée et un domaine C-terminal hélicoïdal. Il a également été reconnu que le domaine C-terminal contenait des répétitions heptades sur toute sa longueur, une caractéristique des interactions α -hélicoïdales enroulées-bobines (Doye et al., 1989). Cependant, comme le montre la **Figure 3A**, l'examen de la composition en acides aminés révèle que la séquence de stathmine présente tout au long d'un fort biais vers des petits résidus (66% de tous les résidus sont Gln, Asn, Ser, Pro, Glu, Lys, Gly et Ala) et une faible teneur en acides aminés hydrophobes volumineux (20% de tous les résidus sont Val, Leu, Ile, Met, Phe, Tyr et Trp). Cette signature de séquence est caractéristique des protéines intrinsèquement désordonnées qui manque d'une structure tertiaire bien définie et isolée (Dyson and Wright, 2005).

Ces études suggèrent fortement que le domaine C-terminal de la stathmine a une structure hélicoïdale significativement populaire alors que l'extrémité N présente peu de toute structure secondaire régulière, en accord avec la prédiction (voir ci-dessus). Seuls les fragments contenant la partie N-terminale du domaine hélicoïdal de stathmine présentent une teneur élevée en hélice. Ensemble, ces résultats démontrent que la molécule de stathmine monomère est dépourvue de structure tertiaire stable isolée. Comme illustré aux **figures 3F et E**, alors que la fraction N-terminale de stathmine adopte peu de structure secondaire régulière, son domaine C-terminal peuple un ensemble de conformations hélicoïdales étendues et flexibles. La structure hélicoïdale est favorisée par un tronçon séquentiel, résidus 41–110, situé à l'extrémité aminée du domaine C-terminal. Ce comportement de conformation classe la stathmine comme une protéine intrinsèquement désordonnée (Dyson and Wright, 2005).

A

Domaine de plafonnement N-terminal (2-40)

ASSDIQVKELEKRRASGQAFELILSPRSKESVPEFFPLSP

Domaine hélicoïdal C-terminal (41-149)

KKKDLSEELIQKKLEAAEERRKSHEAEVLKQLAEKREHEKEVQLQKAIENNFS

KMAEEKLTHKMEANKENREAQMAAKLERLREKDKHIEEVRKNKESKDPADETEAD

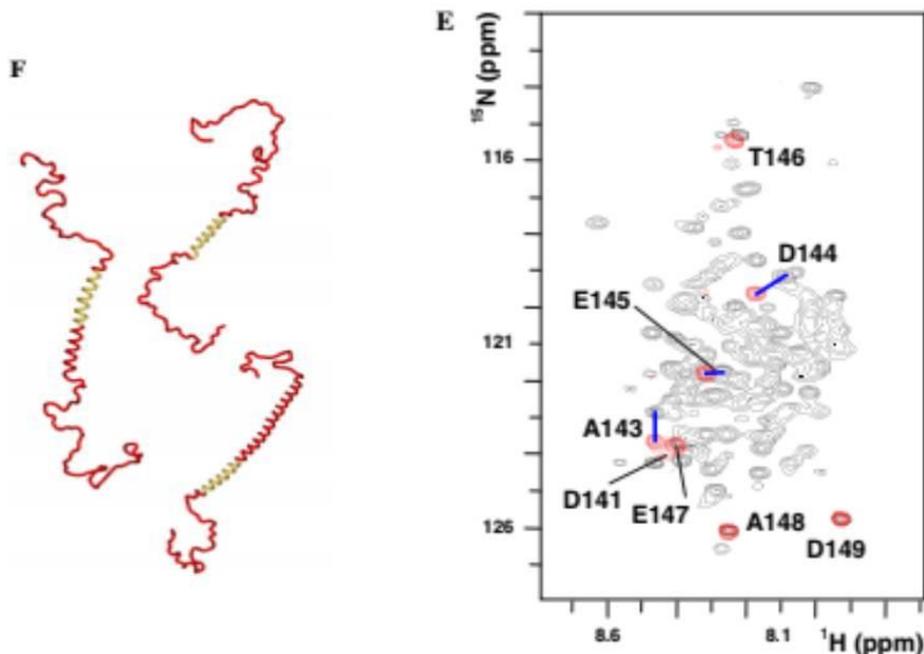


Figure 3 : Séquence d'acides aminés de stathmine humaine divisée dans son domaine de coiffage N-terminal et Domaine hélicoïdal C-terminal (A). Les résidus polaires et petits (Gln, Asn, Ser, Pro, Glu, Lys, Gly et Ala) enrichis en protéines intrinsèquement désordonnées sont surlignés en rouge. Les quatre sites de phosphorylation de la sérine, Ser16, Ser25, Ser38 et Ser63 sont affichés en plus grande taille de police. (E) Spectres de corrélation ^{15}N , ^1H (descontours) et stathmine marqué ^{15}N lié à la tubuline (contours rouges). Comme prévu pour un grand complexe de 200 kDa, la plupart des résonances ont disparu dans le ^{15}N , ^1H spectre de corrélation du complexe T_2S démontrant que la plupart des résidus de stathmine adoptent une conformation stable lors de la liaison à la tubuline. Toutefois, huit des résidus provenant de l'extrémité C de la stathmine restent flexibles dans le complexe. Les lignes bleues indiquent des changements de résonance pour certains de ces résidus. (F) Interprétation des données indiquées aux points (A–E). Isolément, le domaine C-terminal de la stathmine (représentation en ruban) remplit un ensemble de conformations hélicoïdales transitoires et principalement étendues. La formation hélicoïdale du domaine C-terminal est entraînée par le site de nucléation hélicoïdale majeur situé dans son extrémité N (en jaune) (Dyson and Wright, 2005).

I.7. Phosphorylation de la stathmine

La stathmine possède 11 sérines et 2 thréonines. Parmi ces résidus, plusieurs appartiennent à des sites de phosphorylation consensus et quatre sont efficacement phosphorylés *in vivo* (Doye et al., 1989 ; Schubart et al., 1989; Maucuer et al., 1990; Beretta et al., 1993) . De nombreuses études ont montré que quatre sites de phosphorylation sont situés dans la partie N-terminale et sont phosphorylés en réponse à divers signaux d'origine extracellulaire (Sobel, 1991).

Elle est phosphorylé sur quatre sérines résidus par différentes kinases. La phosphorylation connue les sites sont Ser16, Ser25, Ser38 et Ser63. L'état de phosphorylation de stathmine fluctue au cours du cycle cellulaire, Atteignant son niveau le plus élevé.

Bien que les protéines kinases spécifiques qui phosphorylent directement la stathmine *in vivo* n'aient pas été identifiées, les preuves disponibles suggèrent que dans les cellules, la Ser-63, et dans une moindre mesure, la Ser-16 sont phosphorylées par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (Marklund et al., 1993; Wang et al., 1993). Ser-25 et Ser-38 sont phosphorylées à leur tour par une ou des protéine (s) kinase(s) activée(s) par un mitogène et une ou des kinase(s) cycline-dépendante(s) ; et Ser-16 est phosphorylée par Ca²⁺/calmoduline kinase-GR (Marklund et al., 1994).

I.8. Phosphorylation des autres protéines de la famille Stathmine

Comme la stathmine, SCG10 est impliqué dans la déstabilisation des MTs et sa phosphorylation conduit à l'inhibition de son activité. L'analyse *in vitro* de recombinants SCG10 phosphorylés par spectrométrie de masse a identifié quatre sites de phosphorylation (Antonsson et al., 1998) SCG10 est phosphorylé aux sérines 50 et 97 par la protéine kinase PKA, aux sérines 62 et 73 par la MAP kinase, et à la sérine 73 par p34cdc2 et CDK5 (Grenningloh et al., 2004) comme ses deux variantes d'épissure RB3' et RB3'' sont moins établies. Pour RB3, la seule sérine correspond à la 16 sérine dans la stathmine.

En conclusion ; la stathmine est une protéine régulatrice des MTs qui joue un rôle important dans l'assemblage et le désassemblage du fuseau mitotique. Au niveau moléculaire, Stathmine dépolymérise les MTs en séquestrant des dimères de tubuline libres ou en induisant directement une catastrophe microtubulaire.

C'est l'élément générique d'une famille des protéines Stathmine qui présentent un domaine en commun, le domaine SLD (Stathmin Like Domain) et qui interagissent différemment avec la tubuline. La surexpression de la stathmine dans les cellules cancéreuses pourrait être exploitée comme un champ antiprolifératif de la cellule cancéreuse.

Chapitre 02 : Stathmine et Cancer

II.1. Introduction

Le cancer, maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale, est une cause majeure de morbidité et de mortalité. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) estime qu'il y a 19,3 millions de nouveaux cas et 9,9 millions de décès par ans dans le monde (**Sung et al., 2021**). Avec le développement de la biologie moléculaire des tumeurs, les progrès dans la détection et le traitement du cancer ont conduit à des réductions impressionnantes de la mortalité et de la morbidité. Cependant, le cancer reste l'une des maladies les plus difficiles à diagnostiquer sur le plan clinique (**Biao-xue et al., 2011**).

Il a été démontré que la stathmine est régulée positivement dans certains cancers (**Nie et al., 2015**), et est corrélée à la différenciation, à la prolifération et à la migration cellulaires, en particulier dans les cellules tumorales solides (**Reyes et al., 2015**). Par conséquent, la stathmine peut être une cible attrayante pour la conception de médicaments, car plusieurs aspects de la progression tumorale peuvent être inhibés simultanément en ciblant cette molécule. Il y a une dizaine d'années Barbara Belletti, Shushan Rana et leurs collaborateurs ont prouvé un lien entre stathmine et cancer (**Rana et al., 2008; Belletti and Baldassarre, 2011**).

II.2. Définition de cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par la croissance anormale de cellules d'un même clone et confinée aux tissus de l'organisme. Les cellules cancéreuses acquièrent des propriétés spécifiques qui leur permettent de se diviser indéfiniment de manière chaotique, formant des tumeurs bénignes. Son développement, accompagné de l'accumulation de mutations, permet aux cellules qui la composent de continuer à se développer et d'acquérir la capacité de coloniser les tissus environnants ; et la tumeur devient maligne. Il est possible que les cellules parviennent à franchir la membrane délimitant l'organe du reste de l'organisme pour essaimer dans d'autres organes en formant des métastases (**Sung et al., 2021**).

II.3. Cancérogénèse

La cancérogénèse est un processus multi-étapes qui est initié à partir d'une cellule normale. Cette cellule normale va tout d'abord accumuler des altérations génétiques qui vont aboutir à l'acquisition par la cellule de caractéristiques anormales. Suite à une sélection clonale et une multiplication, les cellules vont progresser vers un stade tumoral, acquérir un phénotype invasif et évoluer vers un stade métastatique (**Mongaret et al., 2020**). Elle comprend 3 phases : l'initiation, la promotion et la progression.

II.3.1. Etapes de cancérogenèse

II.3.1.1. Initiation : Elle correspond à une prolifération anormale de cellules qui se divisent de manière incontrôlée et échappent à toute régulation. La survenue et la progression de la tumeur maligne résultent d'une accumulation d'événements génétiques complexes altérant le fonctionnement de certains gènes contrôlant la prolifération et la division de la cellule normale. Ces modifications génétiques peuvent avoir une origine embryonnaire (cas des cancers pédiatriques), une origine héréditaire (certains cancers gynécologiques ou coliques), mais peuvent également être induites par des facteurs exogènes qui sont appelés génotoxiques chimiques (hydrocarbures polycycliques).

II.3.1.2. Promotion : La promotion consiste en une expansion clonale de ces cellules transformées. Au fur et à mesure que la division se poursuit, l'anomalie est transmise à la progéniture. De plus, les cellules accumulent de nouvelles mutations qui leur permettent de se diviser de plus en plus tout en échappant aux systèmes de contrôle de l'organisme.

II.3.1.3. Progression : ces cellules vont perdre peu à peu leurs caractères de différenciation, elles forment alors une grosse masse cellulaire anormale envahissant les tissus voisins. Dans certaines conditions, les cellules peuvent se détacher de la tumeur primitive et migrer dans le reste de l'organisme via les voies lymphatiques ou sanguines pour former des métastases à distance (**figure 4**) (Hanahan and Weinberg, 2011).

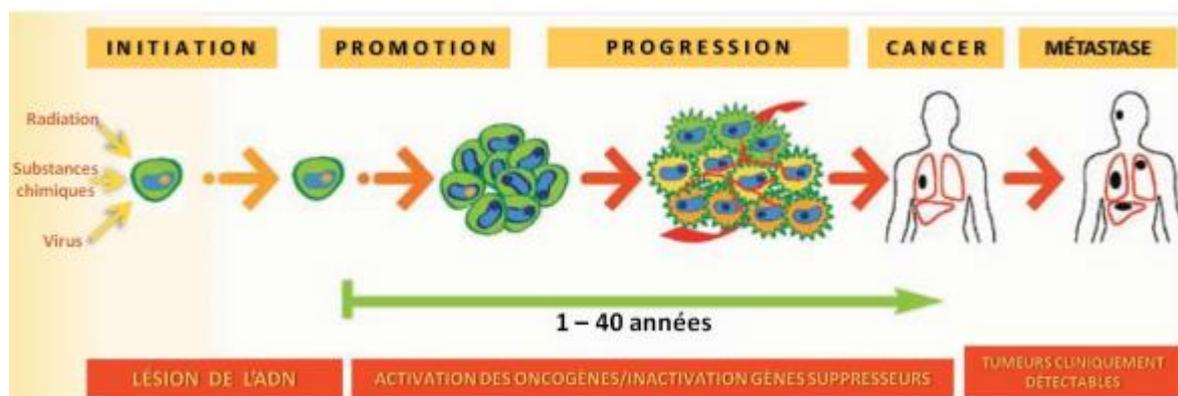


Figure 4. Étapes de la cancérogenèse (D'après Béliveau and Gingras, 2007).

Des agents néfastes affectent une cellule normale et l'initient à la cancérogenèse. La cellule entre en phase de promotion tumorale. Elle subit des lésions au niveau de l'ADN et cela déclenche la prolifération incontrôlée. Des oncogènes sont activés et des gènes suppresseurs sont inactivés pour amener les cellules en phase de progression qui peut durer des années. Finalement, le cancer s'établit et peut être diagnostiqué.

II.4. Altération génétique dans le cancer

L'altération génétique transforme une cellule normale en une cellule néoplasique. Les mécanismes de contrôle cellulaire sont alors désactivés et les cellules tumorales prolifèrent de manière anarchique pour former des masses tumorales au niveau du corps. Cette masse tumorale a alors tendance à grossir et les cellules tumorales envahissent les tissus adjacents voire se propagent dans tout l'organisme pour former des métastases. Cependant, la réussite de la progression de cette tumeur dépend du succès de nombreux autres processus cellulaires essentiels au développement de la tumeur. Les cellules cancéreuses, en particulier, doivent se nourrir de nutriments, résister à l'hypoxie, se déplacer dans les tissus et la circulation sanguine et ralentir le système immunitaire de l'hôte. Les progrès des connaissances au cours des deux dernières décennies ont été essentiels pour comprendre tous ces processus. Il est maintenant clair qu'ils dépendent tous à la fois des propriétés intrinsèques des cellules tumorales et des interactions étroites et complexes entre les cellules tumorales et le reste de l'organisme. Parmi toutes les étapes, la prochaine section se concentrera sur seulement deux processus critiques : l'angiogenèse et la formation des métastases (**Papetti and Herman, 2002**).

II.5. Stathmine et cancer

La stathmine est une protéine de liaison à la tubuline universellement exprimée et conservée au cours de l'évolution qui est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La surexpression de stathmine largement rapportée dans les tumeurs malignes humaines suggère une fonction importante dans le cancer et peut être une cible possible pour la réduction de la maladie (**Byrne, 2012**).

L'étude d'interaction de stathmine avec des médicaments anticancéreux fournissent également de nouvelles informations sur le mécanisme du stathmine dans les tumeurs malignes résistantes aux médicaments et mettent en évidence le potentiel de combiner l'inhibition du stathmine avec des thérapies établies (**Honnappa et al., 2006**).

II.6. Expression au cours des cancers

La stathmine est exprimée dans différents types de cancers avec une corrélation entre la sensibilité des tumeurs aux agents ciblant les microtubules (MTs). En effet, la surexpression de la stathmine diminue la polymérisation des MTs (**Akhtar et al., 2014**).

La mobilité et la migration sont des événements biologiques critiques dans la persistance et la propagation des tumeurs malignes. La migration des cellules cancéreuses conduit finalement à des métastases locales et distantes de cellules malignes, accélérant finalement la progression de la maladie. La stathmine est un membre important des protéines organisatrices des MTs, et la migration cellulaire est étroitement associée à la stathmine, qui perturbe la dynamique des MTs en augmentant la dépolymérisation des MTs. La surexpression de la stathmine est fortement associée à l'agressivité tumorale chez les patients cancéreux (**Chen et al., 2021**).

Cette protéine est exprimée à des niveaux élevés dans une variété de tumeurs malignes humaines, y compris le cancer de la prostate (**Hanash et al., 1988**). Il a été démontré qu'une forte expression de la stathmine dans les cellules cancéreuses est en corrélation avec leur capacité à proliférer et à maintenir un phénotype malin (**Mistry and Atweh, 2002**). Il est intéressant de noter que lorsque des biopsies de cancer de la prostate humaine ont été colorées avec des anticorps anti-stathmine, l'immunoréactivité a été observée dans les tumeurs peu différenciées, mais pas dans les tumeurs hyperplasiques ou bien différenciées. Fait important, il a été démontré que les niveaux d'expression de la stathmine sont en corrélation avec le comportement malin du cancer de la prostate. Par conséquent, il a été suggéré que les niveaux d'expression de la stathmine pourraient servir de marqueur pronostique pour le cancer de la prostate (**Friedrich et al., 1995**).

Le cancer colorectal (CCR) comprend le cancer du côlon et du rectum. La plupart des cas (96 %) surviennent dans les glandes de la muqueuse intestinale. Ce sont des cancers glandulaires ou dits « adénocarcinomes » ; est le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme et le deuxième cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde. Il y a 1,4 million de nouvelles infections et 700 000 décès chaque année. Le cancer colorectal est la deuxième cause de décès chez les hommes et la troisième cause de décès chez les femmes (**Ferlay et al., 2012**).

La stathmine a été identifiée comme un nouveau biomarqueur prédictif des métastases chez les patients atteints de CCR. Tout d'abord, les niveaux de stathmine sont significativement corrélés avec le phénotype métastatique du CCR et sont considérés comme un marqueur prédictif des métastases hépatiques. Deuxièmement, les niveaux élevés d'expression de la stathmine étaient significativement associés à une plus mauvaise OS chez les patients atteints de CCR métastatique. Enfin, nos données suggèrent que l'augmentation de la croissance cellulaire et de la capacité de survie des cellules tumorales positives à la stathmine pourrait contribuer en partie à la progression de la tumeur et à la formation de métastases. Progression tumorale et à la formation de métastases. Par conséquent, la stathmine pourrait être un biomarqueur pronostique

biomarqueur pronostique potentiel innovant pour la progression du CCR et servir de nouvelle cible thérapeutique (**figure 5**) (**Hanahan and Weinberg, 2000**).

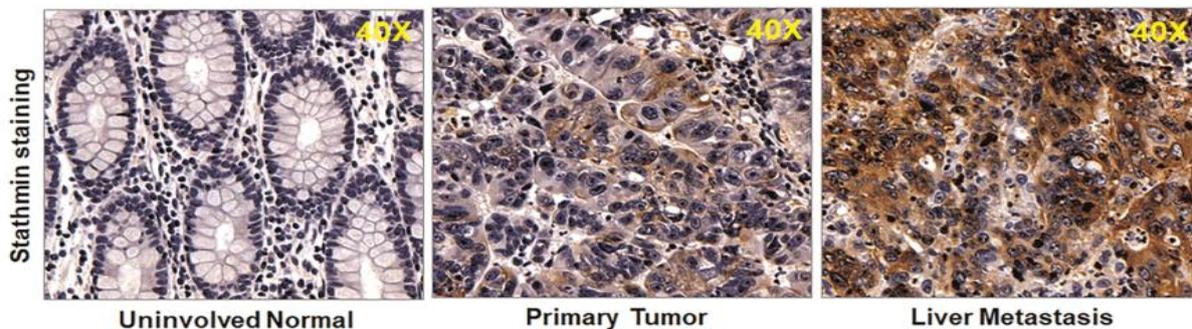


Figure 5 : Analyse IHC de l'expression de la stathmine dans des échantillons de patients atteints de CCR métastatique chez l'homme (**Zheng et al., 2010**). Analyse IHC de la coloration de la stathmine dans les tissus tumoraux métastatiques et primaires humains de stade IV appariés (n = 25). L'expression de la stathmine était faible et homogène dans l'épithélium colorectal normal non impliqué (n = 8). Cependant, dans les cellules primaires et métastatiques du CCR, l'expression de la stathmine était plus élevée, variait considérablement d'un cas à l'autre et était distribuée de manière hétérogène.

II.7. Phosphorylation de la stathmine au cours du cancer

La phosphorylation de la stathmine, une protéine qui régule l'activité des MTs, a été impliquée dans la progression de divers cancers. Les MTs sont des structures importantes impliquées dans la division cellulaire et leur régulation est nécessaire au bon fonctionnement des cellules. Plusieurs études ont montré que la stathmine est surexprimée dans de nombreux cancers et que sa phosphorylation est généralement augmentée dans ces cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. La phosphorylation de la stathmine entraîne une stabilité réduite des MTs, ce qui peut favoriser la division cellulaire et la prolifération tumorale (**Dean et al., 2010**)

Le gène *STMN1* humain est responsable du codage de Stathmine, qui abrite quatre sites de phosphorylation de la sérine. La liaison et la séquestration de la tubuline soluble sont fortement réduites ou éliminées lorsque Stathmine est phosphorylée en Ser16 ou Ser63 (**Manna et al., 2009**). La PKC est capable de phosphoryler la Stathmine Ser16, ainsi que la PAK1 et la kinase II/IV Ca²⁺/calmoduline dépendante (**Wittmann et al., 2004**). Ser25 et Ser38, d'autre part, sont les cibles spécifiques des MAPK dépendantes de la cycline. En perturbant la progression normale du cycle cellulaire, la surexpression de Stathmine dans le cancer humain facilite la polyploïdie/aneuploïdie des cellules ciblées, comme l'ont démontré (**Hsieh et al., 2010**). Les CDK, ou kinases, se sont révélées jouer un rôle dans ce phénomène grâce à des recherches menées par (**Hayashi et al., 2006**).

La stathmine participe aux points de contrôle G1/S et G2/M de la progression du cycle cellulaire en affectant la dynamique de la formation des MTs et la progression du cycle cellulaire (**Akhtar et al., 2014**). Kang et al ont découvert qu'une immunoréactivité aberrante de p53 était associée à une expression plus élevée de Stathmine dans l'adénocarcinome gastrique, suggérant que l'hyperactivation du gène *STMN1* pourrait être en partie due à l'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53. Batsaikhan et ses collègues ont également démontré que la cytidine désaminase (AID) induite par l'activation peut être l'un des activateurs de l'expression de la protéine Stathmine dans l'adénocarcinome gastrique. La corrélation entre les protéines P27 et Stathmine est soit directe, soit par d'autres voies non définies (**Batsaikhan et al., 2014**). Matsumoto et al ont rapporté qu'une AID anormale a réduit le nombre de copies des inhibiteurs de CDK tels que *CDKN2A* et *CDKN2B* (**Matsumoto et al., 2010**), qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs et des témoins CDK. L'AID peut activer la protéine Stathmine via la voie AID/*CDKN2A*/CDK s/Stathmine (**Chen et al., 2018**).

En conclusion, l'expression de stathmine était associée à un pronostic plus sombre chez les patients atteints de plusieurs cancers, notamment le CCR, et corrélée positivement à une prolifération cellulaire accrue. La surexpression de cette protéine dans le cancer du côlon est indépendamment associée à une amélioration de la survie et significativement liée au développement de la maladie.

De ce fait, la stathmine est considérée comme une cible potentielle pour de nouveaux traitements anticancéreux. Cependant, plus de recherches sont nécessaires pour comprendre pleinement le rôle de la stathmine dans le développement et la progression du cancer et pour développer des traitements efficaces ciblant à bloquer l'invasion tumorale.

Chapitre 03 : Carvacrol et Thymol

III. 1. Généralités

Les monoterpènes ont une fonction phénol constituant l'une des grandes familles biochimiques (parmi eux on cite le thymol, le carvacrol) des huiles essentielles (HE). Ils ont pour structure commune un cycle aromatique (benzène) sur lequel est branché un groupement hydroxyle (figure 6).

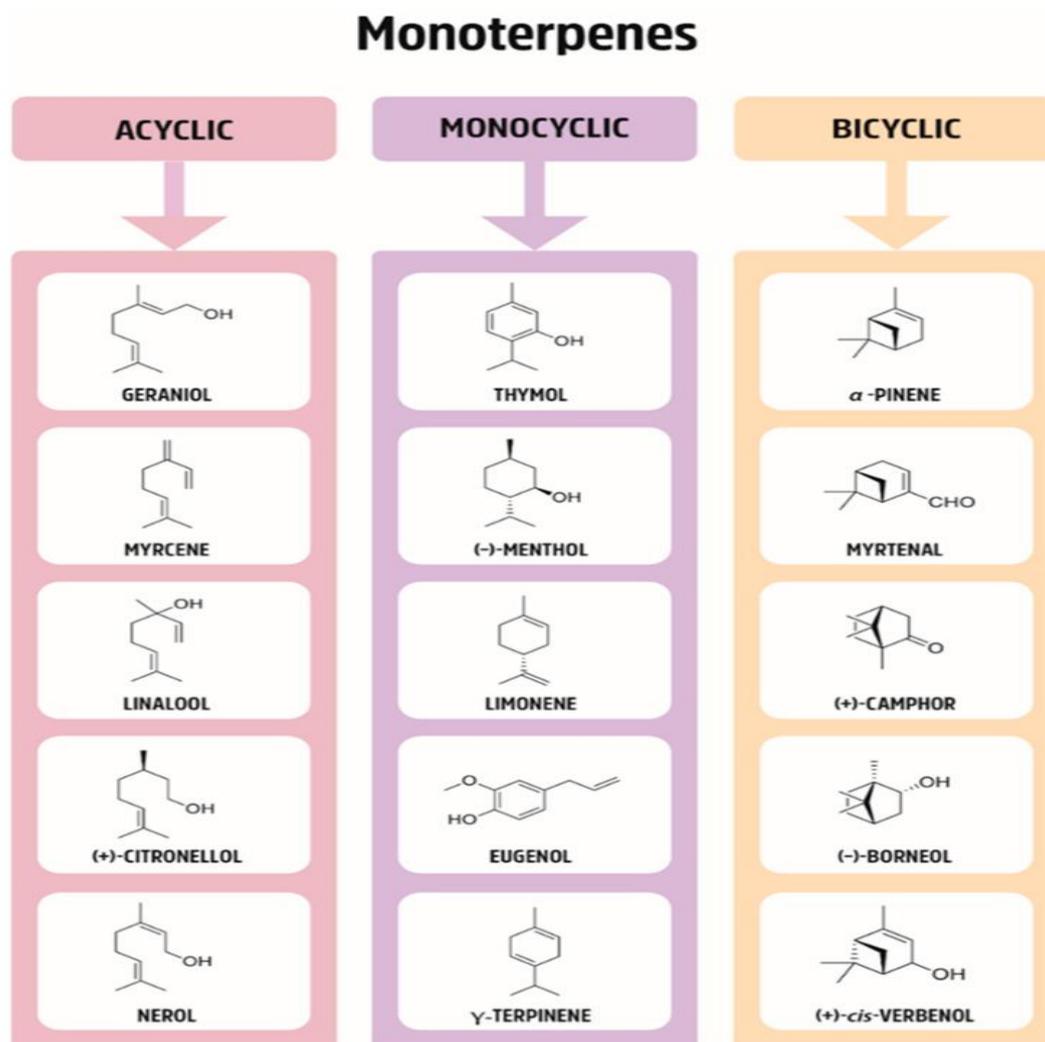


Figure 6 : Structure et classifications des monoterpènes (acyclique, monocyclique, bicyclique) (D'après Mariola et Joanna ,2020).

Les monoterpènes et leurs dérivés présentent des ingrédients clés dans la conception et la production de nouveaux composés biologiquement actifs. Certains monoterpènes aliphatiques, monocycliques et bicycliques comme le géraniol, le thymol, le myrtène, le pinène, le camphre, le bornéol et leurs structures modifiées. Les composés en question jouent un rôle central dans les applications biologiques et médicales. Ils présentent des activités biologiques anti-inflammatoires, antimicrobiennes, analgésiques, antivirales, anticancéreuses, antituberculeuses

et antioxydantes présentées par les monoterpènes et leurs dérivés (**figure 7**) (Mariola et Joanna ,2020).

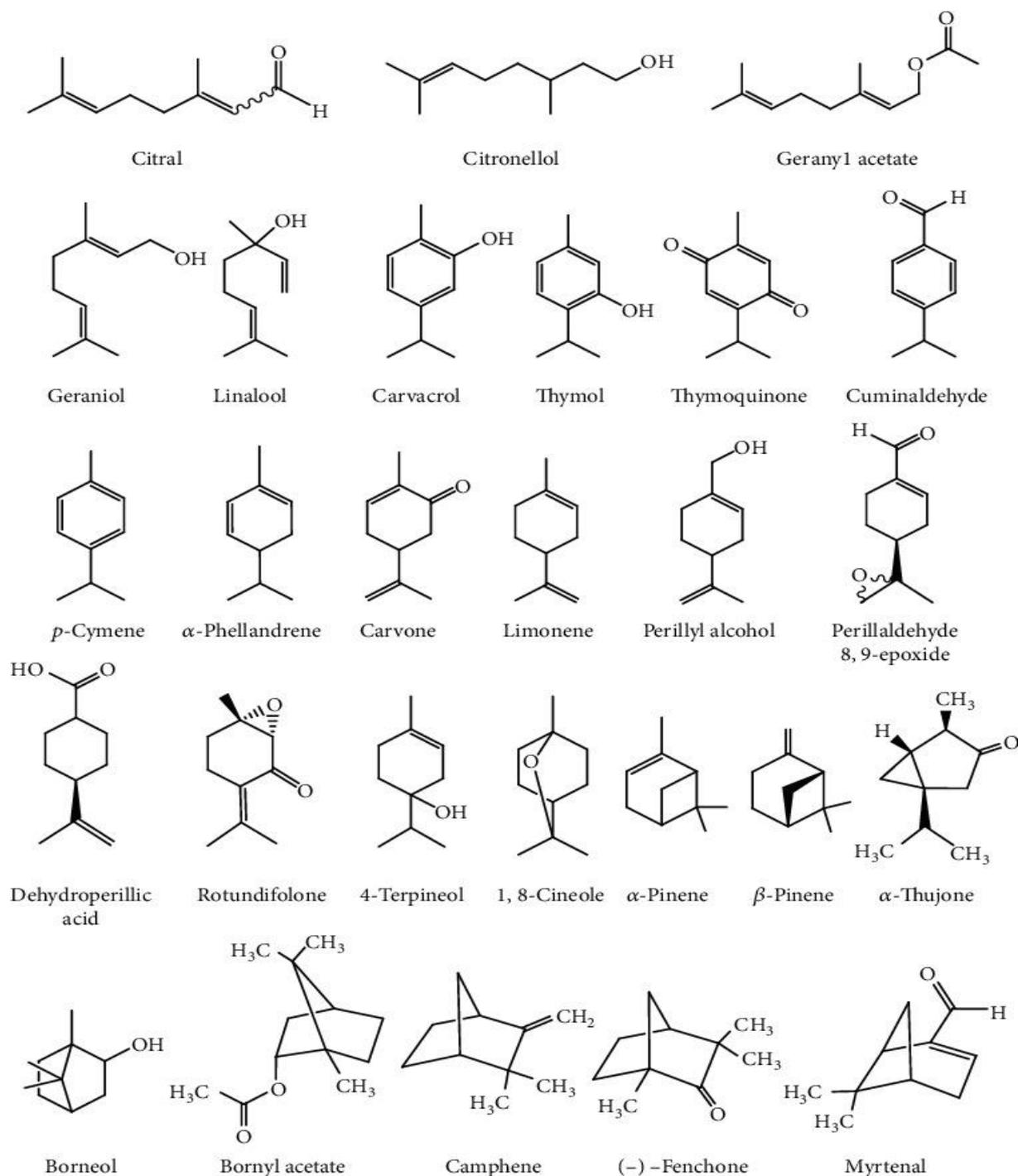


Figure 7 : Structure chimique des monoterpènes antitumoraux présents dans les HE (Machado et al., 2022).

III.2. Carvacrol et Thymol

Le carvacrol (2-méthyl-5-(1-méthyl éthyl) phénol) et le thymol (2-isopropyl-5- méthylphénol) sont deux phénols monoterpéniques présent dans diverses huiles essentielles HE d'espèces de Lamiaceae, notamment « *Origanum* » ; « *Thymus vulgaris* » ; « *Satureja*, *Thymbra* » et « *Coridothymus* » (**Baser, 2008**). La plus forte concentration naturelle du carvacrol (environ 80 %) a été trouvée dans l'Origan vulgaire. Le thymol est biosynthétisé par l'aromatisation du γ -terpinène en p-cymène, suivie de l'hydroxylation du p-cymène (**Poulose and Croteau, 1978**). Il a été démontré que le carvacrol et le thymol possèdent un large éventail d'activités biologiques, telles que les activités antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et antitumorales (**figures 8 et 9**) (**Bakkali et al., 2008; Shiyab, 2012**).

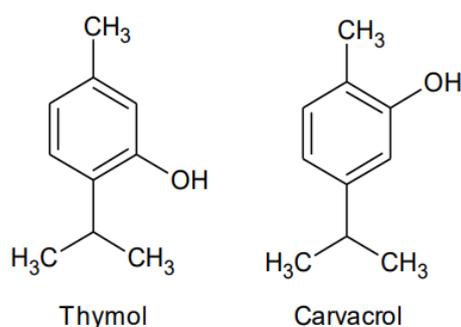


Figure 8 : Structure de carvacrol et du thymol
(**Shiyab, 2012**)



Figure 9 : « *Thymus vulgaris* », feuilles et fleurs

III.3. Effets du carvacrol et thymol

Le carvacrol et le thymol sont des HEs phénoliques naturelles extraites du « *Origanum vulgare* » (Origan) et « *Thymus vulgaris* » qui a des activités bactéricides contre une large gamme de bactéries pathogènes (**Devi et al., 2010 ; Miladi et al., 2016**). Récemment, différentes activités du carvacrol et le thymol telles que les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et antifongiques et antitumorales ont été évaluées.

III.3.1. Activité antioxydante

L'oxydation ou le stress oxydatif causé par un déséquilibre entre les radicaux libres, résultant de nombreux processus biochimiques tels que la lumière, la chaleur et les radiations des métaux de transition, les oxydants et les enzymes avec des intermédiaires de détoxification, sont associés à de nombreux troubles chroniques chez l'homme (**Sharifi-Rad et al., 2018; Escobar et al., 2020**). Le carvacrol et le thymol ont la capacité de réduire le stress oxydatif en inhibant

les radicaux libres et les ROS, ainsi que leurs effets synergiques ; le stress oxydatif en étouffant les radicaux libres en fournissant des électrons et en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation des lipides, en stimulant les enzymes antioxydantes endogènes et stimulant leur activité antioxydante (**Bagetta et al., 2020 ; Escobar et al.,2020 ; Lukic et al., 2020**).

Le scientifique Gursul et ses collaborateurs ont évalué l'efficacité du carvacrol et du thymol dans l'huile de noix microencapsulée, ce qui réduit l'oxydation des noix et améliore la capacité de stockage. Les huiles d'origan avec du carvacrol et du thymol sont utilisées comme polyphénols antioxydants dans les emballages alimentaires (**Gursul et al., 2019**).

Le carvacrol est un antioxydant faible pour réduire le stress oxydatif et le risque de troubles par rapport au thymol (**Nagoor Meeran et al., 2017**).

III.3.2. Activité antimicrobienne

Les composants principaux de l'origan, du thym et d'autres extraits d'herbes sont le carvacrol et le thymol .Ces extraits sont généralement considérés comme des agents antimicrobiens importants en raison de leur abondance en composés phénoliques (**Jafri et al., 2019**), qui leur confèrent des propriétés hydrophiles, et de leur substitut aromatisé , qui leur confère propriétés hydrophobes. Le scientifique Memar et ses collaborateurs ont démontré une activité antimicrobienne puissante contre un large éventail de micro-organismes avec un effet synergique puissant (**Khan et al., 2017 ; Memar et al., 2017 ; Rúa et al., 2019 ; Wijesundara et al., 2021**).

Le carvacrol et le thymol sont connus pour perturber les membranes cellulaires bactériennes, empêcher la croissance des biofilms, inhiber la motilité des microbes, inhiber les ATPases microbiennes et inhiber les pompes à efflux bactériennes (**Kachur & Suntres, 2020**). De plus, la stabilité et l'activité antimicrobienne du carvacrol ont été améliorées par son incorporation dans des nanoformes ou lorsqu'il est couplé à des nanoporteurs (**Bendary et al., 2021 ; Chen et al., 2021; Min et al., 2021**).

III.3.3. Activité antitumorale

Le cancer est considéré comme une grande menace dans le monde entier, une cause majeure de morbidité et la deuxième cause de mortalité (**Günes-Bayir et al., 2017 ; Bouhtit et al ., 2021**). Causé par une multiplication incontrôlable de cellules dans n'importe quelle partie du corps, il peut finir par se propager (**Sarkera et al., 2020**). Cependant, il existe plusieurs causes de cancer, notamment l'exposition à des composés cancérigènes et un mode de vie malsain (**Elbe et al., 2020**).

Dans les différentes études, carvacrol et le thymol ont présenté un effet anticancéreux multiforme en altérant la viabilité, l'efficacité et la résistance à l'infection, à l'oxydation et aux dommages à leur matériel génétique (**Bagetta et al., 2020**).

Le carvacrol a été examiné *in vitro* pour ses propriétés anticancéreuses (**Günes-Bayir et al., 2017**). Il a été utilisé pour l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein, les résultats indiquent que le carvacrol a eu un impact anticancéreux en inhibant l'expression de certaines protéines, en inhibant la prolifération et en provoquant l'apoptose au niveau de ces cellules tumorales (**Mari et al ; 2020**).

A noter, le carvacrol a un effet efficace antiprolifératif au niveau des cellules cancéreuses du sein à une dose de 20 μM , mais au-dessus de ce point, il a provoqué l'apoptose (**Li et al., 2021**).

A ajouter que le carvacrol et le thymol ont une activité cytotoxique en abaissant la viabilité cellulaire, en induisant l'apoptose dans les cellules et en réduisant la quantité de lignée cellulaire dans le cancer de l'ovaire ; selon la dose et le temps, le thymol était plus efficace que le carvacrol pour prévenir la croissance des cellules cancéreuses de l'ovaire (**Elbe et al., 2020**).

Bouhtit et ses collaborateurs ont étudié les effets de huile essentielle HE de « *Ptychotis verticillata* » et leurs dérivés carvacrol et thymol sur des lignées cellulaires cancéreuses ; HE a démontré une cytotoxicité contre les lignées cellulaires cancéreuses à de faibles doses qui affectent l'apoptose. Tandis que l'activité anticancéreuse synergique du carvacrol et le thymol a éliminé toutes les cellules cancéreuses et les résultats suggèrent que la combinaison des propriétés anticancéreuses du carvacrol et du thymol et de leur élimination pourrait tuer les cellules résistantes (**Bouhtit et al., 2021**).

Le thymol peut induire un dysfonctionnement mitochondrial lié au stress oxydatif et d'autres morts cellulaires apoptotiques intrinsèques et extrinsèques sur les cellules cancéreuses. Il est également évident qu'il exerce un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses. La **figure 10** a démontré que le mécanisme proposé des effets anticancéreux du thymol via les voies d'apoptose et d'antiapoptose (**Islam et al., 2019**)

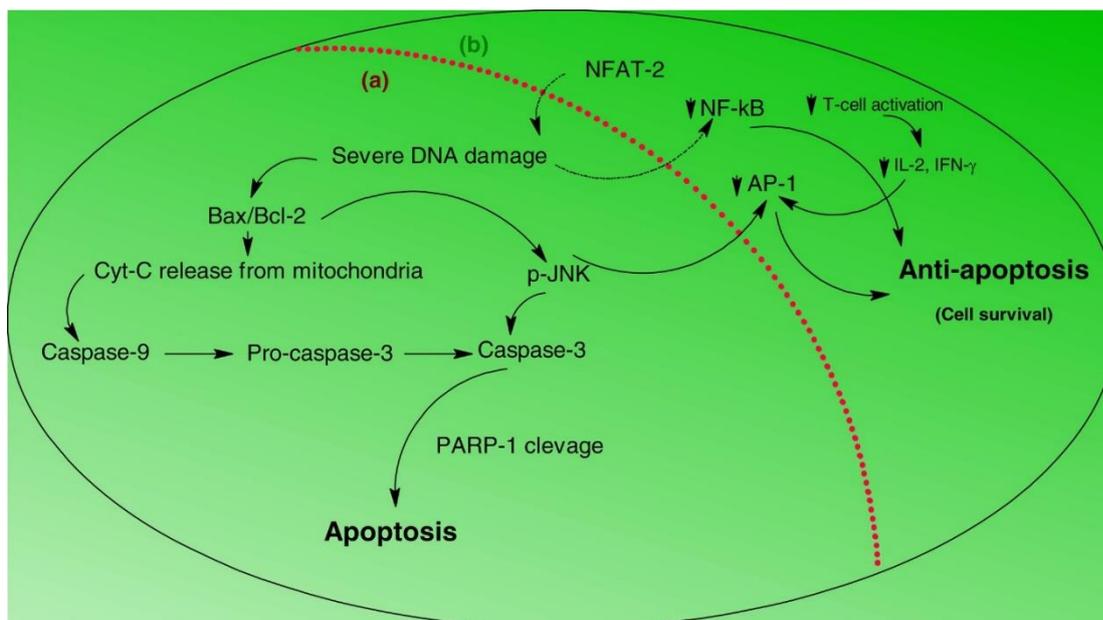


Figure 10 : Mécanisme anticancéreux possible du thymol dans les cellules de mammifères via les voies d'apoptose et d'antiapoptose. **(a)** Voie anticancéreuse dans une cellule cancéreuse. **(b)** Voie anticancéreuse dans une cellule normale (Islam et al., 2019).

D'après la **figure 10 (a)**, le thymol peut causer de graves dommages l'ADN par plusieurs mécanismes, qui finit par réguler à la hausse l'expression de la protéine Bax/Bcl-2 et entraîne la libération du cytochrome C par les mitochondries (voie intrinsèque) d'apoptose.

Ainsi, la régulation à la hausse de Caspase-9/3. Inversement, la caspase-3 peut être régulée positivement par la voie Bax/Bc-2-c-Jun N-terminal kinase (p-JNK). Enfin, le clivage de la poly [ADP-ribose] polymérase 1 (PARP-1) provoque une mort cellulaire anoptotique. Cependant, la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) provoque également la mort cellulaire apoptotique dans les cellules cancéreuses par le thymol.

D'après la **figure 10 (b)** le thymol réduit l'activation des cellules T, entraîne une régulation à la baisse de la production et de l'expression de l'interleukine (IL)-2 et de l'interféron gamma (IFN- γ). Thymol supprime également les expressions du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et de la protéine activatrice 1 (AP-1) dans les cellules normales de mammifères. Le résultat ultime est l'anti-apoptose et la survie cellulaire.

Carvacrol et thymol sont des composés biologiques multi-cibles avec de multiples effets biologiques, le carvacrol a aussi des effets (anti-inflammatoire, anti-diabétique et antihypertenseur ; antiviraux) sur la santé humaine (**figure 11**) (Maruca et al., 2019 ; Bagetta et al., 2020).

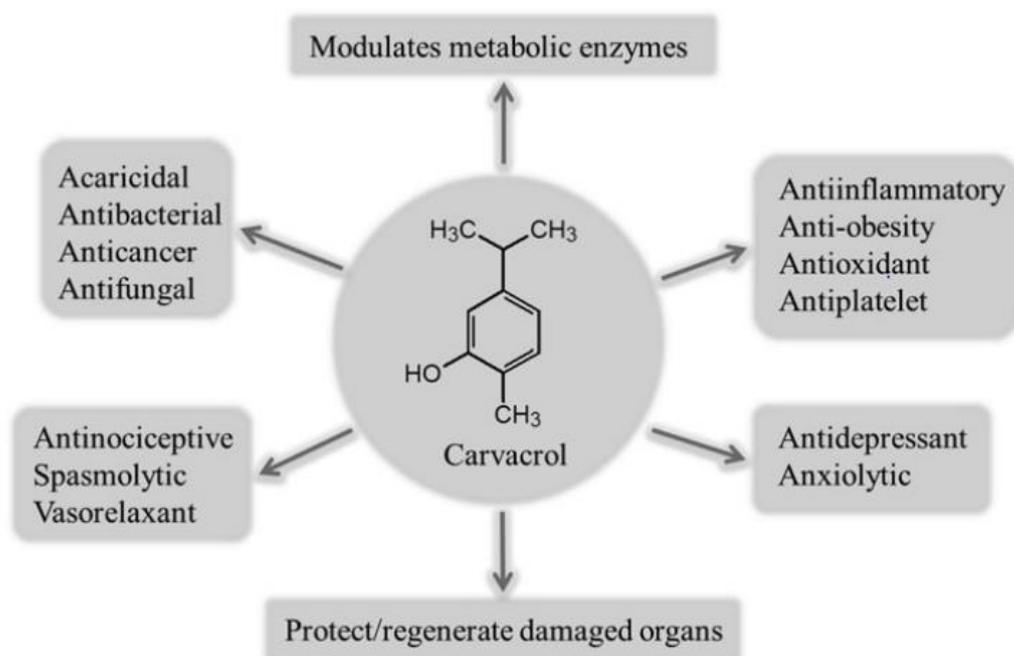


Figure 11 : Carvacrol, structure moléculaire et ses multiples propriétés biologiques (Vokou et al., 1993 ; Ultee et al.,2002 ; Burt, 2004).

III .4. Carvacrol et protéines Kinase

Carvacrol induit l'apoptose mitochondriale dans les cellules cancéreuses du côlon en modifiant l'expression des protéines pro- et antiapoptotiques telles que Bax, lymphome à cellules B 2 (Bcl-2) et la protéine kinase activée par un agent mitogène (MAPK) (Fan et al ., 2015). De même, il augmente le rapport Bax sur Bcl-2 et l'activation des caspases, et induit la libération de cytochrome c dans des cellules de cancer du sein métastatique humain (Arunasree, 2010).

Egalement, cette molécule a exercé des effets antiprolifératifs par la suppression de la signalisation PI3K-AKT et MAPK, en générant un stress oxydatif et en altérant l'homéostasie calcique médiée par un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules de choriocarcinome humain JAR et JEG3 (figure 12) (Zhai et al., 2016).

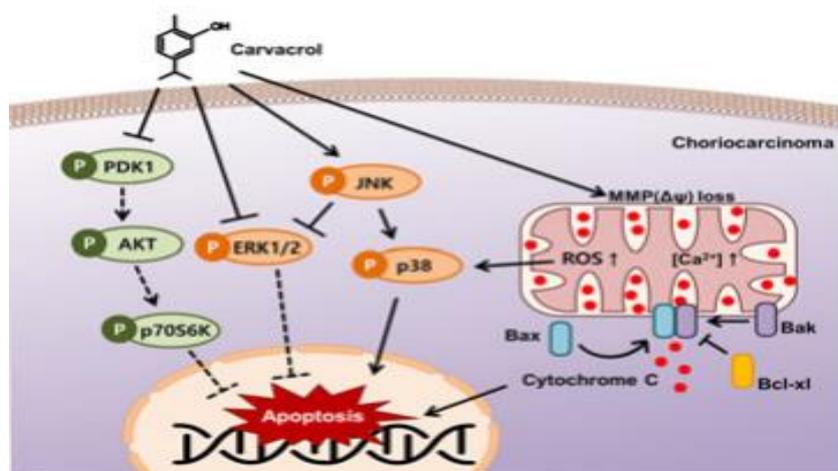


Figure 12 : Modèle hypothétique des mécanismes anticancéreux induits par le carvacrol dans les cellules de choriocarcinome humain (JAR et JEG3) (Guimarães et al., 2015). AKT : protéine kinase B ; Bcl : lymphome à cellules B ; ERK : signal extracellulaire régulé par la kinase ; JNK : c-Jun N-terminal kinase ; MMP : potentiel de membrane mitochondriale ; ROS : espèces réactives de l'oxygène.

D'après la **figure 12**, le carvacrol active les voies de signalisation JNK et P38, mais inactive les voies de signalisation AKT et ERK1/2, favorisant l'apoptose et réduisant la viabilité cellulaire. En outre, il augmente la production de ROS et les concentrations d'ions calcium dans la matrice mitochondriale en perturbant la MMP ($\Delta\psi$) dans les cellules JAR et JEG3. En outre, le carvacrol induit l'expression de la protéine cytosolique Bax et de la protéine membranaire mitochondriale Bak, ce qui entraîne la libération du cytochrome c des mitochondries.

De ce fait, le carvacrol induit la mort cellulaire dans les cellules de choriocarcinome en perturbant la fonction mitochondriale, en supprimant la voie PI3K-AKT et en activant les signaux cellulaires JNK et P38 MAPK (Guimarães et al., 2015).

Le carvacrol nécessite encore des recherches supplémentaires en termes d'études précliniques pour son application clinique contre le choriocarcinome (Guimarães et al., 2015). Par conséquent, le carvacrol pourrait être un nouvel agent thérapeutique ou un complément pour le traitement du choriocarcinome.

En conclusion, l'utilisation de produits dérivés de sources naturelles, en particulier de métabolites végétaux, s'est développée dans le domaine de la médecine. Récemment, le carvacrol et le thymol monoterpènes cycliques, composés parfumés des plantes aromatiques présentent des effets efficaces pour la lutte contre les cancers ce qui ouvrirait un nouveau champ thérapeutique sur leur utilisation dans le processus cancéreux.

Chapitre 04 : Matériels et Méthodes

IV.1. Docking moléculaire

Le Docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules extraites, dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux ou plusieurs molécules. Les logiciels de Docking sont des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur. Une simulation de Docking comprend essentiellement deux étapes : le Docking proprement dit et le scoring (**Figure 13**) :

- **Le Docking** (la première étape) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- **Le Scoring** (la deuxième) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de Docking (**Figure 13**). Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées.

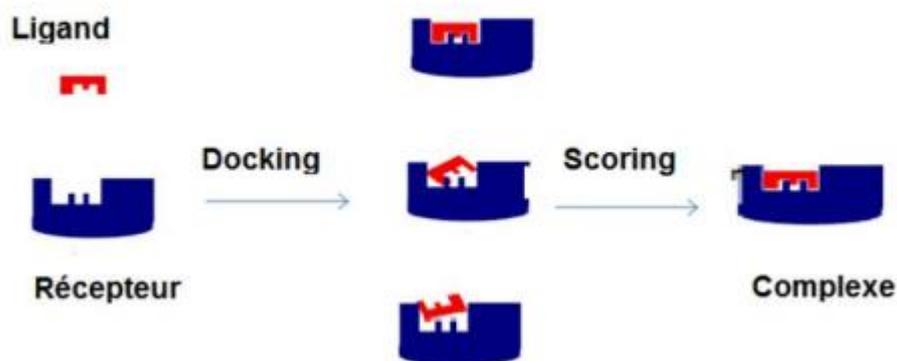


Figure 13 : Principe général de Docking moléculaire (**Chikhi and Bensegueni, 2010**).

IV. 2. Programmes de Docking

Le Docking moléculaire a pour objectif essentiel de prédire la conformation la plus favorable du ligand au sein de son récepteur. Initié au début des années 1980, ce domaine s'est développé pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs (**Bouchagra., 2018**).

Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible

biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée (Carlson, 2002).

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

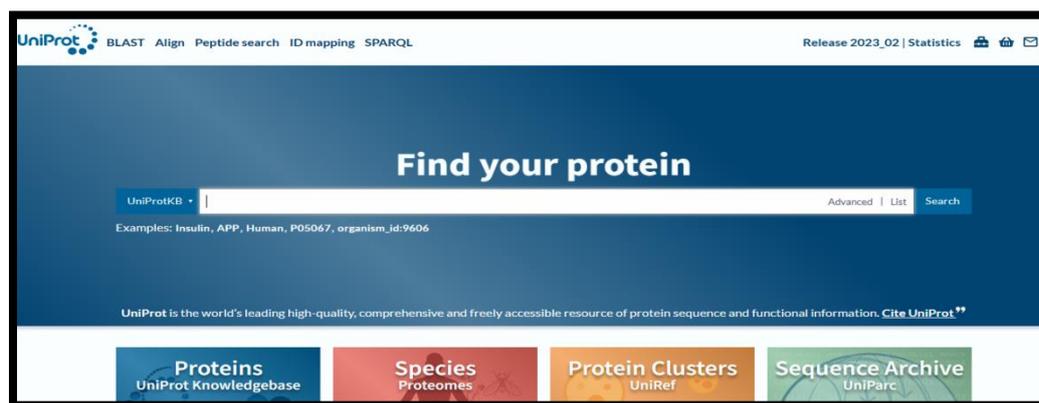
Tableau 1 : Principaux programmes de Docking moléculaire (Bouchagra., 2018)

IV.3. Outils du Docking moléculaires

IV.3.1. Matériels Biologiques

IV.3.1.1. Récepteur

Premièrement, nous allons à la Banque de données Uniprot (<https://www.uniprot.org>), pour télécharger le récepteur.



Pour cela nous avons suivi les étapes suivantes :

- Cliquer sur substances pour rechercher les sous-ensembles.
- Cliquer sur sous-ensembles pour rechercher stathmine (STAM 1 ; P16949).
- Télécharger les structures des ligands sous forme SDF.

Uniprot contient des milliers de structures protéiques déterminées soit par cristallographie (rayons X) ou par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire).

Stathmine, est disponible dans cette banque de données, la molécule répertoriée sous le code p-16949. Il s'agit de l'extrémité de STAM1-humain s'étendant de 149 acides aminés (**Figure14**).

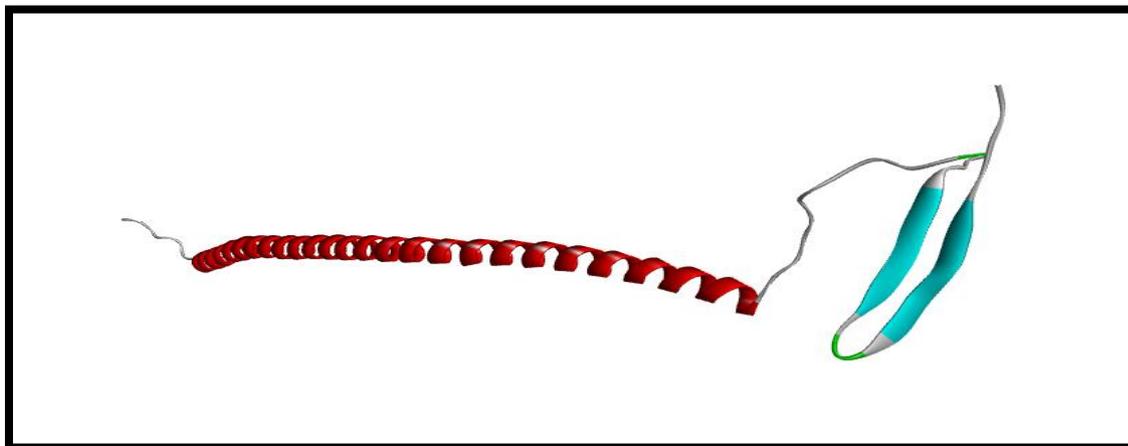


Figure 14 : Structure 3D de stathmine (STAM1 –HUMAIN)

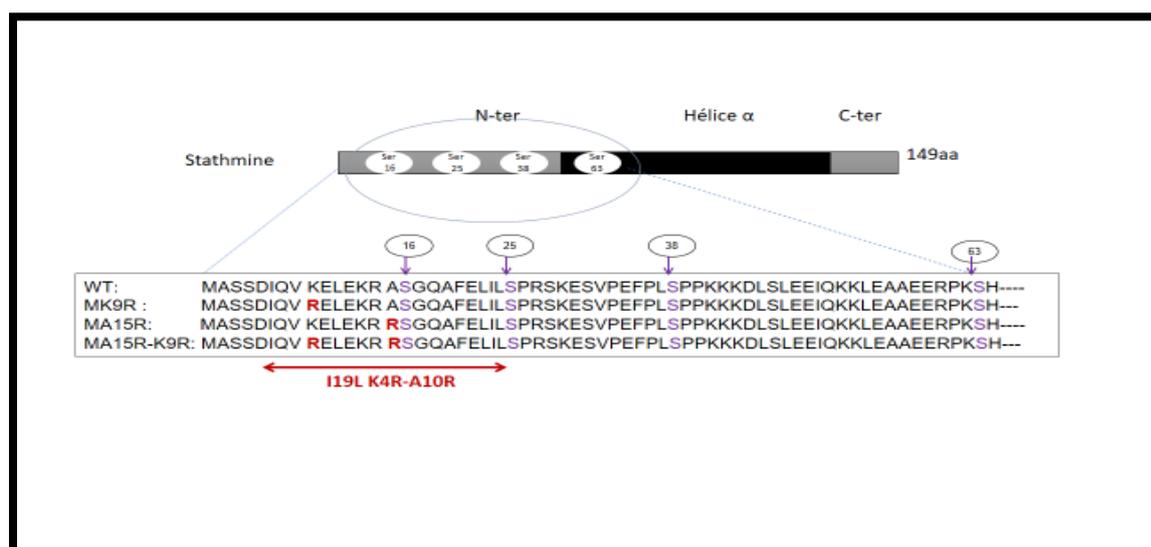
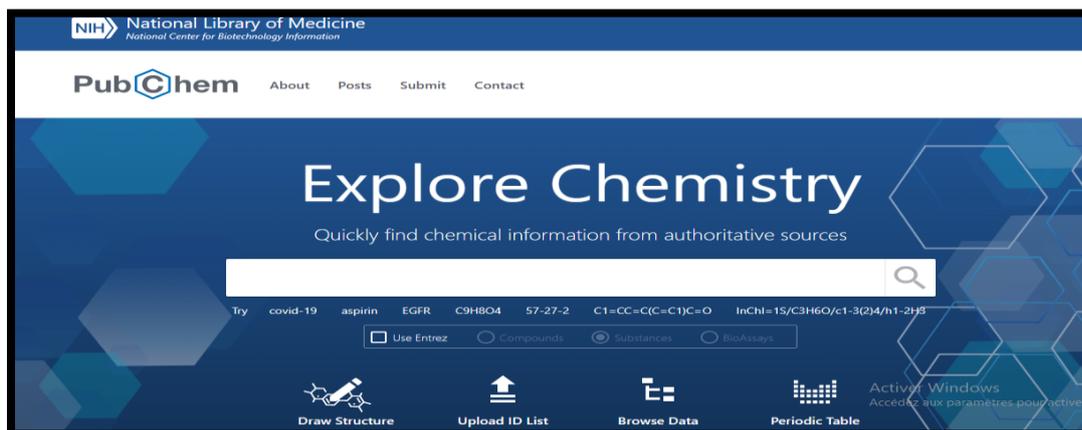


Figure 15 : Représentation schématique de la stathmine humaine et du peptide I19L dérivé du domaine N-terminal d'interaction de stathmine avec la tubuline décrit par (Clément et al, 2005 ; Tabet-Helal et al., 2014).

IV.3.1.2. Ligands

Les structures des ligands sont obtenues à partir du site PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)



Parmi les 277 ligands capables d'interagir avec le récepteur p16949, comme l'a révélé le screening moléculaire, nous avons retenu le carvacrol et le thymol dont la formule moléculaire est $C_{10}H_{14}O$ et le poids moléculaire : 150,22 g/mol. Ses structures chimique 2D et 3D sont données respectivement dans les (**Figure 16**), (**Figure 17**), (**Figure 18**), (**Figure 19**).

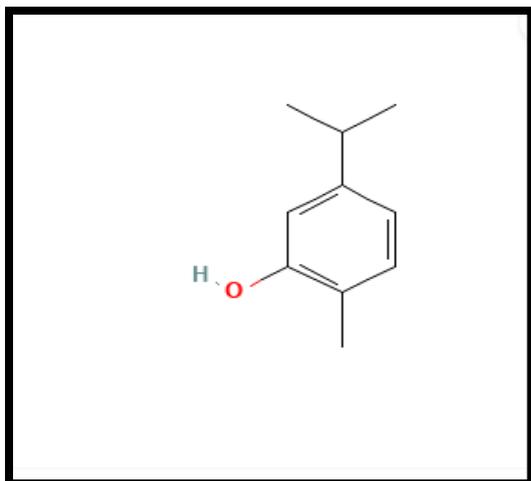


Figure 16 : Structure chimique 2D de carvacrol

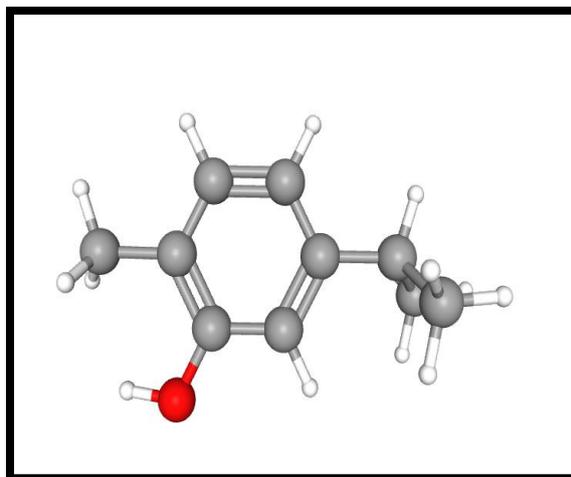


Figure 17 : Structure 3D de carvacrol

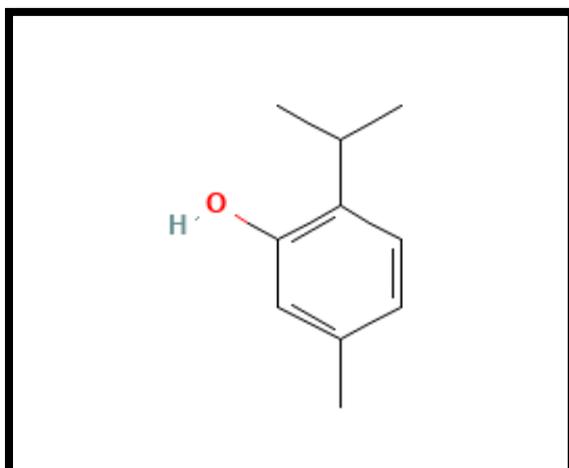


Figure 18 : Structure chimique 2D de Thymol

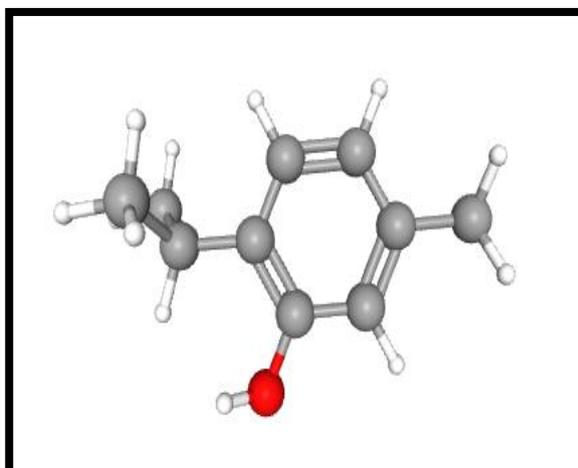


Figure 19 : Structure 3D de Thymol

Les Figures (**Figure 20**), (**Figure 21**), (**Figure 22**), (**Figure 23**) résument les informations concernant les ligands utilisés lors de cette étude.

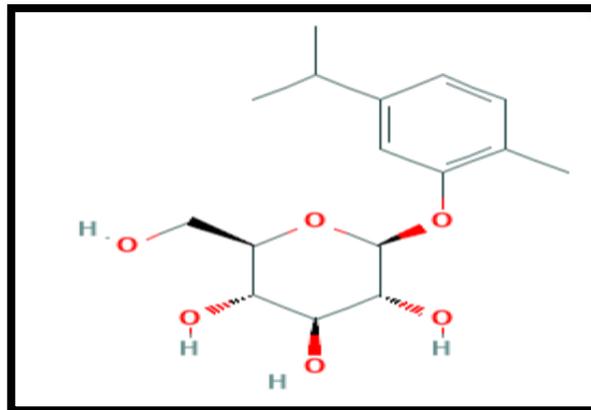
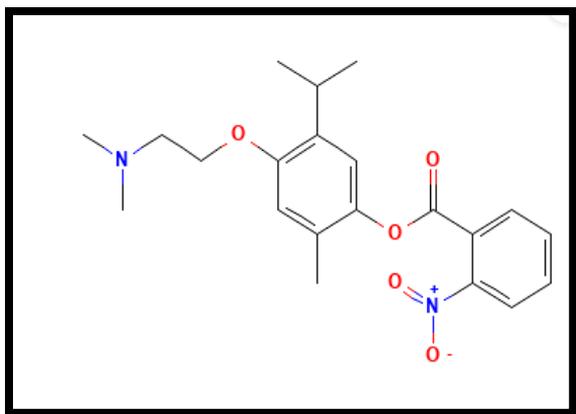


Figure 20 : Structure 2D de ligand 1 de Carvacrol **Figure 21** : Structure 2D de ligand 2 de Carvacrol

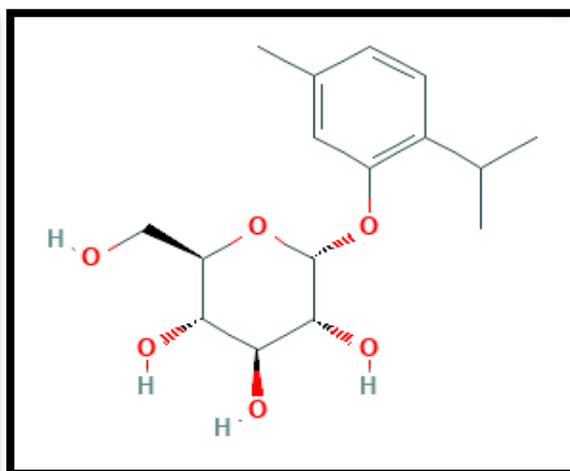
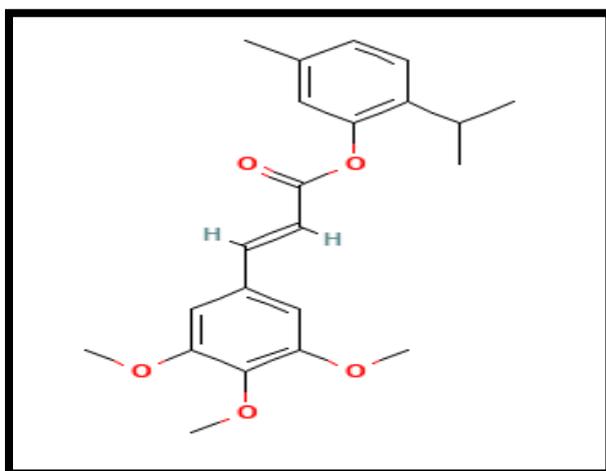


Figure 22 : Structure 2D de ligand 3 de Thymol **Figure 23** : Structure 2D de ligand 4 de Thymol

IV.4. Processus de Docking

Le processus d'amarrage ou Docking moléculaire est utilisé pour générer une liste de complexes représentant le mode de liaison favorable entre le ligand et le récepteur macromoléculaire. L'étape suivante consiste à estimer ces complexes, afin de trouver le ou les complexes les plus probables à reproduire au mieux le mode d'association réel. Nous avons utilisé les logiciels PyRx, Chimera et Biovia Discovery Studio2021 pour tester l'interaction ligand-récepteur.

IV.4.1. PyRx : est un logiciel gratuit open source doté d'une interface utilisateur intuitive qui s'exécute sur tous les principaux systèmes d'exploitation (Linux, Windows et Mac OS). Les étapes spécifiques d'utilisation de PyRx, ainsi que les considérations relatives à la préparation

des données, à l'ancrage et à l'analyse des données, sont également décrites (Sargis Dallakyan and Olson, 2015).

IV.4.2. UCSF Chimera : un programme gratuit de visualisation et pas sargis et ses collaborateurs d'analyses interactives des structures moléculaires et des données connexes, grâce à l'ajout de plusieurs services Web. En rationalisant l'accès aux services Web, y compris l'ensemble du processus de soumission, de surveillance et de récupération des tâches, Chimera permet aux utilisateurs de se concentrer plus facilement sur leurs projets scientifiques plutôt que sur la manipulation des données. D'une application de bureau dont les racines sont principalement dans l'analyse visuelle interactive (Huang et al., 2014).

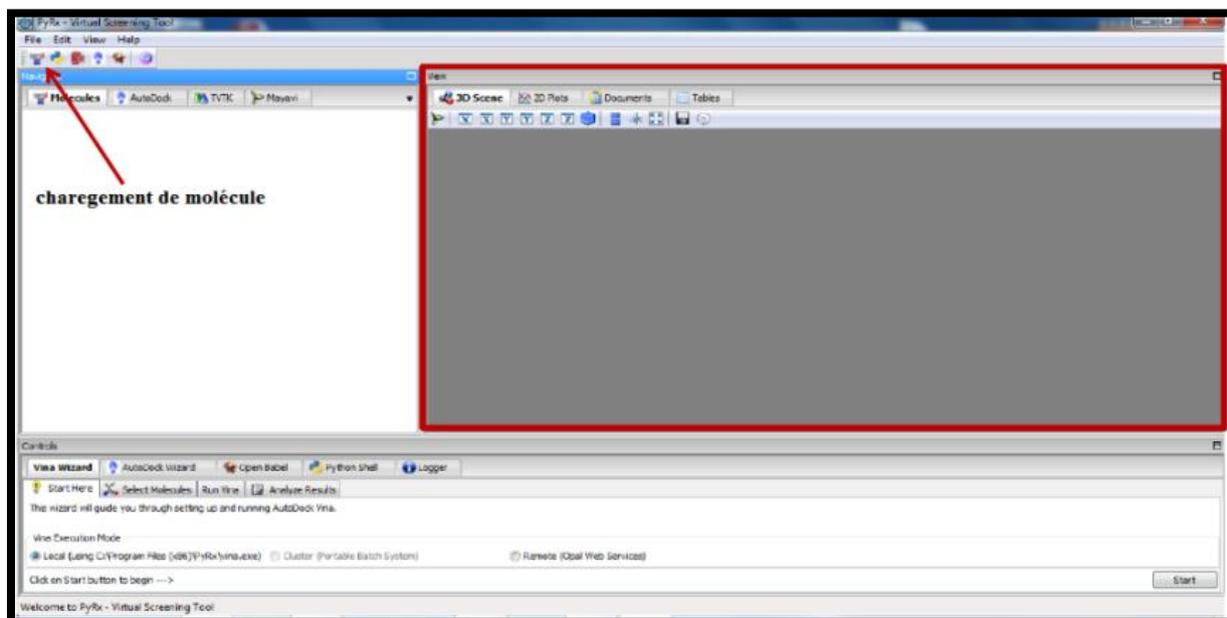
IV.4.3. Biovia Discovery Studio2021 : c'est un programme gratuit de visualisation et d'analyses interactives des structures moléculaires. De réunit plus de 30 ans de recherche évaluée par des pairs et de techniques silico de classe mondiale telles que la mécanique moléculaire, les calculs d'énergie libre, le développement biothérapeutique. Il fournit aux chercheurs un ensemble complet d'outils pour explorer les nuances de la chimie des protéines et catalyser la découverte de petites et grandes molécules thérapeutiques (Sukanya Panikar et al., 2021).

Le docking moléculaire sur PyRx se déroule selon les étapes suivantes :

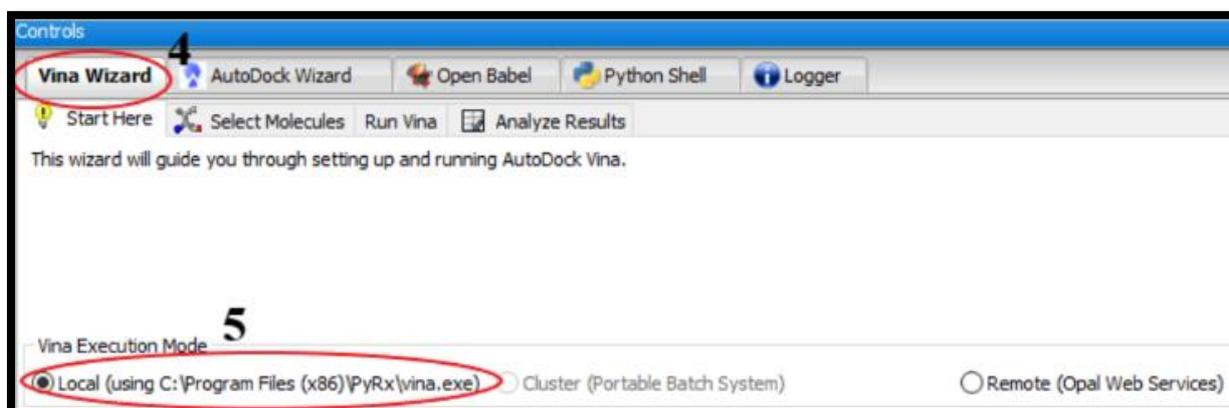
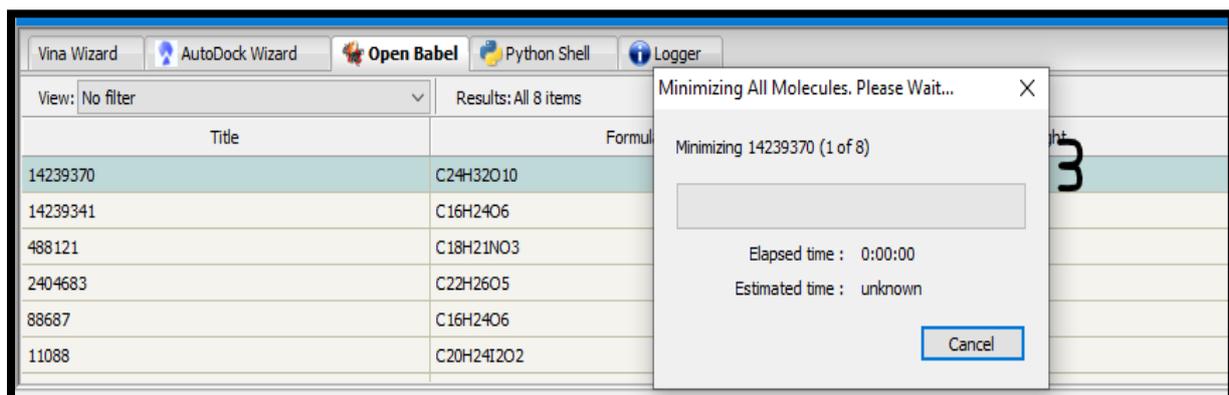
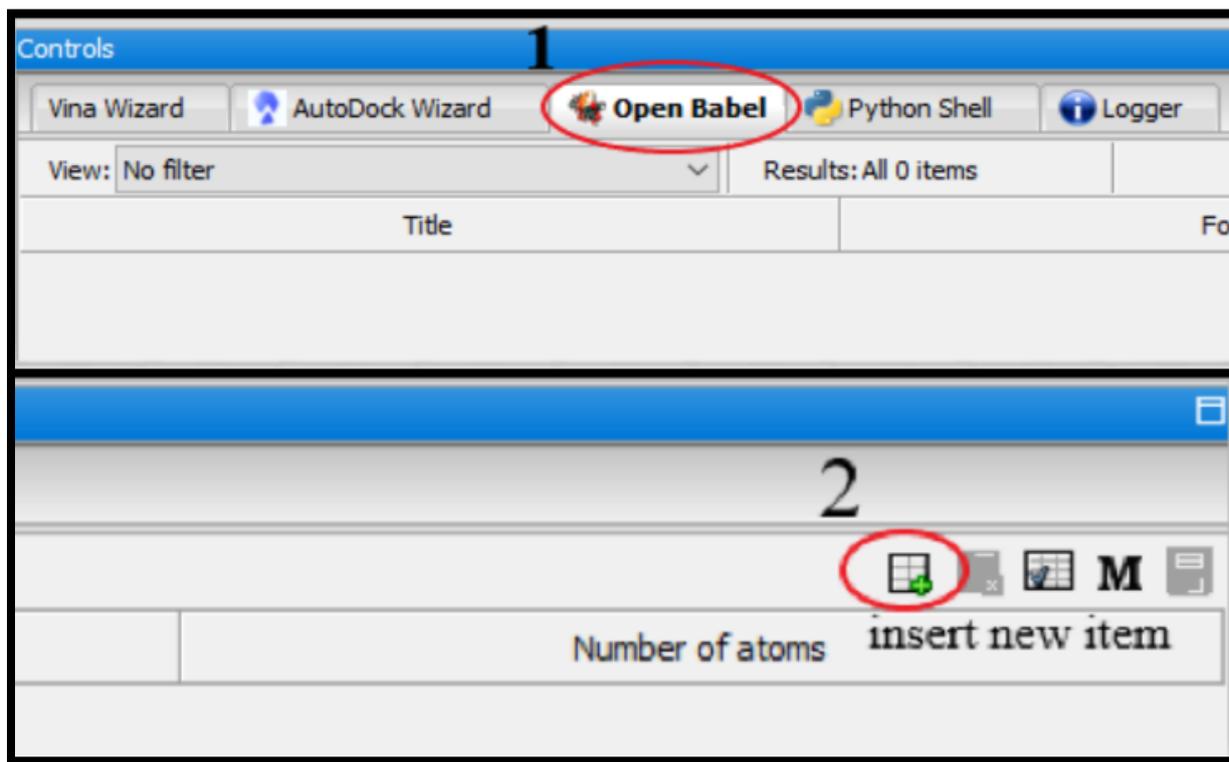
- Téléchargement de PyRx : <http://pyrx.sourceforge.net/downloads>

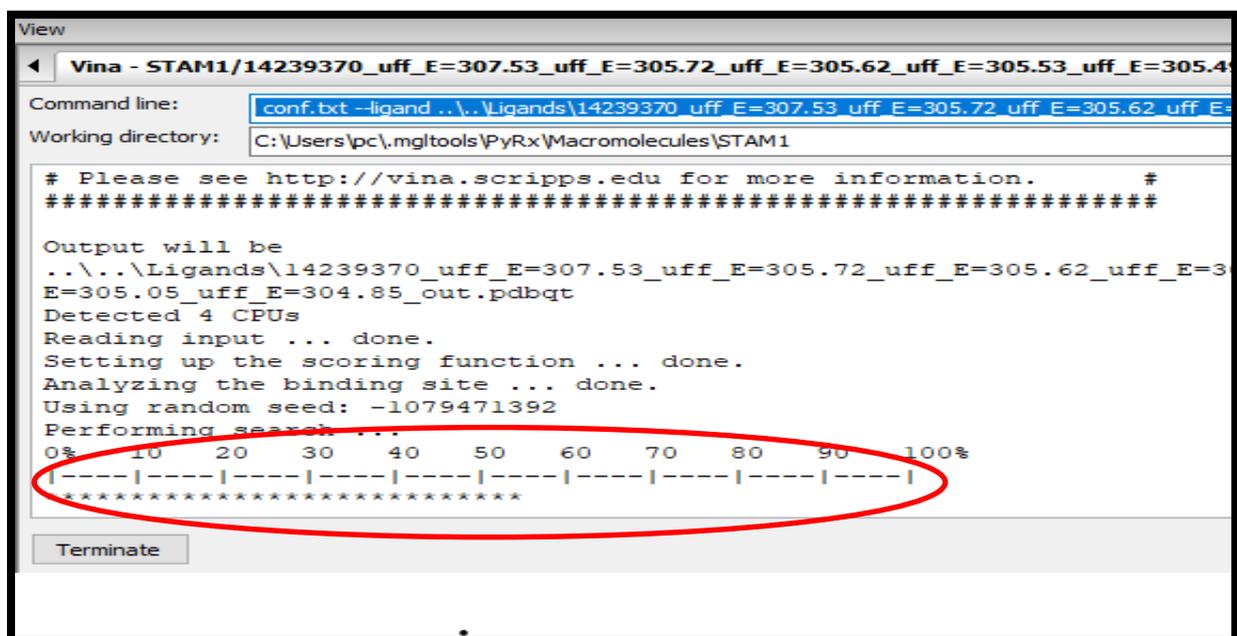
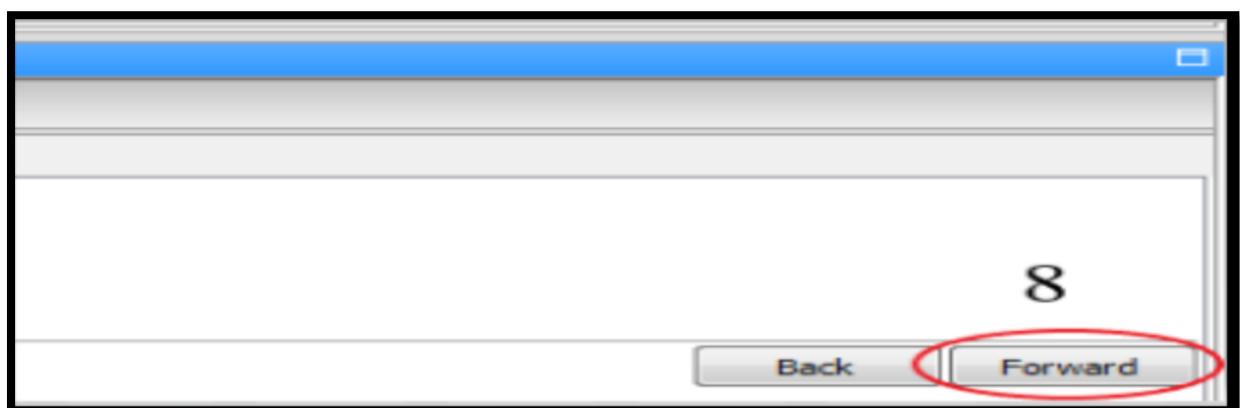
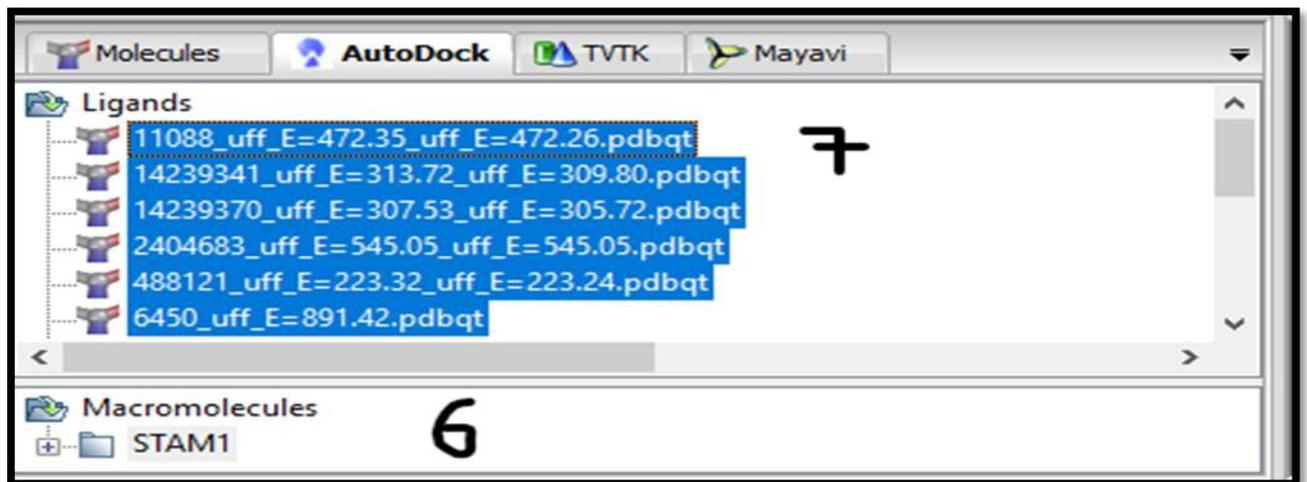


Chargement des molécules dans l'espace de travail PyRx



- Cliquer sur File puis sur Load Molecule et sélectionner le fichier p16949.
- Cliquer sur Open Babel/insert new item/ sélectionner la base de données FDA
- Cliquer droit et sélectionner Minimize All.
- Cliquer Vina Wizard \Rightarrow sélectionner Local /start /Add Macromolecule \Rightarrow sélectionner P16949
- Cliquer sur Open Babel puis cliquer droit sur les ligands et sélectionner Convert All to AutoDock Ligand (pdbqt).
- Cliquer sur le premier ligand et sur shift puis sur le dernier ligand pour sélectionner tous les ligands/et en fin sur forward.



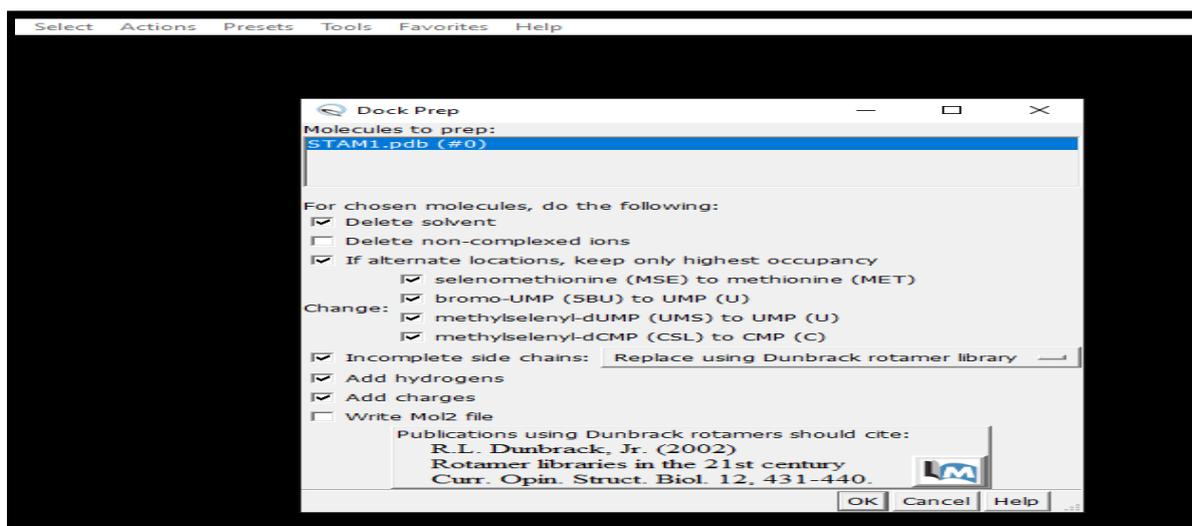
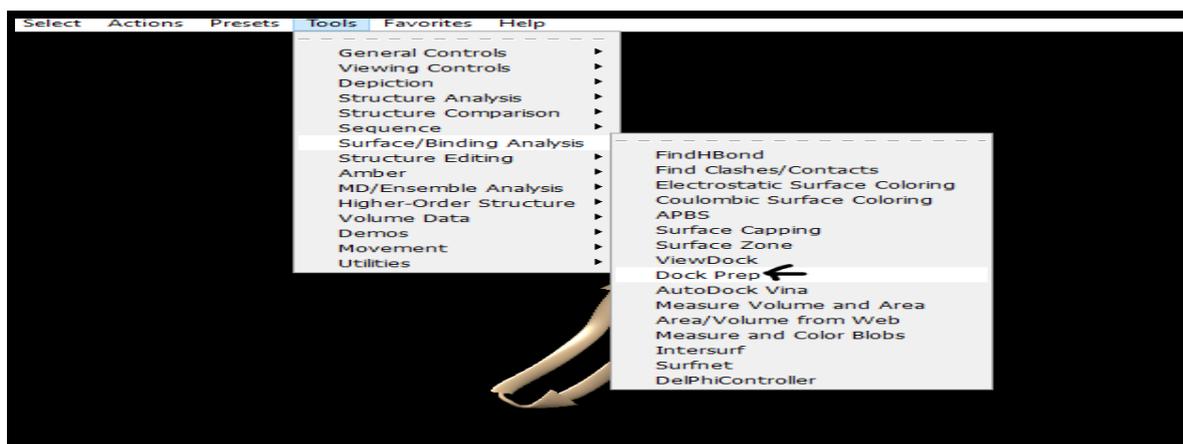


-Ensuite, on transforme le fichier de minimisation pdb en pdb.qt pour entrer dans un autre programme qui s'appelle Chimera.

Le Docking moléculaire se poursuit sur Chimera selon les étapes suivantes :

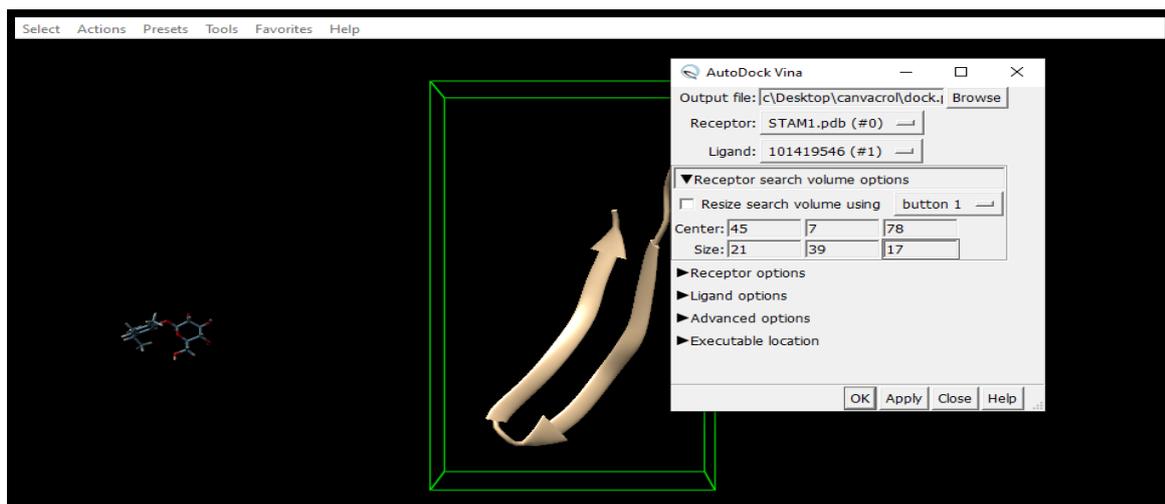
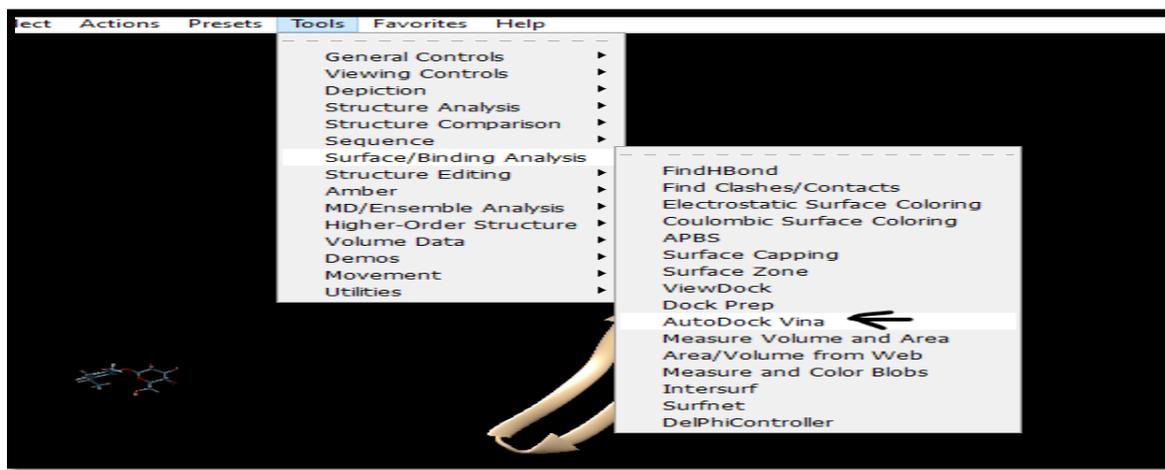
Préparation du récepteur

- _ Cliquer sur File puis Open pour ouvrir le fichier P16949.
- _ Cliquer sur Tools puis sur Surface/Binding Analysis / Dock prep.
- _ Dans Dock prep sélectionner toute les options sauf « Delete non-complexed » et « Write Mol2 file » / cliquer sur OK/OK/OK.



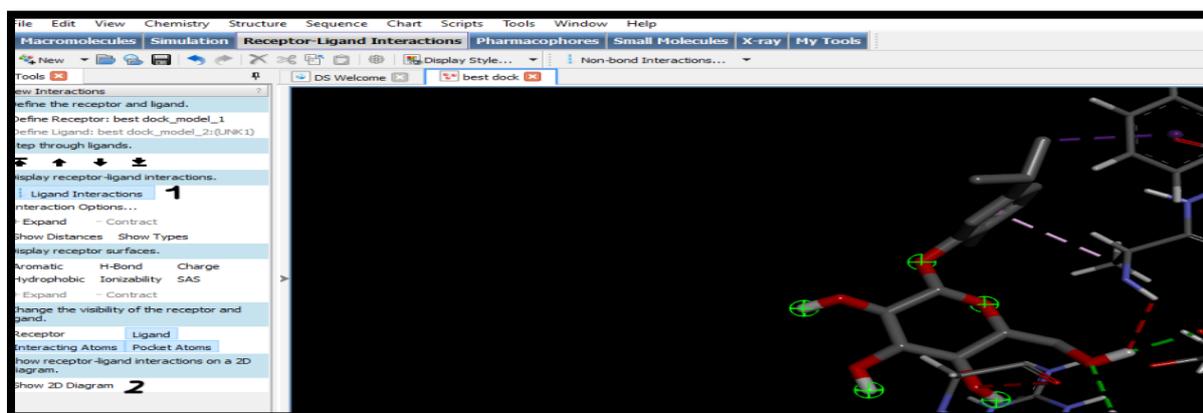
Préparation du ligand pour le Docking

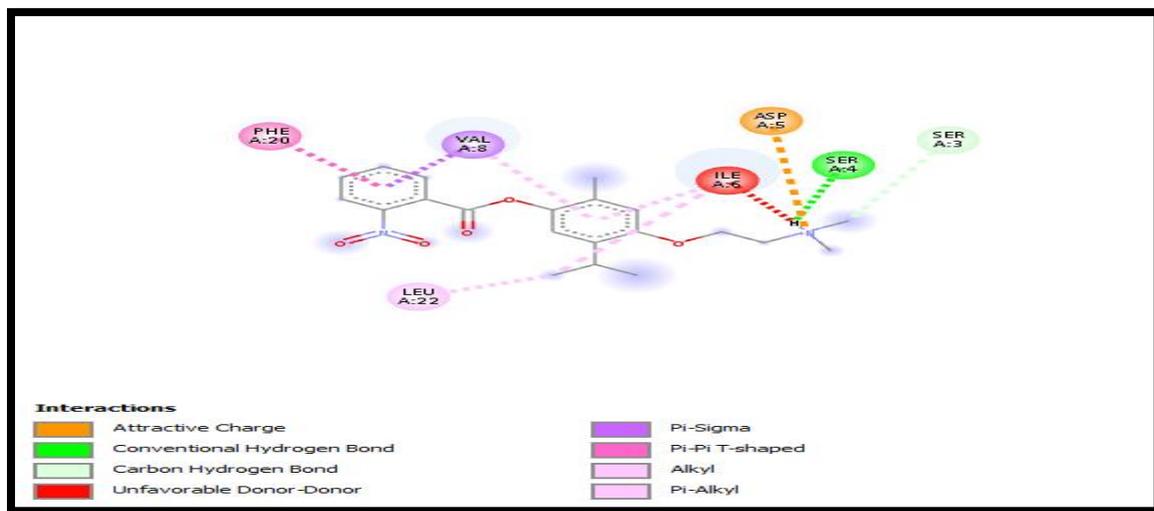
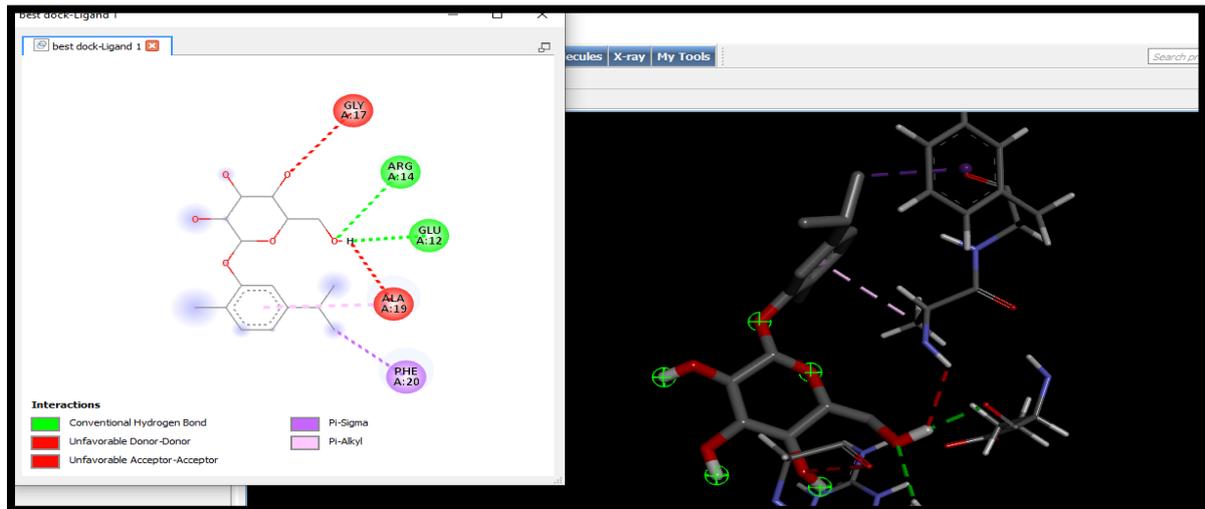
- _ Cliquer sur File puis Open/ dans notre cas le carvacrol (Ligand)
- _ Cliquer sur Tools/Surface/Binding Analysis/ AutoDock Vina.
- _ Dans AutoDock Vina cliquer sur Brose → nomer votre complexe/ sélectionner le récepteur et le ligand / cliquer sur button 1 et sur Resize search volume using
- _ Cliquer sur l'écran par la souris clic droit pour mettre le complexe sur une boîte et cliquer sur OK.



Préparation du récepteur / ligand

- _ Chargement des molécules dans l'espace de travail Biovia Discovery Studio2021 Client
- _ Cliquer sur Receptor-Ligand Interactions
- _ Dans Display receptor-ligand interactions cliquer sur Ligand Interactions / Show 2D Diagram





Chapitre 05 : Résultats et Discussions

V.1. Résultats du criblage moléculaire

Le screening moléculaire a permis de ressortir 277 molécules susceptibles de cibler la protéine stathmine (STAM1) en interagissant avec son extrémité N-terminale.

Les meilleurs scores selon ΔG sont donnés dans le tableau 2. Le Thymol 2^{ème} position et, Carvacrol est en 3^{ème} position selon son affinité d'interaction estimée par l'énergie de liaison. Le ΔG ou enthalpie libre ou encore énergie libre de Gibbs, est une fonction d'état introduite par Willard Gibbs. Elle correspond à l'énergie disponible dans une réaction pour effectuer un travail utile et est différente du changement d'énergie total d'une réaction et principe d'évolution des réactions physico-chimiques (Reichle, 2020).

Ligands/code de PubChem	Energie	ΔG (kcal/ml)
Thymol		
88687	E=306.90	-4.9
2404683	E=545.05	-4.9
488121	E=223.32	-4.7
14239341	E=313.72	-4.5
14239370	E=307.53	-4.2
Carvacrol		
101419546	E=299.87	-5.5
100938431	E=562.53	-4.9
52436	E=541.69	-4.7
139146195	E=357.43	-4.8
129832427	E=326.81	-4.5

Tableau 2 : Meilleurs scores ΔG révélés par le screening moléculaire.

V.2. Résultats du Docking moléculaire

Après quelques minutes de docking avec UCSF Chimera, s'ouvrir « ViewDock » et affiche la liste tabulaire des poses (score, RMSD...etc.) (Figure 23), (Figure 24).

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.
V	-4.5	0.0	0.0
V	-4.5	10.347	15.378
V	-4.4	1.025	2.979
V	-4.3	11.009	14.138
V	-4.3	10.981	14.298

Chimera Model #3.1

```
REMARK VINA RESULT:      -4.5      0.000      0.000
REMARK 9 active torsions:
REMARK status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)
REMARK 1 A between atoms: O1_1 and C3_10
REMARK 2 A between atoms: O1_1 and C10_17
REMARK 3 A between atoms: O2_2 and C8_15
REMARK 4 A between atoms: O2_2 and C15_22
REMARK 5 A between atoms: N1_6 and C11_18
```

Change Compound State

Viable Deleted Purged

Hide Quit Help

Figure 24 : Les scores donnés par UCSF Chimera (Thymol)

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.
V	-4.5	0.0	0.0
V	-4.5	1.027	2.927
V	-4.4	10.462	15.391
V	-4.3	3.968	9.29
V	-4.3	10.137	14.954

Chimera Model #3.1

```
REMARK VINA RESULT:      -4.5      0.000      0.000
REMARK 9 active torsions:
REMARK status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)
REMARK 1 A between atoms: O1_1 and C3_10
REMARK 2 A between atoms: O1_1 and C10_17
REMARK 3 A between atoms: O2_2 and C8_15
REMARK 4 A between atoms: O2_2 and C15_22
REMARK 5 A between atoms: N1_6 and C11_18
```

Change Compound State

Viable Deleted Purged

Active Windows

Figure 25 : Les scores donnés par UCSF Chimera (Carvacrol)

Pour mesurer les distances inter-atomiques on utilise fréquemment une grandeur appelée écart quadratique moyen (RMSD - "Root Mean Square Deviation", en Å) entre les coordonnées spatiales des atomes des acides aminés appariés.

La lecture de fichier pdb par «Discovery studio visualizer » permet la visualisation du mode et le type d'interaction entre la meilleure conformation de ligand et leur récepteur (**Figure 26**), (**Figure 27**).

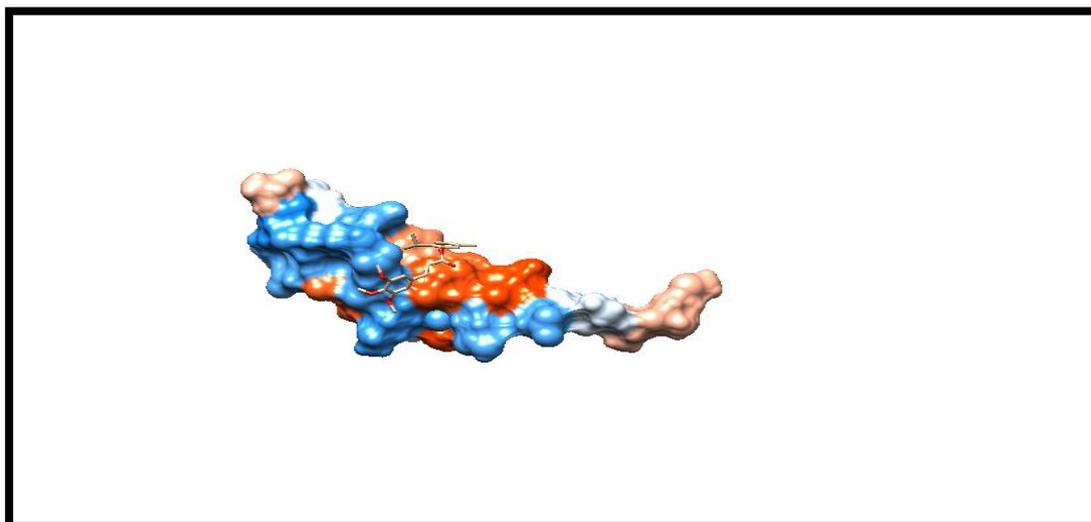


Figure 26 : Complexe STAM1 -Thymol

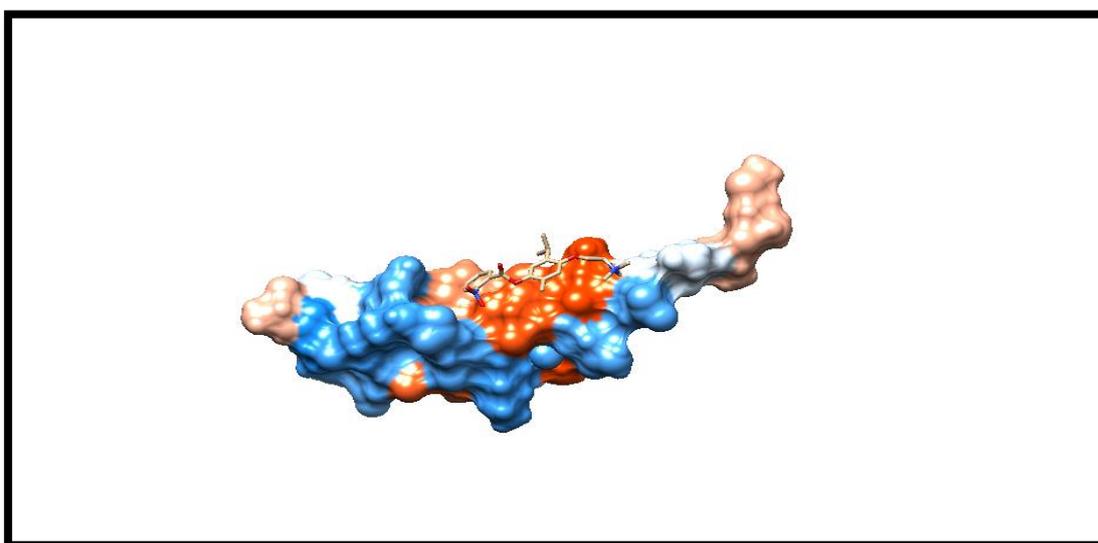


Figure 27 : Complexe STAM1 -Carvacrol

V.2.1. L'interaction de STAM1 Wild Type et Thymol, Carvacrol

V.2.1.1. Contacts rapprochés (Close contacts)

Nous intéressent la connaissance des différentes interactions mises en jeu entre les deux entités chimiques. La schématise les différentes interactions obtenues lors de la simulation. Avec le logiciel Discovery Studio **la Figure 28** et **la Figure 29**.

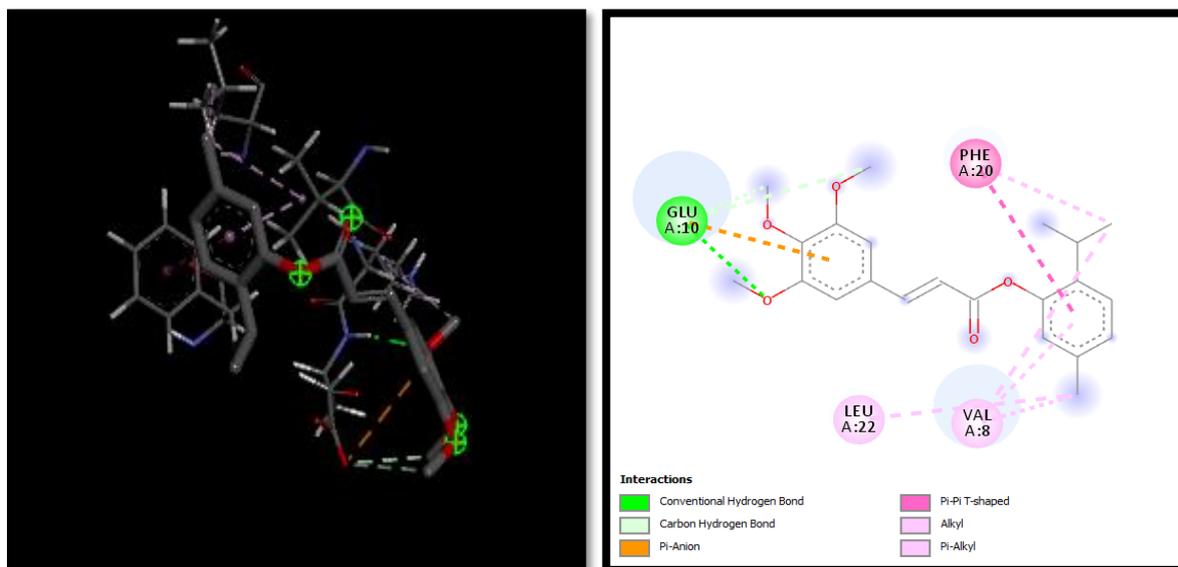


Figure 28 : Les interactions entre le site actif de STAM1 et le ligand 2 de Thymol.

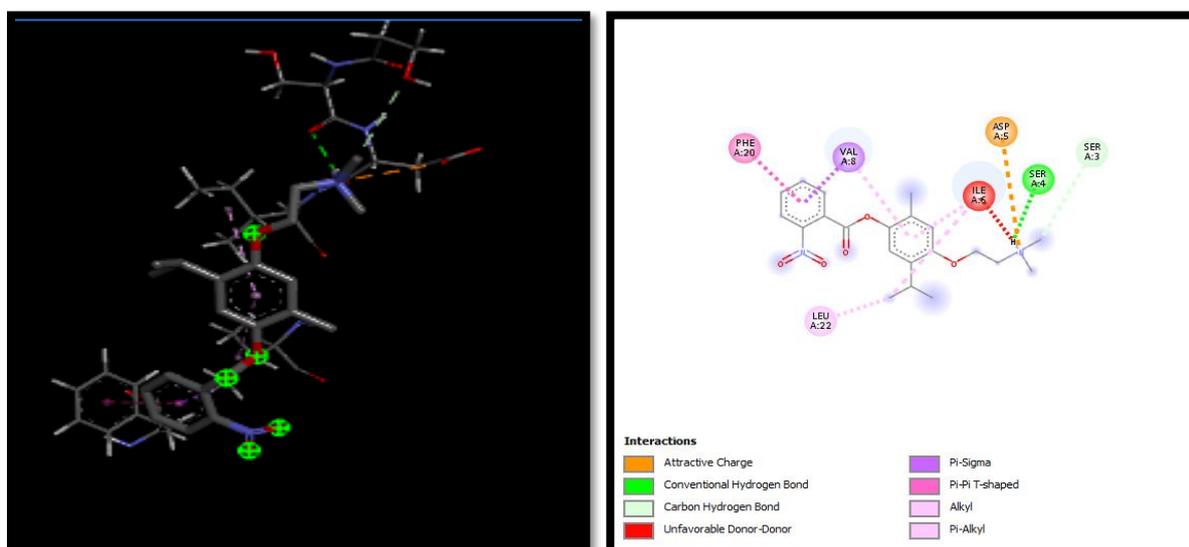


Figure 29 : Les interactions entre le site actif de STAM1 et le ligand 3 de Carvacrol.

V.2.1.1.1. Liaisons Hydrogènes

Concernant ces interactions qui sont et qui jouent le rôle le plus important en biologie et le domaine du vivant.

- **Liaisons hydrogène conventionnelles : H-Bon**

Tableau 3 : Interactions H-Bond entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
2	GLU 10

Tableau 4 : Interactions H-Bond entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
3	SER 4

-Une liaison hydrogène formée entre N –ter de la stathmine et le résidu Sérine en position 4, du carvacrol (**figure 29**). Une liaison hydrogène résidu glutamique en position 10 du Thymol (**figure 28**). La liaison hydrogène est une liaison chimique non covalente de type dipôle-dipôle entre 2 molécules ou entre 2 groupements d'une molécule. Elle joue un rôle stabilisateur de la structure secondaire des macromolécules biologiques (Elie, 2004).

- **Carbone-Hydrogène bond**

Tableau 5 : Carbone H-Bond interaction entre le ligand 3 Carvacrol et le STAM1.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
3	SER 3

V.2.1.1.2. Interactions Hydrophobiques

Les interactions de ce type jouent un rôle essentiel dans la stabilisation des complexes. Ce sont des interactions non covalentes de type hydrophobique.

- **Pi-Pi Staked**

Les interactions de type Pi-Pi sont des interactions hydrophobiques qui mentionnent la stabilité des complexes et jouent un très grand rôle dans le domaine du vivant.

Tableau 6 : Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
2	PHE 20

Tableau 7 : Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
3	PHE 20

- Une liaison pi-pi empilée (empilement pi) entre le ligand et l'acide aminé phénylalanine en Position 20 du STAM1 (**figure 28**) et (**figure 29**).

- **Pi-Alkyl**

Tableau 8 : Pi-Alkyl interaction entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
2	VAL 8
	PHE 20
	LEU 22

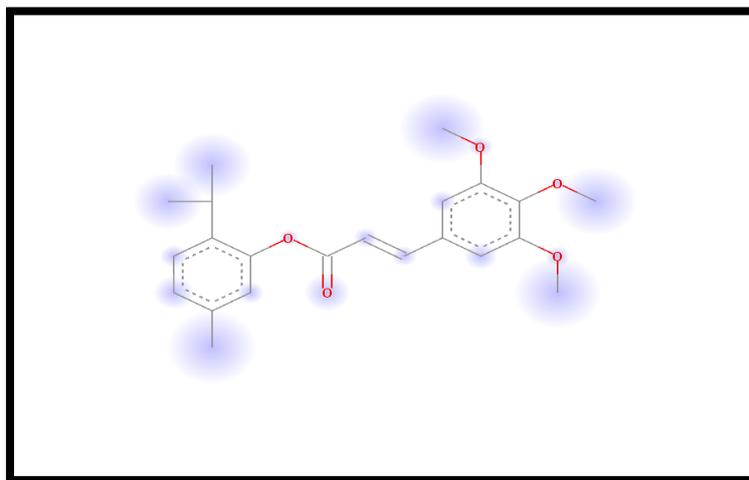
Tableau 9 : Pi-Alkyl interaction entre le ligand3de Carvacrol et le STAM1.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
3	ILE 6
	VAL 8
	LEU 22

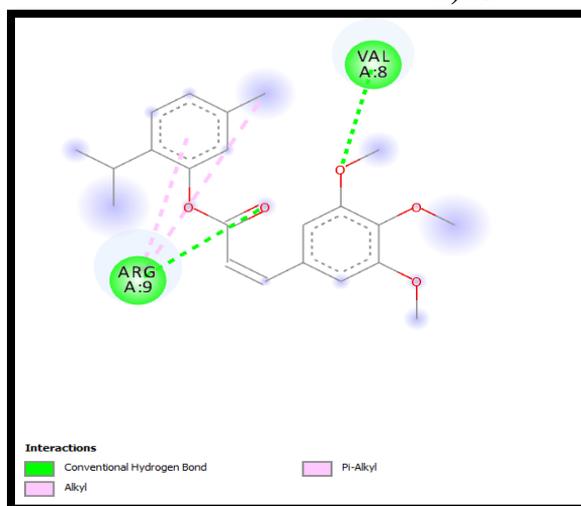
- 4 liaisons pi alcaline entre le ligand et le résidu L'isoleucine en position 6, valine en position 08 et leucine en position 22 du Carvacrol (**figure 29**). Les 5 liaisons pi alcaline entre le ligand et le résidu leucine en position 22, valine en position 08, phénylalanine en position 20 du Thymol (**figure 28**). La liaison pi alcaline est une liaison chimique covalente qui est créé entre deux atomes. Sa présence toute libre rotation autour de cette liaison, car elle entraîne une rigidité moléculaire (Allen et al., 2001).

V.2.2. L'interaction de STAM1 mutée et Thymol, Carvacrol

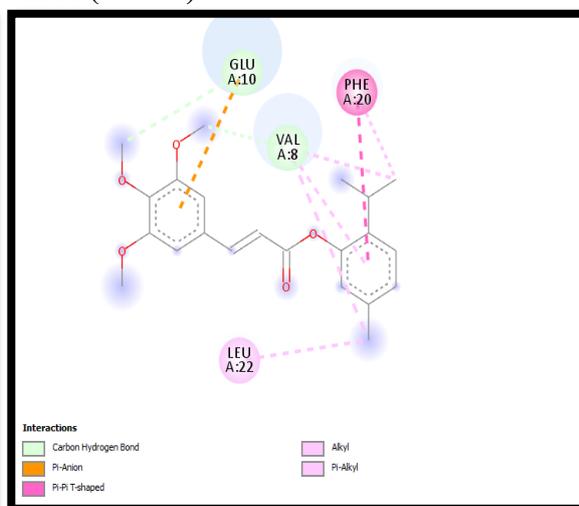
La schématise les différentes interactions obtenues lors de la simulation. Avec le logiciel Discovery Studio la **Figure 30** et la **Figure 31**.



a). STAM1 mutée (A15 R)

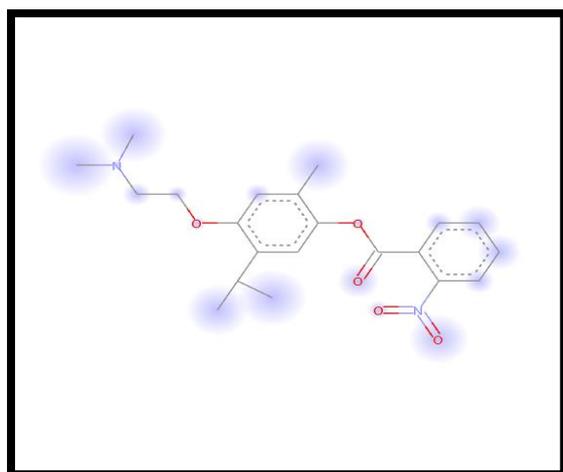


b). STAM1 mutée (K9R -A15 R)

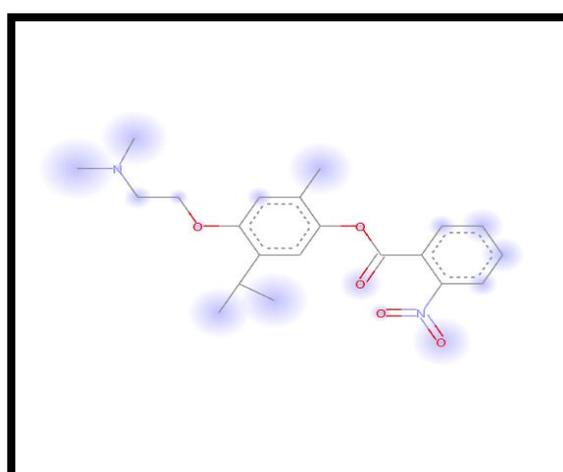


c). STAM1 mutée (K9R)

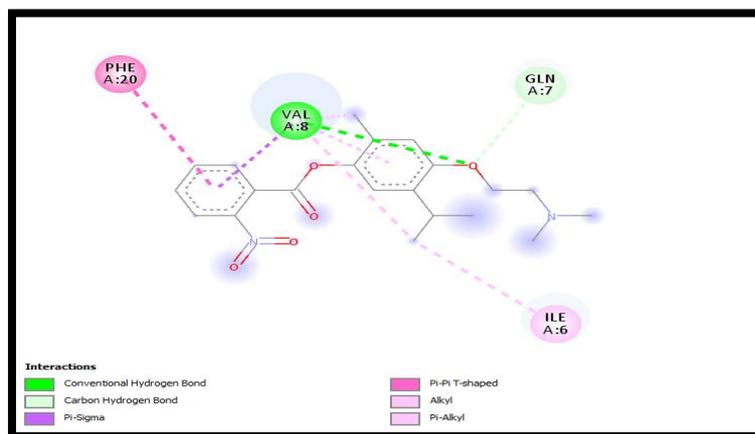
Figure 30 : Les interactions entre le site actif de STAM1 mutée et le ligand 2 de Thymol



a). STAM1 mutée (K9R -A15 R)



b). STAM1 mutée (A15 R)



c). STAM1 mutée (K9 R)

Figure 31 : Les interactions entre le site actif de STAM1 mutée et le ligand 3 de Carvacrol

V.2.2.1-Liaisons Hydrogènes

- Liaisons hydrogène conventionnelles : H-Bond

Tableau 10 : Interactions H-Bond entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1 mutée.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
2	VAL 8, ARG 9

Tableau 11 : Interactions H-Bond entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1 mutée.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
3	VAL 8

- Une liaison hydrogène formée entre N –ter de la STAM1 mutée (K9R) et le résidu valine en position 08, du Carvacrol (Figure31). Deux liaisons hydrogène et le résidu valine en position 08, arginine en position 09, du Thymol (Figure 30).

- Carbone-Hydrogène bond

Tableau 12 : Carbone H-Bond interaction entre le ligand 2 Thymol et le STAM1 mutée.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
-----------	---------------------------------------

2	GLU 10, VAL 8
---	---------------

Tableau 13 : Carbone H-Bond interaction entre le ligand 3 Carvacrol et le STAM1 mutée.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
3	GLN 7

V.2.2.2-Interactions Hydrophobiques

- Pi-Pi Staked

Tableau 14 : Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1 mutée.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
2	PHE 20

Tableau 15 : Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1 mutée.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
3	PHE 20

- Une liaison pi-pi empilée (empilement pi) entre le ligand et l'acide aminé phénylalanine en Position 20 du STAM1 mutée (K9R) (**figure 30**) et (**figure 31**).

- Pi-Alkyl

Tableau 16 : Pi-Alkyl interaction entre le ligand 2 de Thymol et le STAM1 mutée.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
2	VAL 8
	PHE 20
	LEU 22

_ Le tableau 16, montre les trois acides aminés du site actif impliqués dans la formation des interactions hydrophobiques de type pi-Alkyl avec le ligand 2 du Thymol.

Tableau 17 : Pi-Alkyl interaction entre le ligand 3 de Carvacrol et le STAM1 mutée.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction
3	ILE 6, VAL 8

_Le tableau 17, montre deux acides aminés du site actif impliqués dans la formation des interactions hydrophobiques de type pi-Alkyl avec le ligand 3 du Carvacrol.

V.3. Discussions

La cellule cancéreuse est une cellule qui a perdu tout ou une partie de sa spécialisation et devenue insensible aux signaux antiprolifératifs et apoptotiques (**Ruddon, 2007**)

Grâce au développement de la biologie moléculaire des tumeurs, les progrès réalisés dans la détection et le traitement du cancer ont permis une réduction impressionnante de la mortalité et de la morbidité. Cependant, le cancer reste l'une des maladies les plus difficiles à traiter cliniquement (**Biao-xue et al., 2011**).

La stathmine, une phosphoprotéine cytosolique de 17 kDa, appartient à la famille des protéines Stathmine régulatrices des microtubules (MTs); qui comprennent la stathmine (stathmine 1), SCG10, SCLIP et RB3/RB3'/RB3', codées par quatre gènes différents (**Lachkar et al., 2010**).

La stathmine interagit avec la tubuline et régulent négativement l'assemblage des MTs en séquestrant la tubuline dans un complexe stable T₂S formé d'une molécule de stathmine et de deux hétérodimères α/β de tubuline sédimentant à 7,7 S. (**Jourdain et al., 1997**).

De nombreuses preuves indiquent que la stathmine a une fonction essentielle dans la différenciation neuronale et la division cellulaire et qu'elle est soumise à une phosphorylation régulée par le cycle cellulaire (**Jourdain et al., 1997**).

De point de vue structural, la stathmine est divisée en deux domaines : un domaine "régulateur" terminal NH₂ contenant plusieurs sites de phosphorylation et un domaine "interaction" COOH-terminal avec une structure en hélice α (**Curmi et al., 1999**).

Stathmine, également connue sous le nom de Op18, stathmine 1 ou métablastine est régulée à la hausse dans certains cancers (**Rana et al., 2008; Nie et al., 2015**) et est en corrélation avec la différenciation, la prolifération et la migration des cellules (**Sonego et al., 2013; Reyes et al., 2015**).

La phosphorylation de la stathmine augmente pendant le passage de la phase G à la phase S et pendant la transition de la phase G2 à la mitose dans de nombreux types de cellules comme les cellules leucémiques (**Luo et al., 1994**) les cellules Jurkat (**Brattsand et al., 1994**) ou les cellules HeLa (**Bièche et al., 2003**).

La partie N-terminale de la stathmine est le domaine régulateur de la stathmine. Cette région comporte quatre domaines de phosphorylation dans cette région, désignés comme Ser 16, 25, 38 et 63 (**Belletti and Baldassarre, 2011**), qui sont en étroite corrélation avec les fonctions de la stathmine par les kinases impliquées dans les principaux processus intracellulaires.

Bien que, la région N-terminale toute seule est capable de dépolymériser le réseau des MTs dans les cellules interphasiques et de s'opposer à l'assemblage du fuseau mitotique (**Segerman et al., 2003**), le peptide I19L,(IQVKELEKRASGQAFELIL) dérivé du domaine N-terminal de la stathmine correspond à la région repliée en une structure "β-hairpin" observée dans les cristaux T₂S (complexe composé d'une stathmine (S) et de deux hétérodimères de tubuline (T)), adopte à lui seul une structure "β-harpin" sophistiquée en contact avec la tubuline en solution (**Clément et al., 2005**).

A ce jour, on ne sait pas si elle est cause ou conséquence du phénotype cancéreux. Son activité vis-à-vis des MTs est régulée négativement par sa phosphorylation sur ses quatre résidus serine par différentes protéines kinase en réponse à différents stimuli, elle peut être ainsi une cible intéressante pour la conception de médicaments, car le ciblage de cette protéine pourrait inhiber simultanément plusieurs aspects de la progression tumorale.

Le thym « *Thymus vulgaris* » est une plante médicinale appartenant aux Lamiacées ; est connue pour produire une variété de monoterpènes phénoliques cycliques, une classe de terpènes constitués de deux unités d'isoprène et dont la formule moléculaire est C₁₀H₁₆ tels que (le thymol et le carvacrol) (**Nickavar, 2005**).

Le thymol et le carvacrol sont des composés importants pour la médecine en raison de leurs propriétés antioxydantes, antitumorales et antimicrobiennes, et ont été considérés comme les

principaux constituants de l'huile essentielle (HE) du « *Thymus vulgaris* » (Höferl et al., 2009; Rodríguez et al., 2013)

A partir de ces données, dans notre travail nous avons étudié *in silico* par Docking moléculaire les effets des plus stables monoterpènes cycliques anti tumoraux de l'HE du « *Thymus vulgaris* » thymol et carvacrol (ligands) sur la stathmine (récepteur) WT (Wild Type) et mutée au niveau de sa partie N-terminale, les mutations proposées K9R/A15R/K9RA15R (travaux (TABET-HELAL et Curmi 2014) similaire aux mutations K4R/A10R/K4RA10R du peptide I19L (travaux Clément, Curmi et leurs collaborateurs en 2005).

Les résultats reflètent que le thymol présenterait des affinités de liaisons avec la stathmine qu'au niveau de sa partie N-terminale (1-24aa) : 10 liaisons chimiques, avec les résidus valine-8, glutamate-10, phénylalanine-20 et leucine-22 (figure 28).

Ainsi, le carvacrol se lie avec la stathmine au niveau de sa partie N-terminale (1-24) : 9 liaisons chimiques, avec les résidus sérine-3, sérine-4, aspartate-5, isoleucine-6, valine-8, phénylalanine-20 et leucine -22 (figure 29).

Cela indiquerait l'effet inhibiteur du carvacrol et du thymol sur son activité déstabilisatrice des MTs en se fixant sur la partie N-terminale, car ce domaine seul peut se lier à la tubuline, inhiber l'assemblage des MTs et accroître la fréquence des « catastrophes » (Segerman et al., 2003).

Les résidus phénylalanine-20 et leucine-22 interagissent avec la tubuline par des liaisons d'hydrogène, et des interactions entre les résidus valine-8 et leucine-22 par des liaisons hydrophobes consiste à la stabilisation de la structure (Clement et al., 2005).

Le carvacrol et le thymol se fixeraient sur la stathmine probablement pour inhiber son effet favorable sur la migration tumorale (dépolymérisation des MTs), cela est en accord avec des travaux indiquant que le carvacrol aboutit à une diminution d'expression des métalloprotéinases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9) et l'inhibition de l'invasion des cellules cancéreuses du côlon (Fan et al., 2015) , et que le thymol est capable d'inhiber la migration et l'invasion des cellules cancéreuses colorectales humaines type HT29 en réduisant l'activité des MMP-2 et MMP-9 et l'inhibition de l'EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) (Lv and Chen, 2018) ainsi que l'inhibition de la voie Wnt/ β caténine impliquée dans la tumorigénèse, la migration et l'invasion tumorales (Zeng et al., 2020).

Ou bien, le carvacrol et le thymol joueraient le rôle d'un fixateur sur la stathmine en bloquant son activité séquestrant de la tubuline, avant son inhibition totale par phosphorylation par des kinases dont certaines sont activées par le carvacrol ou le thymol.

Ces suggestions sont en accord avec des travaux qui ont montré que le carvacrol active les voies de signalisation JNK kinase (Guimarães et al., 2015) ; qui à son tour phosphoryle la stathmine (D C.H. Ng et al., 2010).

Dans la deuxième partie des travaux, des mutations proposées ont été faites au niveau de la partie N-terminale de Stathmine (1-24aa), il s'agit des stathmines mutées K9R, A15R, K9RA15R mises en interaction via le Docking moléculaire avec le thymol et le carvacrol.

Les résultats indiquent que le thymol présenterait une affinité d'interaction moins importante avec la stathmine mutée K9RA15R (4 liaisons), au niveau de la valine-8 et l'arginine-9 par rapport à la stathmine sauvage (Wild Type) (figure 30 b).

Néanmoins, le carvacrol n'aurait aucune affinité d'interaction avec la stathmine mutée K9RA15R (aucune liaison) (figure 31 a).

Puis, le thymol et le carvacrol ne présenteraient aucune interaction avec la stathmine mutée A15R (aucune liaison) (figures 30 a et 31 b).

Enfin, le thymol et le carvacrol présenteraient une affinité d'interaction avec la stathmine mutée K9R, 9 liaisons en présence du thymol en positions 8 (valine), 10 (glutamate), 20 (phénylalanine) et 22 (leucine), 8 liaisons en présence du carvacrol en positions 6 (isoleucine), 7 (glutamine), 8 (valine) et 20 (phénylalanine) (figures 30 c et 31 c).

Cela pourrait confirmer leur effet inhibiteur sur la stathmine, car la substitution de la lysine par une arginine au niveau du peptide I19L-K4R, similaire à la mutation K9R en partie N-terminale de la stathmine, contribuerait à renforcer la stabilité de l'interaction du peptide I19LK4R/tubuline et semblaient être les plus efficaces pour inhiber de la polymérisation de la tubuline (Tabet-Helal, 2014).

En conclusion, ces résultats permettent de suggérer que le thymol et le carvacrol se lient au niveau de la partie N-terminale, plus précieusement dans la structure « β harpin » observée dans le peptide I19L, ce qui empêcherait son association avec la tubuline et pourrait présenter un intérêt pour inhiber l'invasion tumorale *in vivo et in vitro*.

Conclusion et perspectives

La protéine stathmine déstabilisatrice des microtubules, est surexprimée dans plusieurs types de cancer, ce qui l'implique dans la prolifération et la migration des cellules tumorales.

Par conséquent, elle constitue une bonne cible thérapeutique dans le traitement des cancers.

Tous les monoterpènes anti-tumoraux étudiés pourraient jouer un rôle non négligeable dans les cancers médiés par la Stathmine. Cependant, les monoterpènes cycliques composants parfumés de la plante médicinale « *Thymus vulgaris* » semblent être un candidat optimal dans ce contexte.

Par une approche *in silico*, nous avons identifié 277 monoterpènes cycliques susceptibles d'interagir avec la stathmine. Nous en avons retenu deux, le thymol et le carvacrol présentant des affinités d'interaction avec la stathmine, plus précisément dans sa partie N-terminale.

Des mutations proposées au niveau de la partie N-terminale de la stathmine ont été faites afin d'analyser la stabilité et l'affinité de liaisons entre stathmine/carvacrol et stathmine/thymol.

Les résultats reflètent que le carvacrol présente 9 liaisons et le thymol 10 liaisons avec la stathmine, dans sa partie N-terminale, plus précisément la partie en structure « β -harpin" sophistiquée en contact avec la tubuline en solution et responsable de la stabilité du complexe T₂S.

Néanmoins, ces deux substances naturelles n'ont pas présenté des effets efficaces sur la liaison avec la stathmine mutée en partie N-terminale, stathmine K9R, A15R et K9RA15R.

À la lumière des données d'amarrage moléculaire, le thymol et le carvacrol semblent être des candidats potentiels pour cibler la stathmine et d'inhiber son activité séquestrant de la tubuline.

Cependant, des analyses de simulation moléculaire restent indispensables pour déterminer la stabilité de cette interaction au cours du temps. Toutefois, seuls des expériences réalisées *in vitro*, pourraient confirmer ou infirmer cette interaction et potentiellement l'effet inhibiteur notamment si l'on envisage utiliser ces composés naturels pour développer des molécules inhibitrices à des fins de recherche ou bien pour aller vers des candidats médicament.

Références bibliographiques

A

- Akhtar, J., Wang, Z., Jiang, W.P., Bi, M.M., Zhang, Z.P.**, 2014a. Stathmin overexpression identifies high risk for lymphatic metastatic recurrence in *p N 0* esophageal squamous cell carcinoma patients: Stathmin expression in esophageal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 29, 944–950.
- Akhtar, J., Wang, Z., Yu, C., Zhang, Z.P., Bi, M.M.**, 2014b. STMN-1 Gene: A Predictor of Survival in Stage IIA Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Ivor-Lewis Esophagectomy? *Ann Surg Oncol* 21, 315–321.
- Alagawany, M., Farag, M.R., Abdelnour, S.A., Elnesr, S.S.**, 2021. A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. *Rev. Aquacult.* 13, 632–641.
- Allen, T.W., Klink, W.H., Polyzou, W.N.**, 2001. Point-form analysis of elastic deuteron form factors. *Phys. Rev. C* 63, 034002.
- Alli, E., Bash-Babula, J., Yang, J.-M., Hait, W.N.**, 2002. Effect of Stathmin on the Sensitivity to Antimicrotubule Drugs in Human Breast Cancer1. *Cancer Research* 62, 6864–6869.
- Antonsson, B., Kassel, D.B., Di Paolo, G., Lutjens, R., Riederer, B.M., Grenningloh, G.**, 1998. Identification of in Vitro Phosphorylation Sites in the Growth Cone Protein SCG10. *Journal of Biological Chemistry* 273, 8439–8446.
- Arunasree, K.M.**, 2010. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine* 17, 581–588.

B

- Bagetta, D., Maruca, A., Lupia, A., Mesiti, F., Catalano, R., Romeo, I., Moraca, F., Ambrosio, F.A., Costa, G., Artese, A., Ortuso, F., Alcaro, S., Rocca, R.**, 2020. Mediterranean products as promising source of multi-target agents in the treatment of metabolic syndrome. *European Journal of Medicinal Chemistry* 186, 111903.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.**, 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Baquero, M.T., Hanna, J.A., Neumeister, V., Cheng, H., Molinaro, A.M., Harris, L.N., Rimm, D.L.**, 2012. Stathmin expression and its relationship to microtubule-associated protein tau and outcome in breast cancer. *Cancer* 118, 4660–4669.
- Baser, K.C.**, 2008. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *CPD* 14, 3106–3119.

- Batsaikhan, B.-E., Yoshikawa, K., Kurita, N., Iwata, T., Takasu, C., Kashihara, H., Shimada, M.,** 2014. Expression of Stathmin1 in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res* 34, 4217–4221.
- Béliveau, R., Gingras, D.,** 2007. Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician* 53, 1905–1911.
- Belletti, B., Baldassarre, G.,** 2011. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15, 1249–1266.
- Belmont, L.D., Mitchison, T.J.,** 1996. Identification of a Protein That Interacts with Tubulin Dimers and Increases the Catastrophe Rate of Microtubules. *Cell* 84, 623–631.
- Bendary, M.M., Ibrahim, D., Mosbah, R.A., Mosallam, F., Hegazy, W.A.H., Awad, N.F.S., Alshareef, W.A., Alomar, S.Y., Zaitone, S.A., Abd El-Hamid, M.I.,** 2020. Thymol Nanoemulsion: A New Therapeutic Option for Extensively Drug Resistant Foodborne Pathogens. *Antibiotics* 10, 25.
- Beretta, L., Dobránsky, T., Sobel, A.,** 1993. Multiple phosphorylation of stathmin. Identification of four sites phosphorylated in intact cells and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2. *Journal of Biological Chemistry* 268, 20076–20084.
- Biaoxue, R., Xiguang, C., Hua, L., Shuanying, Y.,** 2016. Stathmin-dependent molecular targeting therapy for malignant tumor: the latest 5 years' discoveries and developments. *J Transl Med* 14, 279.
- Biao-xue, R., Xi-guang, C., Shuan-ying, Y., Wei, L., Zong-juan, M.,** 2011. EphA2-Dependent Molecular Targeting Therapy for Malignant Tumors. *CCDT* 11, 1082–1097.
- Bièche, I., Maucuer, A., Laurendeau, I., Lachkar, S., Spano, A.J., Frankfurter, A., Lévy, P., Manceau, V., Sobel, A., Vidaud, M., Curmi, P.A.,** 2003. Expression of stathmin family genes in human tissues: non-neural-restricted expression for SCLIP. *Genomics* 81, 400–410.
- Bouchagra, S.,** 2018. MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-PETITES MOLECULES : ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE–FONCTION DANS LE CAS DES LIPASES (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat]. Annaba : Université Badji Mokhtar)..
- Bouhtit, F., Najjar, M., Moussa Agha, D., Melki, R., Najimi, M., Sadki, K., Boukhatem, N., Bron, D., Meuleman, N., Hamal, A., Lagneaux, L., Lewalle, P., Merimi, M.,** 2021.

- New Anti-Leukemic Effect of Carvacrol and Thymol Combination through Synergistic Induction of Different Cell Death Pathways. *Molecules* 26, 410.
- Brattsand, G.**, 2000. Correlation of oncoprotein 18/stathmin expression in human breast cancer with established prognostic factors. *Br J Cancer* 83, 311–318.
- Brattsand, G., Marklund, U., Nylander, K., Roos, G., Gullberg, M.**, 1994. Cell-cycle-regulated phosphorylation of oncoprotein 18 on Ser16, Ser25 and Ser38. *Eur J Biochem* 220, 359–368.
- Brattsand, G., Roos, G., Marklund, U., Ueda, H., Landberg, G., Nånberg, E., Sideras, P., Gullberg, M.**, 1993. Quantitative analysis of the expression and regulation of an activation-regulated phosphoprotein (oncoprotein 18) in normal and neoplastic cells. *Leukemia* 7, 569–579.
- Burt, S.**, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- Byrne, F.**, 2012. Stathmin and Cancer, in: Kavallaris, M. (Ed.), *Cytoskeleton and Human Disease*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 259–284.

C

- Cao, J., Cheng, X.**, 2020. Molecular Evolution and Characterization of Fish Stathmin Genes. *Animals* 10, 1328.
- Carlson, H.**, 2002. Protein Flexibility is an Important Component of Structure-Based Drug Discovery. *CPD* 8, 1571–1578.
- Charbaut, E., Curmi, P.A., Ozon, S., Lachkar, S., Redeker, V., Sobel, A.**, 2001. Stathmin Family Proteins Display Specific Molecular and Tubulin Binding Properties. *Journal of Biological Chemistry* 276, 16146–16154.
- Chen, F., Kong, N., Wang, L., Luo, Z., Yin, J., Chen, Y.**, 2021. Nanocomplexation between thymol and soy protein isolate and its improvements on stability and antibacterial properties of thymol. *Food Chemistry* 334, 127594.
- Chen, Z., Wang, K., Xu, R., Lu, H., He, X.**, 2018. Prognostic Role of High Stathmin 1 Expression in Patients with Solid Tumors: Evidence from a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem* 50, 66–78.
- Chikhi, A., Bensegueni, A.**, 2010. In Silico Study of the Selective Inhibition of Bacterial Peptide Deformylases by Several Drugs. *J Proteomics Bioinform* 03, 061–065.

- Clément, M.-J., Jourdain, I., Lachkar, S., Savarin, P., Gigant, B., Knossow, M., Toma, F., Sobel, A., Curmi, P.A.,** 2005. N-Terminal Stathmin-like Peptides Bind Tubulin and Impede Microtubule Assembly. *Biochemistry* 44, 14616–14625.
- Cooper, H.L., McDuffie, E., Braverman, R.,** 1989. Human peripheral lymphocyte growth regulation and response to phorbol esters is linked to synthesis and phosphorylation of the cytosolic protein, prosolin. *The Journal of Immunology* 143, 956–963.
- Curmi, P.A., Gavet, O., Charbaut, E., Ozon, S., Lachkar-Colmerauer, S., Manceau, V., Siavoshian, S., Maucuer, A., Sobel, A.,** 1999. Stathmin and its Phosphoprotein Family. General Properties, Biochemical and Functional Interaction with Tubulin. *Cell Struct. Funct.* 24, 345–357.
- Curmi, P.A., Noguès, C., Lachkar, S., Carelle, N., Gonthier, M.-P., Sobel, A., Lidereau, R., Bièche, I.,** 2000. Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours. *Br J Cancer* 82, 142–150.

D

- Dean, J.L., Thangavel, C., McClendon, A.K., Reed, C.A., Knudsen, E.S.,** 2010. Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure. *Oncogene* 29, 4018–4032.
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandian, S.K.,** 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 107–115.
- Di Paolo, G., Lutjens, R., Osen-Sand, A., Sobel, A., Catsicas, S., Grenningloh, G.,** 1997. Differential distribution of stathmin and SCG10 in developing neurons in culture. *J. Neurosci. Res.* 50, 1000–1009.
- Diniz Do Nascimento, L., Moraes, A.A.B.D., Costa, K.S.D., Pereira Galúcio, J.M., Taube, P.S., Costa, C.M.L., Neves Cruz, J., De Aguiar Andrade, E.H., Faria, L.J.G.D.,** 2020. Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. *Biomolecules* 10, 988.
- Dominic C.H. Ng, Zhao, T.T., Yeap, Y.Y.C., Ngoei, K.R., Bogoyevitch, M.A.,** 2010. c-Jun N-terminal Kinase Phosphorylation of Stathmin Confers Protection against Cellular Stress. *Journal of Biological Chemistry* 285, 29001–29013.
- Doye, V., Soubrier, F., Bauw, G., Bouterin, M.C., Beretta, L., Koppel, J., Vandekerckhove, J., Sobel, A.,** 1989. A Single cDNA Encodes Two Isoforms of

Stathmin, a Developmentally Regulated Neuron-enriched Phosphoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 264, 12134–12137.

Dyson, H.J., Wright, P.E., 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 197–208.

E

Elbe, H., Yigitturk, G., Cavusoglu, T., Baygar, T., Ozturk, F., Ozturk, F., 2020. Comparison of ultrastructural changes and the anticarcinogenic effects of thymol and carvacrol on ovarian cancer cells: which is more effective? *Ultrastructural Pathology* 44, 193–202.

Elie F., 2004. Liaison hydrogène et autres liaisons chimiques. page 14.

Escobar, A., Pérez, M., Romanelli, G., Blustein, G., 2020. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry* 13, 9243–9269.

F

Fan, K., Li, X., Cao, Y., Qi, H., Li, L., Zhang, Q., Sun, H., 2015. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* 26, 813–823.

Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., Plummer, M., 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology* 13, 607–615.

Friedrich, B., Grönberg, H., Landström, M., Gullberg, M., Bergh, A., 1995. Differentiation-stage specific expression of oncoprotein 18 in human and rat prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 27, 102–109.

G

Gavet, O., Ozon, S., Manceau, V., Lawler, S., Curmi, P., Sobel, A., 1998. The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *Journal of Cell Science* 111, 3333–3346.

Grenningloh, G., Soehrman, S., Bondallaz, P., Ruchti, E., Cadas, H., 2004. Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J. Neurobiol.* 58, 60–69.

Guimarães, A.G., Oliveira, M.A., Alves, R.D.S., Menezes, P.D.P., Serafini, M.R., De Souza Araújo, A.A., Bezerra, D.P., Quintans Júnior, L.J., 2015. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the

pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions* 227, 69–76.

Gunes Bayir, Kiziltan, H.S., Kocyigit, A., 2019. Plant Family, Carvacrol, and Putative Protection in Gastric Cancer, in: *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases*. Elsevier, pp. 3–18.

Günes-Bayir, A., Kiziltan, H.S., Kocyigit, A., Güler, E.M., Karataş, E., Toprak, A., 2017. Effects of natural phenolic compound carvacrol on the human gastric adenocarcinoma (AGS) cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs* 28, 522–530.

Gursul, S., Karabulut, I., Durmaz, G., 2019. Antioxidant efficacy of thymol and carvacrol in microencapsulated walnut oil triacylglycerols. *Food Chemistry* 278, 805–810.

H

Hailat, N., Strahler, J., Melhem, R., Zhu, X.X., Brodeur, G., Seeger, R.C., Reynolds, C.P., Hanash, S., 1990. N-myc gene amplification in neuroblastoma is associated with altered phosphorylation of a proliferation related polypeptide (Op18). *Oncogene* 5, 1615–1618.

Han, F., Ma, G., Yang, M., Yan, L., Xiong, W., Shu, J., Zhao, Z., Xu, H., 2017. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 18, 79–84.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hanash, S.M., Strahler, J.R., Kuick, R., Chu, E.H., Nichols, D., 1988. Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. *Journal of Biological Chemistry* 263, 12813–12815.

Hayashi, K., Pan, Y., Shu, H., Ohshima, T., Kansy, J.W., White, C.L., Tamminga, C.A., Sobel, A., Curmi, P.A., Mikoshiba, K., Bibb, J.A., 2006. Phosphorylation of the tubulin-binding protein, stathmin, by Cdk5 and MAP kinases in the brain. *J Neurochem* 99, 237–250.

Höferl, M., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Schmidt, E., Stoyanova, A., Denkova, Z., Slavchev, A., Geissler, M., 2009. Correlation of Antimicrobial Activities of Various Essential Oils and Their Main Aromatic Volatile Constituents. *Journal of Essential Oil Research* 21, 459–463.

Honnappa, S., Jahnke, W., Seelig, J., Steinmetz, M.O., 2006. Control of Intrinsically Disordered Stathmin by Multisite Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 281, 16078–16083.

Hsieh, S.-Y., Huang, S.-F., Yu, M.-C., Yeh, T.-S., Chen, T.-C., Lin, Y.-J., Chang, C.-J., Sung, C.-M., Lee, Y.-L., Hsu, C.-Y., 2010. Stathmin1 overexpression associated with polyploidy, tumor-cell invasion, early recurrence, and poor prognosis in human hepatoma: STMN1 ASSOCIATED WITH HEPATOMA RECURRENCE. *Mol. Carcinog.* 49, 476–487.

Huang, C.C., Meng, E.C., Morris, J.H., Pettersen, E.F., Ferrin, T.E., 2014. Enhancing UCSF Chimera through web services. *Nucleic Acids Research* 42, W478–W484.

Hummert, T.W., Schwartz, Z., Sylvia, V.L., Dean, D.D., Boyan, B.D., 2001. Stathmin Levels in Growth Plate Chondrocytes Are Modulated by Vitamin D₃ Metabolites and Transforming Growth Factor- β 1 and Are Associated with Proliferation. *ENDO* 15, 093–102.

I

Islam, M.T., Khalipha, A.B.R., Bagchi, R., Mondal, M., Smrity, S.Z., Uddin, S.J., Shilpi, J.A., Rouf, R., 2019. Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. *IUBMB Life* 71, 9–19.

J

Jafri, H., Ansari, F.A., Ahmad, I., 2019. Prospects of Essential Oils in Controlling Pathogenic Biofilm, in: *New Look to Phytomedicine*. Elsevier, pp. 203–236.

Jourdain, L., Curmi, P., Sobel, A., Pantaloni, D., Carlier, M.-F., 1997. Stathmin: A Tubulin-Sequestering Protein Which Forms a Ternary T₂S Complex with Two Tubulin Molecules. *Biochemistry* 36, 10817–10821.

K

Kachur, K., Suntres, Z., 2020. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60, 3042–3053.

Khan, S.T., Khan, M., Ahmad, J., Wahab, R., Abd-Elkader, O.H., Musarrat, J., Alkathlan, H.Z., Al-Kedhairi, A.A., 2017. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *AMB Expr* 7, 49.

L

- Lachkar, S., Lebois, M., Steinmetz, M.O., Guichet, A., Lal, N., Curmi, P.A., Sobel, A., Ozon, S.,** 2010. Drosophila Stathmins Bind Tubulin Heterodimers with High and Variable Stoichiometries. *Journal of Biological Chemistry* 285, 11667–11680.
- Larsson, N., Melander, H., Marklund, U., Osterman, R., Gullberg, M.,** 1995. G2/M Transition Requires Multisite Phosphorylation of Oncoprotein 18 by Two Distinct Protein Kinase Systems. *Journal of Biological Chemistry* 270, 14175–14183.
- Li, L., He, L., Wu, Y., Zhang, Y.,** 2021. Carvacrol affects breast cancer cells through TRPM7 mediated cell cycle regulation. *Life Sciences* 266, 118894.
- Lukic, I., Vulic, J., Ivanovic, J.,** 2020. Antioxidant activity of PLA/PCL films loaded with thymol and/or carvacrol using scCO₂ for active food packaging. *Food Packaging and Shelf Life* 26, 100578.
- Luo, X.N., Mookerjee, B., Ferrari, A., Mistry, S., Atweh, G.F.,** 1994. Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells. Cell cycle regulated phosphorylation by p34cdc2 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 269, 10312–10318.
- Lutjens, R., Igarashi, M., Pellier, V., Blasey, H., Di Paolo, G., Ruchti, E., Pfulg, C., Staple, J.K., Catsicas, S., Grenningloh, G.,** 2000. Localization and targeting of SCG10 to the trans-Golgi apparatus and growth cone vesicles: SCG10 localization and targeting. *European Journal of Neuroscience* 12, 2224–2234.
- Lv, R., Chen, Z.,** 2018. Thymol inhibits cell migration and invasion by downregulating the activation of PI3K/AKT and ERK pathways in human colon cancer cells. *Trop. J. Pharm Res* 16, 2895.

M

- Machado, T.Q., Da Fonseca, A.C.C., Duarte, A.B.S., Robbs, B.K., De Sousa, D.P.,** 2022. A Narrative Review of the Antitumor Activity of Monoterpenes from Essential Oils: An Update. *BioMed Research International* 2022, 1–20.
- Manna, T., Thrower, D.A., Honnappa, S., Steinmetz, M.O., Wilson, L.,** 2009. Regulation of Microtubule Dynamic Instability in Vitro by Differentially Phosphorylated Stathmin. *Journal of Biological Chemistry* 284, 15640–15649.
- Mari, A., Mani, G., Nagabhishek, S.N., Balaraman, G., Subramanian, N., Mirza, F.B., Sundaram, J., Thiruvengadam, D.,** 2021. Carvacrol Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis through PI3K/AKT Signaling Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Chin. J. Integr. Med.* 27, 680–687.

- Mariola Zielińska-Blajet, Joanna Feder-Kubis**, 2020. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. *IJMS* 21, 7078.
- Marklund, U., Brattsand, G., Shingler, V., Gullberg, M.**, 1993. Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 268, 15039–15047.
- Marklund, U., Larsson, N., Brattsand, G., Osterman, O., Chatila, T.A., Gullberg, M.**, 1994. Serine 16 of Oncoprotein 18 is a Major Cytosolic Target for the Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase-Gr. *Eur J Biochem* 225, 53–60.
- Marklund, U., Larsson, N., Gradin, H.M., Brattsand, G., Gullberg, M.**, 1996. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *The EMBO Journal* 15, 5290–5298. h
- Maruca, A., Catalano, R., Bagetta, D., Mesiti, F., Ambrosio, F.A., Romeo, I., Moraca, F., Rocca, R., Ortuso, F., Artese, A., Costa, G., Alcaro, S., Lupia, A.**, 2019. The Mediterranean Diet as source of bioactive compounds with multi-targeting anti-cancer profile. *European Journal of Medicinal Chemistry* 181, 111579.
- Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Niwa, Y., Sakai, Y., Chiba, T.**, 2010. Up-regulation of Activation-Induced Cytidine Deaminase Causes Genetic Aberrations at the CDKN2b-CDKN2a in Gastric Cancer. *Gastroenterology* 139, 1984–1994.
- Maucuer, A., Doye, V., Sobel, A.**, 1990. A single amino acid difference distinguishes the human and the rat sequences of stathmin, a ubiquitous intracellular phosphoprotein associated with cell regulations. *FEBS Letters* 264, 275–278.
- Melander Gradin, H., Marklund, U., Larsson, N., Chatila, T.A., Gullberg, M.**, 1997. Regulation of Microtubule Dynamics by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase IV/Gr-Dependent Phosphorylation of Oncoprotein 18. *Molecular and Cellular Biology* 17, 3459–3467.
- Memar, M.Y., Raei, P., Alizadeh, N., Akbari Aghdam, M., Kafil, H.S.**, 2017. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology* 28, 63–68.
- Meyer, N., Prentice, D.A., Fox, M.T., Hughes, J.P.**, 1992. Prolactin-induced proliferation of the Nb2 T-lymphoma is associated with protein kinase-C-independent phosphorylation of stathmin. *Endocrinology* 131, 1977–1984.

- Miara, M.D., Bendif, H., Ouabed, A., Rebbas, K., Ait Hammou, M., Amirat, M., Greene, A., Teixidor-Toneu, I.**, 2019. Ethnoveterinary remedies used in the Algerian steppe: Exploring the relationship with traditional human herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 244, 112164.
- Miceli, C., Tejada, A., Castaneda, A., Mistry, S.J.**, 2013. Cell cycle inhibition therapy that targets stathmin in in vitro and in vivo models of breast cancer. *Cancer Gene Ther* 20, 298–307.
- Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., Chaieb, K.**, 2017. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial Pathogenesis* 104, 56–63.
- Min, T., Sun, X., Zhou, L., Du, H., Zhu, Z., Wen, Y.**, 2021. Electrospun pullulan/PVA nanofibers integrated with thymol-loaded porphyrin metal–organic framework for antibacterial food packaging. *Carbohydrate Polymers* 270, 118391.
- Mistry, S.J., Atweh, G.F.**, 2002. Role of stathmin in the regulation of the mitotic spindle: potential applications in cancer therapy. *Mt Sinai J Med* 69, 299–304.
- Mongaret C., Slimano, F., Sautou, V.**, 2020. Cancérogenèse et maladie cancéreuse, in : *Pharmacie Clinique Pratique en Oncologie*. Elsevier, pp. 31-35.e1.
- Mori, N., Morii, H.**, 2002. SCG10-related neuronal growth-associated proteins in neural development, plasticity, degeneration, and aging. *J. Neurosci. Res.* 70, 264–273.

N

- Nagoor Meeran, M.F., Javed, H., Al Taei, H., Azimullah, S., Ojha, S.K.**, 2017. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front. Pharmacol.* 8, 380.
- Nickavar, B.**, 2005. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry* 90, 609–611.
- Nie, L., Zhang, C., Song, H., Zhao, Q., Cheng, L., Zhang, P., Yang, X.**, 2022. Overexpression of Stathmin 1 Predicts Poor Prognosis and Promotes Cancer Cell Proliferation and Migration in Ovarian Cancer. *Disease Markers* 2022, 1–15.
- Nie, W., Xu, M., Gan, L., Huang, H., Xiu, Q., Li, B.**, 2015. Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Laboratory Investigation* 95, 56–64.

O

- Obayashi, S., Horiguchi, J., Higuchi, T., Katayama, A., Handa, T., Altan, B., Bai, T., Bao, P., Bao, H., Yokobori, T., Nishiyama, M., Oyama, T., Kuwano, H., 2017.** Stathmin1 expression is associated with aggressive phenotypes and cancer stem cell marker expression in breast cancer patients. *International Journal of Oncology* 51, 781–790.
- Ozon, S., El Mestikawy, S., Sobel, A., 1999.** Differential, regional, and cellular expression of the stathmin family transcripts in the adult rat brain. *J. Neurosci. Res.* 56, 553–564.

P

- Papetti, M., Herman, I.M., 2002.** Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 282, C947–C970.
- Pasmantier, R., Danoff, A., Fleischer, N., Schubart, U.K., 1986.** P19, A Hormonally Regulated Phosphoprotein of Peptide Hormone-Producing Cells: Secretagogue-Induced Phosphorylation in AtT-20 Mouse Pituitary Tumor Cells and in Rat and Hamster Insulinoma Cells*. *Endocrinology* 119, 1229–1238.
- Peyron, J.F., Aussel, C., Ferrua, B., Häring, H., Fehlmann, M., 1989.** Phosphorylation of two cytosolic proteins. An early event of T-cell activation. *Biochemical Journal* 258, 505–510.
- Poulose, A.J., Croteau, R., 1978.** Biosynthesis of aromatic monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 187, 307–314.

R

- Rana, S., Maples, P.B., Senzer, N., Nemunaitis, J., 2008.** Stathmin 1: a novel therapeutic target for anticancer activity. *Expert Review of Anticancer Therapy* 8, 1461–1470.
- Reichle D E, 2020.** Traitement de l'énergie par les animaux. Le cycle mondial du carbone et le changement climatique 55-78.
- Reyes, H.D., Bosquet, J.G., Stephan, J.M., McDonald, M.E., Leslie, K.K., 2015a.** Stathmin over-expression correlates with poor prognosis in patients with endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 137, 66.
- Reyes, H.D., Bosquet, J.G., Stephan, J.M., McDonald, M.E., Leslie, K.K., 2015b.** Stathmin over-expression correlates with poor prognosis in patients with endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 137, 66.
- Rodríguez, J., Ortuño, C., Benedito, J., Bon, J., 2013.** Optimization of the antioxidant capacity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts: Management of the drying process. *Industrial Crops and Products* 46, 258–263.

Rowlands, D.C., Williams, A., Jones, N.A., Guest, S.S., Reynolds, G.M., Barber, P.C., Brown, G., 1995. Stathmin expression is a feature of proliferating cells of most, if not all, cell lineages. *Lab Invest* 72, 100–113.

Rúa, J., Del Valle, P., D'Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., García-Armesto, M.R., 2019. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathogens and Disease* 16, 622–629.

Ruddon, R.W., 2007. *Cancer biology*, 4th ed. ed. Oxford University Press, Oxford ; New York.

S

Salehi, B., Mishra, A.P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M.D.M., Segura-Carretero, A., Fathi, H., Nasrabadi, N.N., Kobarfard, F., Sharifi-Rad, J., 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses: Thymol, health and potential uses. *Phytotherapy Research* 32, 1688–1706.

Sargis Dallakyan, Olson, A.J., 2015. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx, in: Hempel, J.E., Williams, C.H., Hong, C.C. (Eds.), *Chemical Biology, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 243–250.

Schubart, U.K., Banerjee, M.D., Eng, J., 1989. Homology between the cDNAs Encoding Phosphoprotein p19 and SCG10 Reveals a Novel Mammalian Gene Family Preferentially Expressed in Developing Brain. *DNA* 8, 389–398.

Segerman, B., Holmfeldt, P., Morabito, J., Cassimeris, L., Gullberg, M., 2003. Autonomous and phosphorylation-responsive microtubule-regulating activities of the N-terminus of Op18/stathmin. *Journal of Cell Science* 116, 197–205.

Sharifi-Rad, M., Varoni, E.M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W.N., Del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., Sharifi-Rad, J., 2018a. Carvacrol and human health: A comprehensive review: Carvacrol and Human Health. *Phytotherapy Research* 32, 1675–1687.

Shiyab, S., 2012. Influence of developmental stage on yield and composition of *Origanum syriacum* L. oil by multivariate analysis. *J. Med. Plants Res.* 6.

Sobel, A., 1991. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends in Biochemical Sciences* 16, 301–305.

Sobel, A., Tashjian, A.H., 1983. Distinct patterns of cytoplasmic protein phosphorylation related to regulation of synthesis and release of prolactin by GH cells. *Journal of Biological Chemistry* 258, 10312–10324.

Sonego, M., Schiappacassi, M., Lovisa, S., Dall'Acqua, A., Bagnoli, M., Lovat, F., Libra, M., D'Andrea, S., Canzonieri, V., Militello, L., Napoli, M., Giorda, G., Pivetta, B., Mezzanzanica, D., Barbareschi, M., Valeri, B., Canevari, S., Colombatti, A., Belletti, B., Del Sal, G., Baldassarre, G., 2013. Stathmin regulates mutant p53 stability and transcriptional activity in ovarian cancer. *EMBO Mol Med* 5, 707–722.

Steinmetz, M.O., Kammerer, R.A., Jahnke, W., Goldie, K.N., Lustig, A., Van Oostrum, J., 2000. Op18/stathmin caps a kinked protofilament-like tubulin tetramer. *EMBO J* 19, 572–580.

Sukanya Panikar, Shoba, G., Arun, M., Sahayarayan, J.J., Usha Raja Nanthini, A., Chinnathambi, A., Alharbi, S.A., Nasif, O., Kim, H.-J., 2021. Essential oils as an effective alternative for the treatment of COVID-19: Molecular interaction analysis of protease (Mpro) with pharmacokinetics and toxicological properties. *Journal of Infection and Public Health* 14, 601–610.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* 71, 209–249.

T

Tabet-Helal, SZ, 2014. Impacts moléculaires et cellulaires de mutations de la partie N-terminale de la stathmine (Thèse de doctorat, Evry-Val d'Essonne). .

Tabet-Helal S.Z, Curmi P.A & Merzouk A, 2014. EFFECTS OF STATHMIN N-TERMINAL DOMAIN MUTATIONS ON CELL CYCLE, MICROTUBULES ASSEMBLY AND DYNAMICS IN HELA CELLS.

U

Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., 2002. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 68, 1561–1568.

V

Vokou, D., Kokkini, S., Bessiere, J.-M., 1993. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology* 21, 287–295.

W

- Wallon, G., Rappsilber, J., Mann, M., Serrano, L.,** 2000. Model for stathmin/OP18 binding to tubulin. *EMBO J* 19, 213–222.
- Wang, Y.K., Liao, P.C., Allison, J., Gage, D.A., Andrews, P.C., Lubman, D.M., Hanash, S.M., Strahler, J.R.,** 1993. Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced phosphorylation of Op18 in Jurkat T cells. Identification of phosphorylation sites by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 268, 14269–14277.
- Wijesundara, N.M., Lee, S.F., Cheng, Z., Davidson, R., Rupasinghe, H.P.V.,** 2021. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. *Sci Rep* 11, 1487.
- Wittmann, T., Bokoch, G.M., Waterman-Storer, C.M.,** 2004. Regulation of Microtubule Destabilizing Activity of Op18/Stathmin Downstream of Rac1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6196–6203.

Y

- Yip, Y.Y., Yeap, Y.Y.C., Bogoyevitch, M.A., Ng, D.C.H.,** 2014. Differences in c-Jun N-terminal kinase recognition and phosphorylation of closely related stathmin-family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446, 248–254.

Z

- Zeng, Q., Che, Y., Zhang, Y., Chen, M., Guo, Q., Zhang, W.,** 2020. Thymol Isolated from *Thymus vulgaris* L. Inhibits Colorectal Cancer Cell Growth and Metastasis by Suppressing the Wnt/ β -Catenin Pathway. *DDDT* Volume 14, 2535–2547.
- Zhai, J.-W., Gao, C., Ma, W.-D., Wang, W., Yao, L.-P., Xia, X.-X., Luo, M., Zu, Y.-G., Fu, Y.-J.,** 2016. Geraniin induces apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 via ROS-mediated stimulation of p38 MAPK. *Toxicology Mechanisms and Methods* 26, 311–318.
- Zheng, P., Liu, Y.-X., Chen, L., Liu, X.-H., Xiao, Z.-Q., Zhao, L., Li, G.-Q., Zhou, J., Ding, Y.-Q., Li, J.-M.,** 2010. Stathmin, a New Target of PRL-3 Identified by Proteomic Methods, Plays a Key Role in Progression and Metastasis of Colorectal Cancer. *J. Proteome Res.* 9, 4897–4905.