



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا

Cellulaire et Moléculaire

الخلوية و الجزيئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

Intitulé :

Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs

De la Bêta-Lactamase de classe C

par Docking Moléculaire

Présenté et soutenu par : BENHAMOUD Amina
BOUFRAH Mohsane

Le : 20/06/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury : BENSEGUENI A. (Professeur - UFM Constantine1).

Rapporteur : MOKRANI E.H. (Maître assistant «A» - UFM Constantine1).

Examineur : CHIKHI A. (Professeur - UFM Constantine1).

Année universitaire
2016 – 2017

Remerciements

Tout d'abord, merci beaucoup ALLAH de nous donner la patience, la force et le courage qui nous ont permis de reprendre les études universitaires après une longue rupture et pour compléter ce travail.

*Nous adressons nos remerciements les plus profonds et les plus vifs à notre encadreur **Mr. MOKRANI. E.H.** Maître-assistant 'A' à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour son aide, ses orientations, ses précieux conseils, sa patience et surtout sa confiance.*

*Nous tenons à remercier aussi **Mr. BENSEGUENI. A.** professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 en nous faisant l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce mémoire ainsi que pour ses encouragements pour nous durant notre parcours universitaire en Master. C'est aussi avec plaisir, que nous exprimons notre profonde gratitude et nos remerciements les plus vifs à **Mr. CHIKHI. A.** Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour l'honneur qu'il nous a accordé en examinant ce travail.*

*Nous remercions chaleureusement **M^{me}. TENIOU. S.** Maître-assistant 'A' à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour son aide permanente, ses conseils et surtout sa patience.*

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.



Je dédie ce
Mémoire ...

À mon soutien moral, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, et qui s'inquiète jusqu'à ce jour pour moi ;
Mon Père ; Boudjemâa.

À la lumière de mes jours, la source de mon amour, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ;
Ma mère ; Rytiba.

Aux sources de mes efforts, Mes joies de vivre, et pour ceux que ce combat et ces sacrifices a fin de finir mes études et ce travail soit un exemple à suivre ;
Ma femme ; Afef.

Mes Amours, Mes très chères filles : Aaa errahmene ; Meroua ; Merieme.

À Mes très chers frères ; Skander, Fares.

À mon binôme ; Benhamoud Amina, qui n'a cessé de me soutenir et de m'aider tout le long de mes études et des moments difficiles, un grand MERCI à vous.

À tous mes amis.

À tous les amis (es) de la promotion Biochimie Moléculaire et Santé
Année 2017.

À mes familles BOUFRÂH et KHELLEH.

BOUFRÂH mohsane





Je dédie ce modeste travail accompagné de toute l'expression de ma profonde gratitude ...

✿ À la mémoire de mon très cher père « Omar » qui m'a transmis l'héritage de la persévérance, honnêteté, courage et travail continu. Tu m'as toujours encouragé et orienté vers le bon chemin. À chaque moment vécu durant l'élaboration de ce travail, tu as été présent par tes conseils qui ne m'ont quitté un instant. Pour tous tes sacrifices pour nous procurer un avenir et une vie agréable, j'aurais tant aimé que tu sois à mes côtés et partager ma réussite ;

Paix à ton âme très cher papa ;

✿ À mon adorable mère « Farida » qui m'a comblé de son affection et m'a toujours soutenu et incité à travailler fort et à réussir durant tout mon parcours d'étude. Très chère maman, merci pour tous tes sacrifices pour nous, pour tes encouragements sans lesquels je n'aurais jamais pu accomplir ce travail. Tu n'as cessé de m'éclairer mon chemin par tes conseils. Je te dois cette réussite et je suis très fière de te l'offrir. Merci d'être ma mère. Je prie Allah de te protéger, te garder et te procurer santé et bonheur ;

Que ta bénédiction me soit accordée après celle d'Allah.

✿ À mes tendres sœurs : Sonia, Ouarda et Lynda qui m'ont tant supporté et soutenu, en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour elles ;

✿ À mes aimables frères : Abdelmadjid, Mohamed et Lotfi qui tenaient toujours à me voir réussir, pour leurs encouragements et compréhension ;

✿ À mes belles-sœurs Chafiaa, Imène et Amina, à mon beau-frère Djamel ;





❀ Aux petits bijoux qui ont éclairé, orné et apporté joie à notre famille,
mes neveux et nièces : Moundji, Meriem Mayar, Amir, Abderrahmane,
Houdeïfa, Aya, Abdelmalek et Aroua ;

❀ À mon binôme Boufrak Mohsane, sur qui je peux compter, en
témoignage de l'amitié et de tous les moments pénibles et agréables que nous
avons vécu durant notre parcours en Master ;

❀ À mes amies que j'aime et qui m'aiment : Amina, Imène, Radia,
Faten, Lineb, Manel D., Manel A., Meriem, Amel, Ismahane, Maya
et Khakida ainsi que mes amies du laboratoire pharmaceutique, en témoignage
de l'amitié qui nous unie et des moments que nous avons passé ensemble ;

❀ À tous les amis (es) de la promotion Biochimie Moléculaire et Santé
Année 2017 ;

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués et le fruit de votre
soutien infaisible.

Merci d'être toujours là pour moi.

❀ BENHAMOUD Amina ❀



Sommaire

Introduction générale.....	01
-----------------------------------	-----------

Revue Bibliographique

Chapitre 1 : Résistance aux antibiotiques et Bêta-Lactamases

1. Bêta-Lactamines	03
2. Mécanisme d'action et spectre d'activité des Bêta-Lactamines.....	04
3. Résistance aux antibiotiques.....	05
3.1. Types de résistance aux antibiotiques.....	06
3.1.1. Résistance Naturelle = Innée.....	06
3.1.1.1. Résistance enzymatique innée.....	07
3.1.1.2. Résistance non enzymatique innée.....	07
3.1.2. Résistance acquise.....	07
3.1.2.1. Résistance enzymatique acquise.....	07
3.1.2.2. Résistance non enzymatique acquise.....	08
3.1.3. Multi-résistance = Multi-Drug-Resistance « MDR ».....	08
3.2. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	08
3.2.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique Bêta-lactame.....	08
3.2.2. Modification de la cible.....	09
3.2.3. Altération de la production des porines.....	09
3.2.4. Efflux actif des Bêta-Lactames.....	10
4. Les Bêta-Lactamases.....	11
4.1. Classification.....	11
4.2. Microorganismes producteurs de Bêta-Lactamases.....	12
4.3. Mécanisme de résistance induit par les Bêta-Lactamases.....	13
5. Structure des Bêta-Lactamases.....	15
5.1. Données structurales et moléculaires.....	15
5.2. Site Actif.....	18
6. Epidémiologie.....	20

Chapitre 2 : Inhibiteurs de Bêta-Lactamases

1. Développement d'inhibiteurs de Bêta-Lactamases et leur combinaison aux Antibiotiques Bêta-Lactamines.....	24
2. Types d'inhibiteurs de Bêta-Lactamases.....	26
2.1. Selon la structure de l'inhibiteur.....	26
2.1.1. Inhibiteurs type Bêta-Lactames.....	26
2.1.2. Inhibiteurs non Bêta-Lactames.....	25
2.2. Selon le mode d'action de l'inhibiteur.....	25
2.2.1. Inhibiteurs Irréversibles.....	25
2.2.2. Inhibiteurs Réversibles.....	26
3. Mécanisme d'inhibition.....	27
4. Combinaison Bêta-Lactame-Inhibiteurs de Bêta-Lactamase.....	27
5. Résistance aux inhibiteurs de Bêta-Lactamases.....	28
6. Les nouveaux inhibiteurs prometteurs de deuxième génération.....	29

Chapitre 3 : Docking moléculaire

1. Introduction.....	31
2. Les outils du Docking moléculaire.....	31
2.1. Les Récepteurs.....	31
2.2 Le(s) Ligand(s).....	32
2.2.1. PubChem.....	32
2.2.2. Drugbank.....	32
2.3. Programmes.....	33

Partie pratique

Chapitre 4 : Matériel Et Méthodes

1. Matériels.....	34
1.1. Microordinateurs.....	34
1.2. Programmes.....	34
1.3. Banques de données.....	34
2. Méthodes.....	35
2.1. Préparation des ligands.....	35
2.2. Préparation du récepteur.....	35
2.3. Génération du protomol.....	37
2.4. Docking Moléculaire.....	38
2.5. Règle de Lipinski.....	38

Chapitre 5 : Résultats et Discussion

1. Test de fiabilité du programme Surfex	40
1.1. Test de fiabilité du logiciel Surfex et coefficient de corrélation « r ».....	40
1.2. Etude des interactions du composé N°29-Bêta-lactamase AmpC.....	42
1.3. Etude des interactions du composé N°29 envers le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	43
2. Mono-Substitutions.....	45
3. Bi-Substitutions.....	52
4. Tri-Substitution.....	58
5. Règle de Lipinski.....	62

Conclusion et perspectives.....64

Références bibliographiques

Annexes

Annexe N°1

Annexe N°2

Résumés

Liste des Figures

Figure N°1 : (a) : Structure d'un Bêta-Lactamine, l'acide 6-aminopénicillanique. (b) : Structure du noyau Bêta-Lactame.....	3
Figure N°2 : Structure générales des différentes classes de Bêta-Lactamines.....	4
Figure N°3 : Inactivation enzymatique des Bêta-Lactamines par les Bêta-Lactamases.....	7
Figure N°4 : Inactivation enzymatique par les Bêta-Lactamases de l'antibiotique Bêta-Lactame.	9
Figure N°5 : Modification du site des PBP liant les antibiotiques Bêta –Lactame.....	9
Figure N°6 : Altération de la production des porines membranaires.....	10
Figure N°7 : Efflux actifs à travers les pompes des antibiotiques Bêta-Lactamines.....	10
Figure N°8 : (a) : Mécanismes de la désactivation enzymatique des Bêta-Lactamines par les Bêta-Lactamases. (b) : Désactivation des Pénicillines et des Céphalosporines par les Bêta-Lactamases.....	14
Figure N°9 : Structure cristallographique de la Bêta-Lactamase AmpC en combinaison avec son ligand pdb.....	16
Figure N°10 : Structure secondaire (a) et Séquence protéique (b) de la Bêta-Lactamase AmpC.	17
Figure N°11 : Structure 3D de la Bêta-Lactamase AmpC isolée d'E.coli et liant Ceftazidime...	19
Figure N° 12 : Site actif d'un type de la Bêta-Lactamase P99 d' <i>Enterococcus cloacae</i>	20
Figure N°13 : Répartition des différentes Bêta-Lactamases dans le territoire algérien et plus particulièrement en Algérie septentrionale.....	22
Figure N°14 : Mode d'action des inhibiteurs de Bêta-Lactamases.....	24
Figure N°15 : Mécanisme d'inhibition induit par l'acide clavulanique sur les Sérine Bêta-Lactamases appartenant aux classes A, C et D.....	26

<u>Figure N°16</u> : Mécanisme d'inhibition induit par l'Avibactam sur les Sérine- Bêta-Lactamases appartenant à la classe A.....	27
<u>Figure N° 17</u> : Inhibition de TEM-1 par Avibactam.....	30
<u>Figure N°18</u> : Représentation par VMD de la protéine 3S1Y avec le ligand pdb S1Y positionné dans la cavité catalytique.....	36
<u>Figure N°19</u> : Représentation des ligands de référence S1Y, MER, 5F3 et MCO.....	37
<u>Figure N°20</u> : Protomol généré pour le complexe 3S1Y.....	38
<u>Figure N°21</u> : Représentation de l'interface du serveur Molinspiration pour le calcul des paramètres décrits par Lipinski.....	39
<u>Figure N°22</u> : Corrélation entre l'activité biologique « Log IC ₅₀ » et le score de docking définissant l'affinité de 41 inhibiteurs de Bêta-Lactamases.....	42
<u>Figure N°23</u> : Structure du « Composé N°29 ».....	43
<u>Figure N°24</u> : Représentation du positionnement du composé N°29 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	44
<u>Figure N°25</u> : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°29 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	45
<u>Figure N°26</u> : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre les résidus d'acides aminés de la cavité de la Bêta-Lactamase AmpC et le composé N°29.....	45
<u>Figure N°27</u> : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°7 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	49
<u>Figure N°28</u> : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°7 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	50
<u>Figure N°29</u> : Représentation du positionnement du composé N°7 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	50

Figure N°30 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°12 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	52
Figure N°31 Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°12 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	52
Figure N°32 : Représentation du positionnement du composé N°12 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	53
Figure N°33 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°30 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	55
Figure N°34 : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°30 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	56
Figure N°35 : Représentation du positionnement du composé N°30 dans le site actif de la Bêta Lactamase AmpC.....	56
Figure N°36 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°34 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	58
Figure N°37 : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°34 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	58
Figure N°38 : Représentation du positionnement du composé N°34 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	59
Figure N°39 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°42 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	62
Figure N°40 : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°42 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	62
Figure N°41 : Représentation du positionnement du composé N°42 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.....	63

Liste des Tableaux

<u>Tableau N°1</u> : Spectre d'activité des différentes classes de Bêta-Lactamines.....	5
<u>Tableau N°2</u> : Classification des Bêta-Lactamases selon Ambler.....	12
<u>Tableau N°3</u> : Les microorganismes producteurs de Bêta-Lactamases.....	13
<u>Tableau N°4</u> : Les résidus d'acides aminés constituant les éléments conservés du site actif des Sérine-Bêta-Lactamases.....	18
<u>Tableau N°5</u> : Souches bactériennes productrices de différents types de Bêta-Lactamases au nord de l'Algérie.....	21
<u>Tableau N°6</u> : Quelques combinaisons commerciales disponibles de Bêta-Lactame-Inhibiteurs Bêta-Lactamase.....	28
<u>Tableau N°7</u> : Les programmes de docking moléculaire.....	33
<u>Tableau N°8</u> : Les complexes pdb choisis représentant les classes A, B, C et D avec leur ligand correspondant.....	35
<u>Tableau N°9</u> : Résultat du docking de 41 inhibiteurs et les valeurs de leurs logIC ₅₀ (Classe A : jaune, classe B : vert, classe C : bleu, classe D : mauve).....	41
<u>Tableau N°10</u> : Score de docking des nouveaux inhibiteurs théoriques de la Bêta-Lactamase type AmpC obtenus après mono-substitutions du composé de départ N°29.....	47
<u>Tableau N°11</u> : Score de docking des nouveaux inhibiteurs de Bêta-Lactamase type AmpC obtenus après bi-substitutions.....	54
<u>Tableau N°12</u> : Score de docking du nouvel meilleur inhibiteur de Bêta-Lactamase type AmpC obtenus après tri-substitution du composé N°30.....	60
<u>Tableau N°13</u> : Critères de Lipinski des meilleurs inhibiteurs de la Bêta-Lactamase AmpC obtenus après mono, bi et tri-substitution.....	64

Liste des Annexes

Annexe N°1 : Classes et code PDB des 35 complexes « Bêta-Lactamase-inhibiteur de référence » étudiés.

Annexe N°2 : Nom, Classe et Structure des 41 inhibiteurs de Bêta-Lactamase expérimentalement approuvés.

Liste des Abréviations

1G : première génération

2D : Deux dimension

3D : Trois dimensions

Å : Angström

AmpC : Céphalosporinase codée par le gène ampC

BcII : *Bacillus cereus* Métallo-Bêta-Lactamase

bla : gène de Bêta-Lactamase

BLIP : Beta-Lactamase Inhibitor Protein

CMY : Ceftazidime plasmide « cmy » encoded Beta-Lactamase

CTX-M : Cefotaxime-resistant-Munich Beta-Lactamase = Cefotaximase-Munich

ERP: *Erwinia persicina* Beta-Lactamase

ESBL : Extended Spectrum Beta-Lactamase « Bêta-Lactamase à spectre étendu »

Go : Giga octet

GOLD: Genetic Optimisation for Ligand Docking

IC₅₀ : Inhibitory Concentration 50

IMP : Imipeneme Métallo-protéine Plasmidique = Imipenemase

KDa : Kilo Dalton

Ki : Constante d'inhibition.

KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapénémase

MBL : Métallo-Bêta-Lactamase

MDR : Multi-Drug-Resistance

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NDM : New Delhi Metallo-Beta-Lactamase

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OXA : Oxacillinase hydrolazing = Oxacillinase

PBP : Penicillin Binding Proteins

PDB: Protein Data Bank

PDBe: Pprotein Data Bank of England (United Kingdom)

PDBj: Protein Data Bank of Japan

PER: *Pseudomonas aeruginosa* extended resistance Beta-Lactamase

r : Coefficient de corrélation linéaire

RCSB PDB : the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

SHV : Sulfhydryl Variant Beta-Lactamase

SPM : São Paolo Métallo-Bêta-Lactamase

TEM : Encoded Transposable Element Beta-Lactamase

VEB : Vietnamese Extended Spectrum Beta-Lactamase

VIM : Verona-Integron-Encoded Metallo-Beta-Lactamase

VMD : Visual Molecular Dynamics

wwPDB: Worldwide Protein Data Bank

Introduction

Générale

Introduction générale :

L'usage excessif et non réglementé des antibiotiques a entraîné une propagation étendue de la résistance à ces molécules et une apparition de souches microbiennes résistantes [1] notamment dans les pays où les antibiotiques sont délivrés sans ordonnance et dépourvus de guides thérapeutiques standardisés où ils sont prescrits excessivement. Dans ces conditions, les bactéries ont pu développer des mécanismes pour échapper à l'action fatale des antibiotiques : on parle alors de la résistance [2] qui date depuis bien longtemps au début des années 1940 après commercialisation des Pénicillines [1].

Durant les dix dernières années, la résistance aux antibiotiques est déclarée comme un problème majeur de la santé publique en Algérie en particulier chez les bactéries à Gram négatif. Elle est dominée par la production de Bêta-Lactamases à spectre étendu (BLSE) notamment à Constantine et à Alger [3]. Ce problème n'est pas réglé même par la découverte de nouveaux antibiotiques plus efficaces et la multi-résistance s'accroît alors de plus en plus [4] vue la plasticité du génome bactérien et les transferts horizontaux de matériel génétique entre les différentes espèces bactériennes [5].

La production de Bêta-lactamases est le mécanisme de résistance le plus fréquent et actuellement plus de 850 Bêta-Lactamases sont identifiées. Ces enzymes catalysent le clivage de la liaison amide du cycle Bêta-lactame par l'intermédiaire d'un résidu Sérine de leur site actif entraînant l'ouverture irréversible de son noyau. [6].

Pour s'opposer à ce processus enzymatique altérant, il est quasiment impératif d'associer à l'agent antibactérien un composé susceptible d'inhiber l'enzyme considérée [7]. La combinaison Bêta-Lactame-Inhibiteur de Bêta-Lactamase a permis l'évolution de l'aptitude à traiter plusieurs types d'infections communes et nosocomiales ainsi que des infections polymicrobiennes [8]. Cependant, les inhibiteurs Bêta-Lactamases développés reconnaissent, à l'heure actuelle, des cas de résistance [8] et le nombre de ces derniers est en augmentation continue [9].

Le présent travail vise à proposer de nouveaux inhibiteurs de la Bêta-Lactamase et ce en faisant appel aux approches de modélisation par docking moléculaire. Ces méthodes permettent de rechercher *in silico* le mode d'interaction le plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur (cible thérapeutique) ce qui aide à la prédiction de molécules en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser les composés.

L'objectif essentiel de notre travail est, dans un premier temps, d'évaluer la performance du programme de docking « Surflex » en calculant le coefficient de corrélation linéaire entre les scores de docking des inhibiteurs de la Bêta-Lactamase et les valeurs expérimentales de leur IC₅₀.

Dans un second temps, nous avons apporté des substitutions structurales sur un inhibiteur approuvé choisi selon des critères particuliers dont son score élevé et sa faible IC₅₀. Ces substitutions consistent à introduire sur la structure de départ, de nouveaux groupements chimiques fonctionnels ayant la capacité d'établir des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme considérée. Le docking moléculaire des structures substituées envers le site actif de la Bêta-Lactamase nous permettra de faire ressortir les inhibiteurs les plus puissants et sélectifs vis-à-vis de l'enzyme étudiée.

Enfin, l'application de la règle de Lipinski dite « la règle des 5 » nous permettra de vérifier la biodisponibilité des inhibiteurs proposé

Chapitre 1

Résistance aux Antibiotiques et Bêta-Lactamases

1. Bêta-Lactamines :

Les antibiotiques utilisés en thérapie sont pour une part d'origine naturelle et sont produits par des microorganismes (bactéries, champignons dont : *Penicillium chrysogenum*, *Cephalosporium acremonium*, souches de *Streptomyces...*). Cependant, la plupart d'entre eux peuvent subir des modifications chimiques pour donner des composés semi-synthétiques ou sont synthétisés par voie chimique. La famille la plus répandue est celle des Bêta-Lactamines. Il s'agit d'antibiotiques à effet antibactérien ayant une structure de base contenant un noyau Bêta-lactame constituant ainsi la partie active de la molécule. Le cycle Bêta-Lactame comprend trois (03) atomes de carbone, un atome d'oxygène et un azote et qui se ferme par une liaison entre la fonction carbonyle et l'azote [10] (voir figure N°1).

Ainsi, les modifications apportées à la chaîne latérale greffée au cycle Bêta-Lactame vont changer les propriétés de l'antibiotique [11].

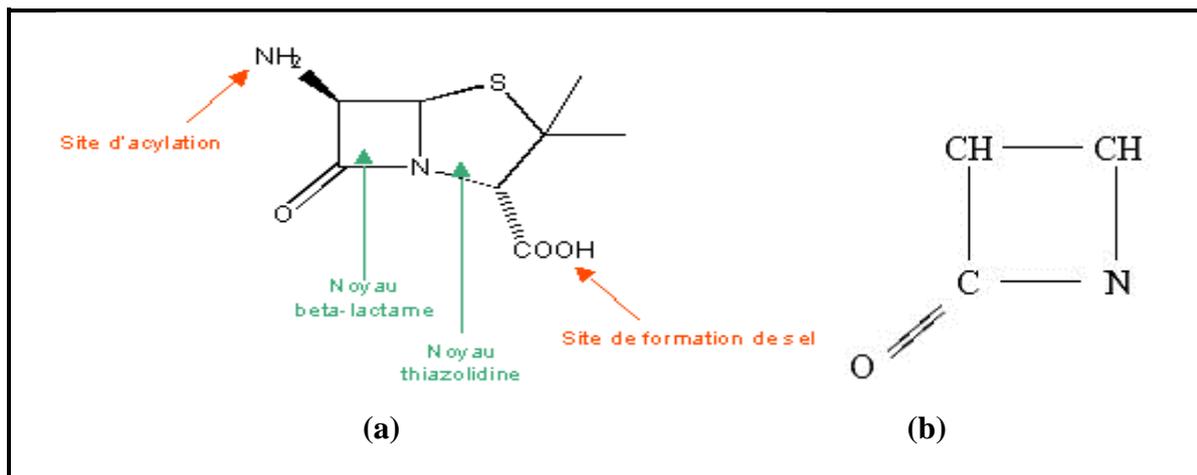


Figure N°1 : (a) : structure d'un Bêta-Lactamine, l'acide 6-aminopénicillanique. (b) : structure du noyau Bêta-Lactame [12].

Selon leur structure, on distingue différentes classes de Bêta-Lactamines : [11]

- a- Pénams = Pénicillines ;
- b- Céphalosporines ;
- c- Monobactames ;
- d- Carbapénèmes.

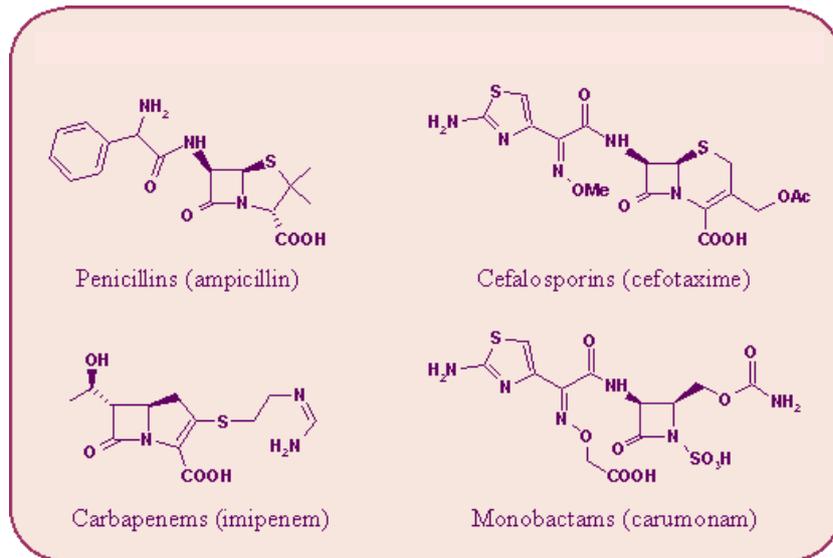


Figure N°2 : Structure générales des différentes classes de Bêta-Lactamines [12].

2. Mécanisme d'action et spectre d'activité des Bêta-Lactamines :

Cette classe d'antibiotique possède une activité bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne en phase de croissance (au début de la synthèse de la paroi). En effet, les Bêta-Lactamines agissent en bloquant la synthèse du peptidoglycane de la paroi par inhibition d'une protéine appelée « Penicillin Binding Proteins PBP » appartenant aux transpeptidases [11].

En vue d'une meilleure couverture contre les bactéries, différentes classes de Bêta-Lactamines sont développées avec un spectre d'activité variable tel que le démontre le tableau N°1. Le spectre d'activité, pour un antibiotique donné, regroupe l'ensemble des bactéries qui y sont sensibles.

Tableau N°1 : Spectre d'activité des différentes classes de Bêta-Lactamines [10].

B-Lactamines	Spectre d'activité
Pénicillines	Cocci et Bacilles Gram positif + Cocci Gram négatif
Monobactames	Bacilles Gram négatif uniquement dont <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Inhibiteurs de β -Lactamases	La plupart des β -Lactamases sauf : Céphalosporinases, MBL
Céphalosporinases 1 G	Cocci Gram positif, quelques bactéries Gram négatif
Céphalosporinases 2 G	Cocci Gram positif, action accentuée sur les Gram négatif
Céphalosporinases 3 G	Bactéries Gram négatif dont <i>P.aeruginosa</i> avec diminution De la couverture pour les Gram positif
Céphalosporinases 4 G	Bactéries Gram négatif dont <i>P.aeruginosa</i> , stables à l'action des céphalosporinases
Carbapénèmes	Bactéries Gram négatif dont <i>P.aeruginosa</i> , stables à l'action de la plupart des Bêta-Lactamases BLSE

3. Résistance aux antibiotiques :

L'usage excessif et non réglementé des antibiotiques a entraîné une propagation étendue de la résistance à ces molécules et une apparition de souches microbiennes résistantes [1] surtout dans les pays où les antibiotiques sont délivrés sans ordonnance, de même dans les pays dépourvus de guides thérapeutiques standardisés où ils sont prescrits excessivement. Dans ces conditions, les bactéries ont pu développer des mécanismes pour échapper à l'action fatale des antibiotiques : on parle alors de la résistance [2]. Outre leur utilisation en santé humaine, l'emploi des anti-infectieux à usage vétérinaire comme traitement curatif ou préventif a été accentué pour intensifier la production animale. Ces médicaments donnent lieu, après leur administration, à des résidus dans les tissus ou les aliments produits par ces animaux [13]. La résistance aux antibiotiques se manifeste alors après consommation de volailles et autres produits de la viande pour lesquels les antibiotiques sont utilisés à l'élevage animalier comme accélérateurs de croissance (engraissement) [14].

La présence de résidus de médicaments vétérinaires, notamment les antibiotiques, dans les denrées d'origine animale et l'absence de législation qui organise le marché des médicaments vétérinaires ont contribué au développement de l'antibiorésistance vue que certains sont utilisés comme facteurs de croissance administrés à faibles doses dans l'alimentation animale [13].

Cette résistance date depuis bien longtemps, au début des années 1940, après commercialisation des Pénicillines et qui s'est traduit par l'isolement de souches de *Staphylococcus aureus* pénicillino-résistantes exprimant et sécrétant des Bêta-Lactamases [1]. Une bactérie qui continue à se développer en présence d'un antibiotique donné (ou de plusieurs) est résistante à ce dernier [4] et l'effet antibactérien de l'antibiotique ne se manifeste pas en cas d'infection [14].

Plusieurs définitions : bactériologique, clinique et génétique ont été proposées par un comité d'expert de l'OMS pour définir la résistance aux antibiotiques [15] :

- a-** Un germe est dit résistant quand la concentration d'antibiotique qu'il est capable de supporter est notablement plus élevée que celle qu'il est possible d'atteindre *in vivo* ;
- b-** Une souche microbienne ou une bactérie sont aussi dites résistantes quand elles supportent une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce ou de la même culture ;
- c-** Une bactérie résistante est une bactérie qui échappe au traitement ce qui conduit à un échec clinique ;
- d-** La présence de gènes de résistance au sein d'une bactérie définit la résistance de cette dernière.

3.1. Types de résistance aux antibiotiques :

La résistance des bactéries aux antibiotiques peut être de deux (02) types : naturelle ou acquise.

3.1.1. Résistance Naturelle = Innée :

Dans ce type de résistance, le patrimoine génétique joue le grand rôle et rend toutes les souches d'une même espèce bactérienne insensibles à l'action d'un antibiotique donné. Donc, le support génétique de cette résistance est le chromosome bactérien (concerne la résistance envers un seul antibiotique). Dans ce type de résistance nous citons à titre d'exemples : *Escherichia coli* vis-à-vis de la Vancomycine, *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'Ampicilline et *Mycobacterium tuberculosis* face à plusieurs antibiotiques [2, 4].

3.1.1.1. Résistance enzymatique innée :

Ce type de résistance s'installe suite à la synthèse d'une enzyme appelée : Bêta-Lactamase, inactivant les Bêta-Lactamine (Pénicilline, Céphalosporine, Imipénème...) [16] comme le montre la figure N°3.

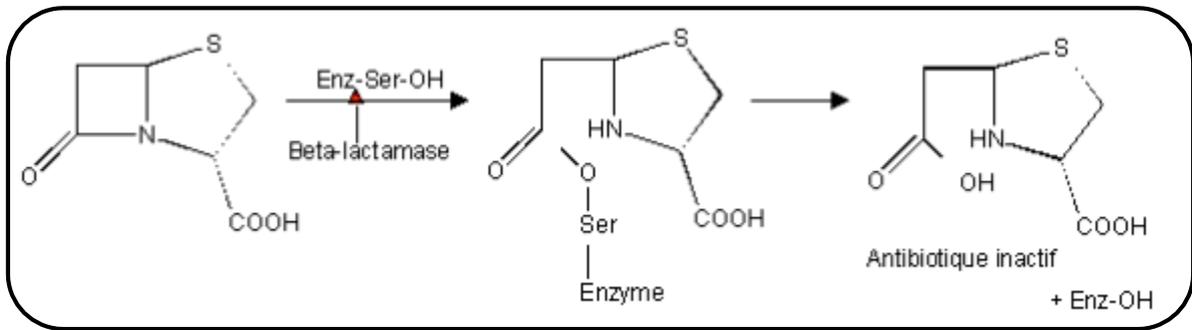


Figure N°3 : Inactivation enzymatique des Bêta-Lactamines par les Bêta-Lactamases [11].

3.1.1.2. Résistance non enzymatique innée :

Elle s'observe chez les bactéries possédant des protéines liant la Pénicilline « PBP » et ayant naturellement une faible affinité pour les molécules Bêta-Lactamines. Exemple : les Streptocoques D « *Enterococcus* », *Staphylococcus aureus* [16].

3.1.2. Résistance acquise :

Se traduit par l'apparition soudaine d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques dont la souche bactérienne est naturellement sensible. Elle représente le type le plus répandu (80 %), soit via une mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique, le plus souvent un plasmide porteur d'un ou de plusieurs gènes de résistance lors des phénomènes de transfert horizontal de matériel génétique entre les souches bactériennes. La résistance dans ce cas concerne plusieurs antibiotiques à la fois [2].

3.1.2.1. Résistance enzymatique acquise :

Se traduit par l'acquisition d'un gène codant pour des enzymes inactivant des antibiotiques appelées : Bêta-Lactamase (Pénicilline, Céphalosporine, BLSE...) au moyen d'un support génétique mobile dont les plasmides [16].

3.1.2.2. Résistance non enzymatique acquise :

Ce type de résistance s'installe soit par modification de la cible de l'antibiotique (récepteur) chez les Gram Positif (*Streptocoques alpha-hémolytiques*, *Pneumocoques*, *Entérocoques*, *Haemophilus...*) soit par réduction de l'affinité pour les Bêta-Lactamines en synthétisant de PBP supplémentaires ayant une faible affinité pour toutes les molécules Bêta-Lactamases : *Staphylococcus aureus* résistant à l'Oxacilline, soit par modification des transporteurs membranaires des Bêta-Lactamines [16].

3.1.3. Multi-Résistance = Multi-Drug-Resistance « MDR » :

Pour certaines bactéries, la résistance est multiple : on parle de Multi-résistance à plusieurs antibiotiques à la fois. Cependant, cette résistance peut être absolue et on parle alors de Toto-résistance = résistance à tous les antibiotiques existants [2]. Elle concerne au moins trois (03) antibiotiques de différentes classes [5].

Ce problème n'est pas réglé même par la découverte de nouveaux antibiotiques plus efficaces et la multi-résistance s'accroît de plus en plus [4] vue la plasticité du génome bactérien et les transferts horizontaux de matériel génétique entre les différentes espèces bactériennes [5]. La multi-résistance peut être alors acquise et naturelle. Parmi les bactéries pathogènes multi-résistantes, il y a : *Staphylococcus aureus*, *Pneumocoques*, *Acinetobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et bien d'autres Entérobactéries [1].

3.2. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques :

Il existe quatre mécanismes primaires permettant aux bactéries de surmonter les antibiotiques Bêta-Lactamines :

3.2.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique Bêta-lactame :

La production d'enzymes dont les Bêta-lactamases est le mécanisme de résistance le plus fréquent. Ces enzymes sécrétées dans le périplasme désactivent les antibiotiques Bêta-lactames [17] (voir figure N°4).

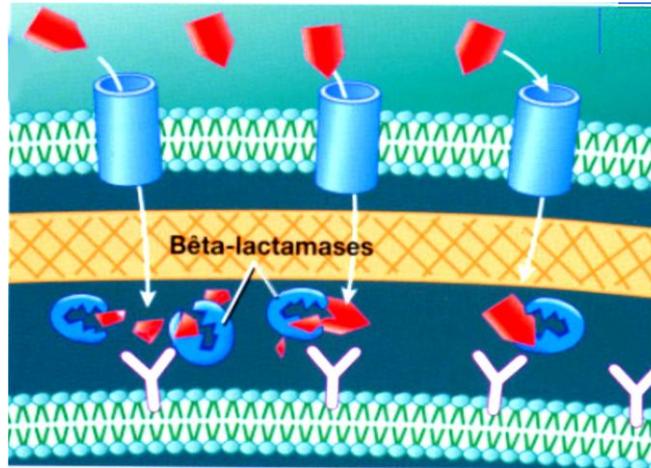


Figure N°4 : Inactivation enzymatique par les Bêta-Lactamases de l'antibiotique Bêta-Lactame [18].

3.2.2. Modification de la cible :

La modification du site actif des PBP pouvant diminuer l'affinité pour les antibiotiques Bêta-Lactames et augmenter ainsi la résistance à ces agents [17].

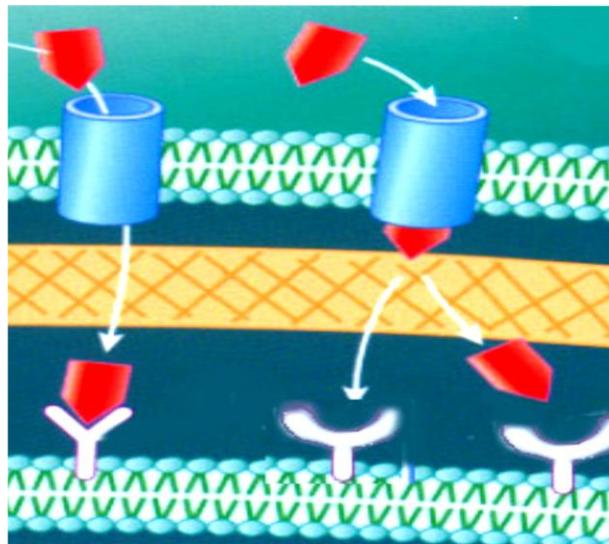


Figure N°5 : Modification du site des PBP liant les antibiotiques Bêta –Lactame [18].

3.2.3. Altération de la production des porines :

Empêchement de l'entrée des Bêta-lactames à l'intérieur des bactéries par diminution de la production de protéines membranaires externes ou par production de protéines anormales [19].

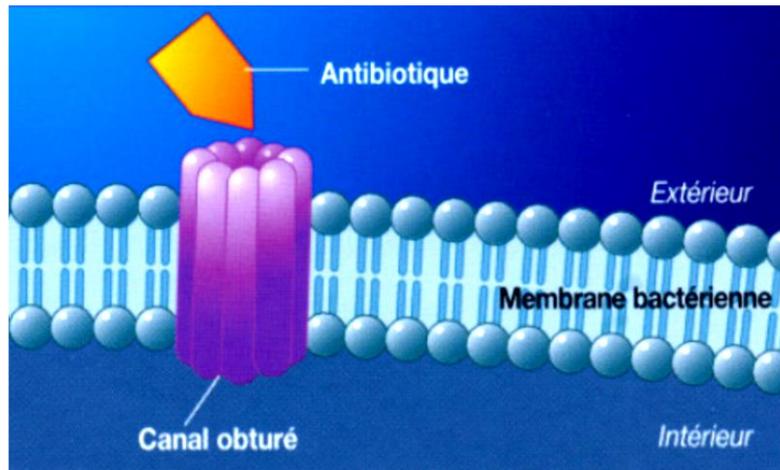


Figure N°6 : Altération de la production des porines membranaires [18].

3.2.4. Efflux actif des Bêta-Lactames :

Dans les pompes d'efflux de bactéries Gram-négatives, les Bêta-Lactames sont exportées à l'extérieur des cellules à travers la membrane externe dans le périplasma. L'antibiotique ainsi rejeté n'atteint jamais sa cible [19].

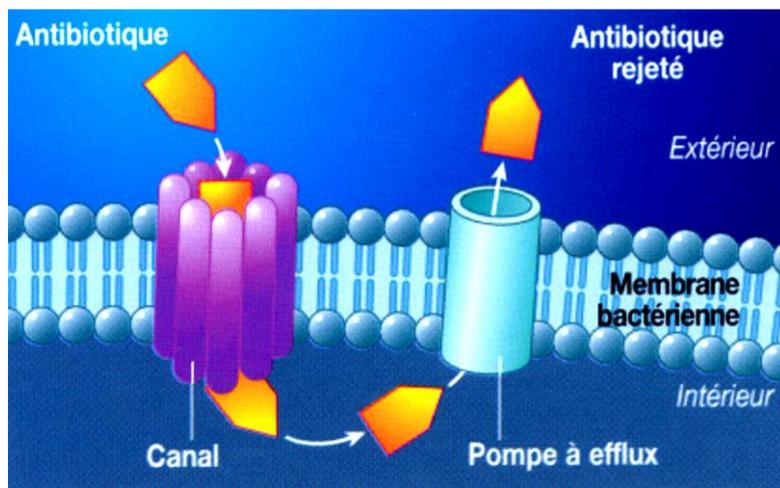


Figure N°7 : Efflux actifs à travers les pompes des antibiotiques Bêta-Lactamines [18].

4. Les Bêta-Lactamases :

Les Bêta-Lactamases sont des enzymes bactériennes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle Bêta-Lactame des antibiotiques de la famille des Bêta-Lactamines. Les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique. Ces dernières sont exportées dans le milieu extracellulaire (bactéries à Gram positif) ou périplasmique (bactéries à Gram négatif) [20]. Actuellement, plus de 850 Bêta-Lactamases sont identifiées et la forte fréquence de mutation permet probablement aux bactéries de s'adapter aux nouvelles Bêta-lactames par l'évolution de ces Bêta-lactamases [17].

Il est à noter que ces enzymes se caractérisent par une plasticité extraordinaire, de telle sorte qu'elles finissent toujours par réussir à hydrolyser les nouveaux antibiotiques. Une autre stratégie consiste dès lors à mettre au point des inhibiteurs de Bêta-Lactamases (Sulbactam, Tazobactam, acide Clavulanique). Ces molécules, de structures voisines aux Bêta-Lactames, lient de façon irréversible la Bêta-Lactamases, empêchant leur action ultérieure sur l'antibiotique co-administré [11].

4.1. Classification :

Les Bêta-Lactamases peuvent être regroupées en fonction de la nature des acides aminés constituant leur site actif. Dans ce type de classification (appelée classification d'Ambler), on distingue quatre classes de Bêta-Lactamases à savoir : A, B, C et D. Celles appartenant aux classes A, C et D, également appelées Sérine-Bêta-Lactamases, comme leur nom indique, se servent d'un résidu Sérine pour la désactivation des Pénicillines, des Céphalosporine et des Oxacillines respectivement [21]. Les Bêta-Lactamases de classe B, aussi appelées Métallo-Bêta-Lactamases « MBL », possèdent un ion métallique de Zinc dans leur site catalytique [17].

Tableau N°2 : Classification des Bêta-Lactamases selon Ambler [22].

Ambler Classification	Caractérisation des bêta-lactamases
C	Souvent des enzymes chromosomiques en gram-négatifs, mais certaines sont codées par un plasmide. Non inhibé par l'acide clavulanique
A	Pénicillines staphylococciques et entérocoques
	Les Bêta-Lactamases à large spectre incluant TEM 1 et SHV1, principalement en gram-négatifs
	Les Bêta-Lactamases à large spectre (ESBL)
	TEM-Bêta-Lactamases résistant aux inhibiteurs (IRT)
	Enzymes hydrolysant la carbénicilline
	Enzymes hydrolysant la Cloxacilline (oxacilline)
	Céphalosporines inhibé par l'acide clavulanique
	Enzymes d'hydrolyse de carbapénème inhibées par l'acide clavulanique
B	Métallo-enzymes qui hydrolysent les carbapénèmes et autres Bêta-lactames à l'exception des monobactames. Non inhibé par l'acide clavulanique
D	Des enzymes diverses qui ne correspondent pas à d'autres groupes

4.2. Microorganismes producteurs de Bêta-Lactamases :

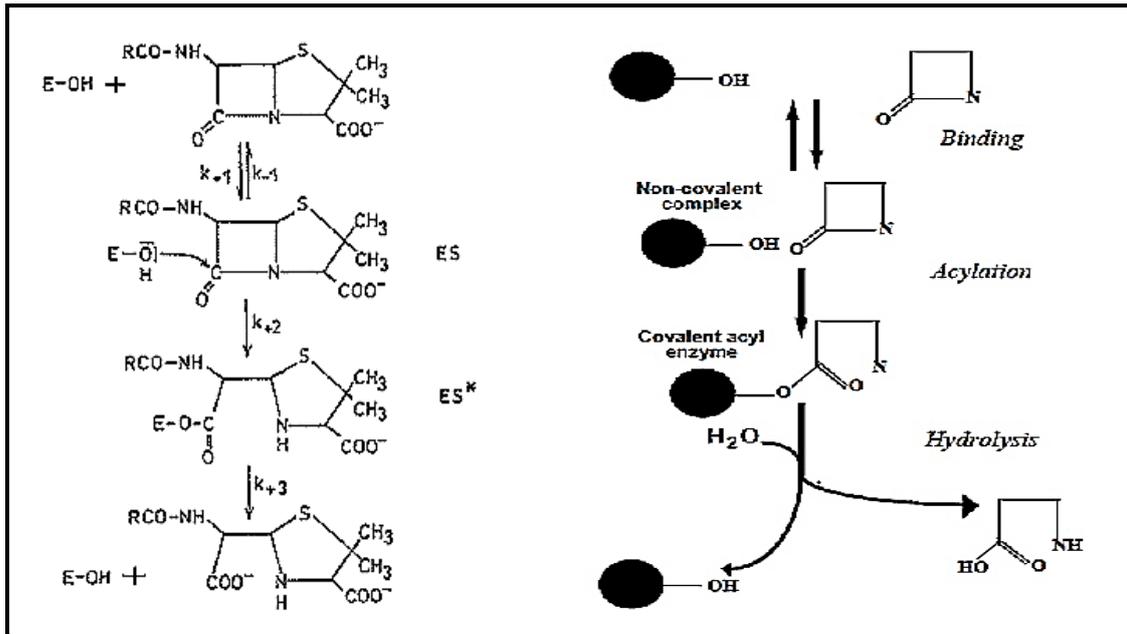
Les Bêta-Lactamases sont produites aussi bien par les bactéries Gram négatif que positif. Le tableau N°3 regroupe quelques microorganismes producteurs de ces enzymes.

Tableau N°3 : Les microorganismes producteurs de Bêta-Lactamases [6].

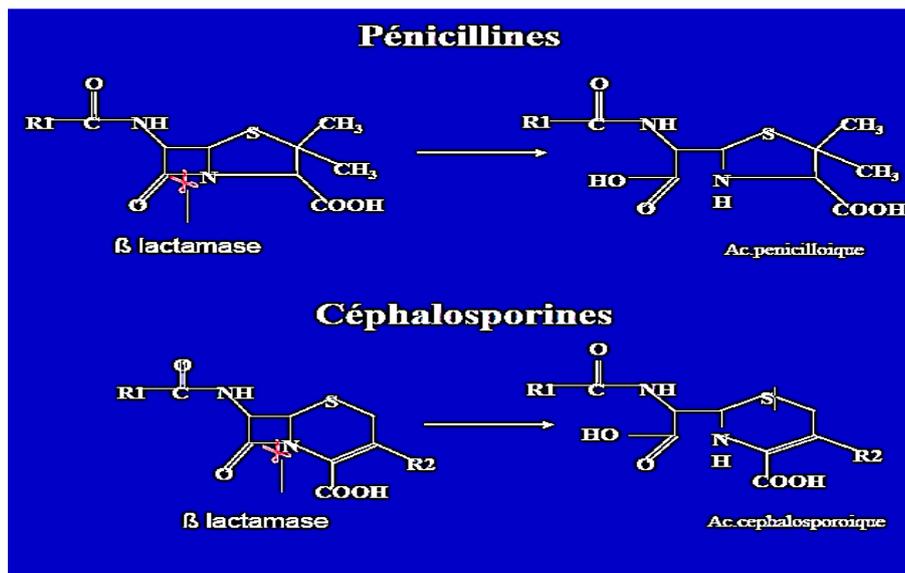
Classe	Exemple	Type de bactéries	Localisation	
A	TEM	Gram -	Plasmide	
		Gram -	Plasmide	
	CARB	Gram -	Plasmide	
		<i>Bacillus licheniformis</i>	Gram +	Chromosome
		<i>Bacillus cereus I</i>	Gram +	Chromosome
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	Chromosome / plasmide
		<i>Streptomyces albus G</i>	Gram +	Chromosome
		<i>Streptomyces cacaoi ULG</i>	Gram +	Chromosome
		<i>Actinomadura R39</i>	Gram +	Chromosome
B	<i>Bacillus cereus II</i>	Gram +	Chromosome	
	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Gram -	Chromosome	
	<i>Xanthomonas maltrophilia</i>	Gram -	Chromosome	
	<i>Bacteroides fragilis</i>	Gram -	Chromosome	
	<i>Serratia marcescens</i>	Gram -	Chromosome / plasmide	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	Plasmide	
C	<i>Escherichia coli K 12</i>	Gram -	Chromosome	
	<i>Citrobacter freundii</i>	Gram -	Chromosome	
	<i>Serratia marcescens</i>	Gram -	Chromosome	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram -	Chromosome	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	Chromosome	
D	OXA	Gram -	Plasmide	
	PSE-1	Gram -	Plasmide	

4.3. Mécanisme de résistance induit par les Bêta-Lactamases :

La plupart des bactéries peuvent produire des enzymes modifiant chimiquement l'antibiotique Bêta-Lactame : seules les Bêta-Lactamases sont impliquées dans le phénomène de résistance. Les Sérine Bêta-lactamases catalysent le clivage de la liaison amide du cycle Bêta-lactame par l'intermédiaire d'un résidu Sérine de leur site actif. Les produits obtenus après l'ouverture irréversible du noyau Bêta-lactame sont complètement dépourvus d'activité antibactérienne. De ce fait, les Bêta-Lactamases actuelles représentent une véritable menace pour l'efficacité des antibiotiques Bêta-lactames [6]. La figure N°8 (a) et (b) ci-dessous représente les mécanismes de désactivation des Bêta-Lactamines par les Bêta-Lactamases.



(a)



(b)

Figure N°8 :(a) : Mécanismes de la désactivation enzymatique des Bêta-Lactamines par les Bêta-Lactamases [22]. (b) : Désactivation des Pénicillines et des Céphalosporines par les Bêta-Lactamases [23].

Les Bêta-Lactamases interagissent avec l'antibiotique Bêta-Lactame pour former un complexe non covalent au départ. Le carbonyle du cycle Bêta-Lactame est attaqué dans une étape d'acylation par le groupement hydroxyle du résidu Sérine du site actif enzymatique,

l'ensemble est lié par covalence. Enfin, une molécule d'eau préalablement activée ou déprotonnée par un acide aminé (Lys, Glu ou Tyr) entraîne la dissociation du complexe formé et libère des composés acides inactifs (voir figure N°8b).

5. Structure des Bêta-Lactamases :

Les Bêta-Lactamases représentant un type d'enzymes bactériennes capables d'hydrolyser le noyau Bêta-lactame sont identifiées chez la plupart des bactéries Gram négatif [10]. Cette action lytique se caractérise par l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame des Bêta-Lactamines formant ainsi un acyl-enzyme, qui sera dégradé en acide inactif comme le montre la Figure N° 8 (b) [10]. Ces enzymes présentent un grand degré de diversité avec un profil catalytique semblable. Les Bêta-Lactamases appartenant aux classes A, C et D présentent un grand degré d'homologie structurale et descendent de ce fait d'un ancêtre commun et sont regroupées dans les Bêta-Lactamases à Sérine active alors que celles appartenant à la classe B sont regroupées à part dans la classe des MBL car elles ont un ion métallique de Zinc dans leur site actif qui participe dans la lyse du cycle Bêta-lactame [10]. Pour une classe donnée, le site actif contient quelques chaînes peptidiques qui diffèrent d'un type à un autre au sein de cette classe [6].

5.1. Données structurales et moléculaires :

Les Sérine Bêta-Lactamases sont des protéines globulaires monomériques possédant 11 hélices alpha et 5 feuillets bêta [8] ayant un poids moléculaire moyen de 34 à 40 KDa avec un point isoélectrique entre 7 et 9 [24].

Les Sérine Bêta-Lactamases AmpC appartiennent à la classe C et sont appelées « Céphalosporinases » car elles sont résistantes au Céfazoline, Céfoxitine et à bien d'autres Céphalosporines et Pénicillines. Elles sont codées par le gène AmpC-BL (bla_{AmpC}) porté par le chromosome bactérien ou plasmidique de *Pseudomonas aeruginosa* et de plusieurs Entérobactéries. Le gène chromosomique bla_{AmpC} produit un taux faible de ces enzymes (gène réprimé). Cependant, son taux de production d'enzyme AmpC est augmenté suite à la présence d'inducteurs dont Céfotaxime de la famille des Céphalosporines [25, 26].

L'étude de la structure tertiaire de ces enzymes montre l'existence de deux (02) domaines : un ne contient que des hélices alpha et l'autre est formé d'un mélange alterné d'hélice alpha et de feuillet bêta [24, 26].

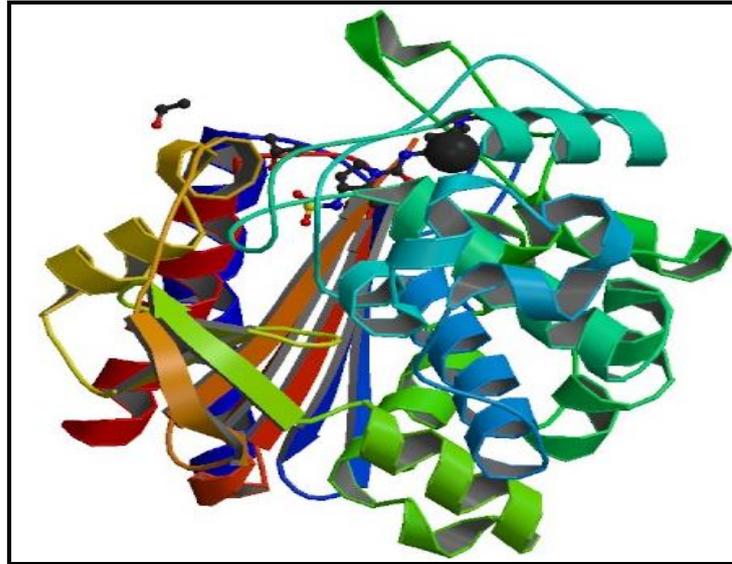
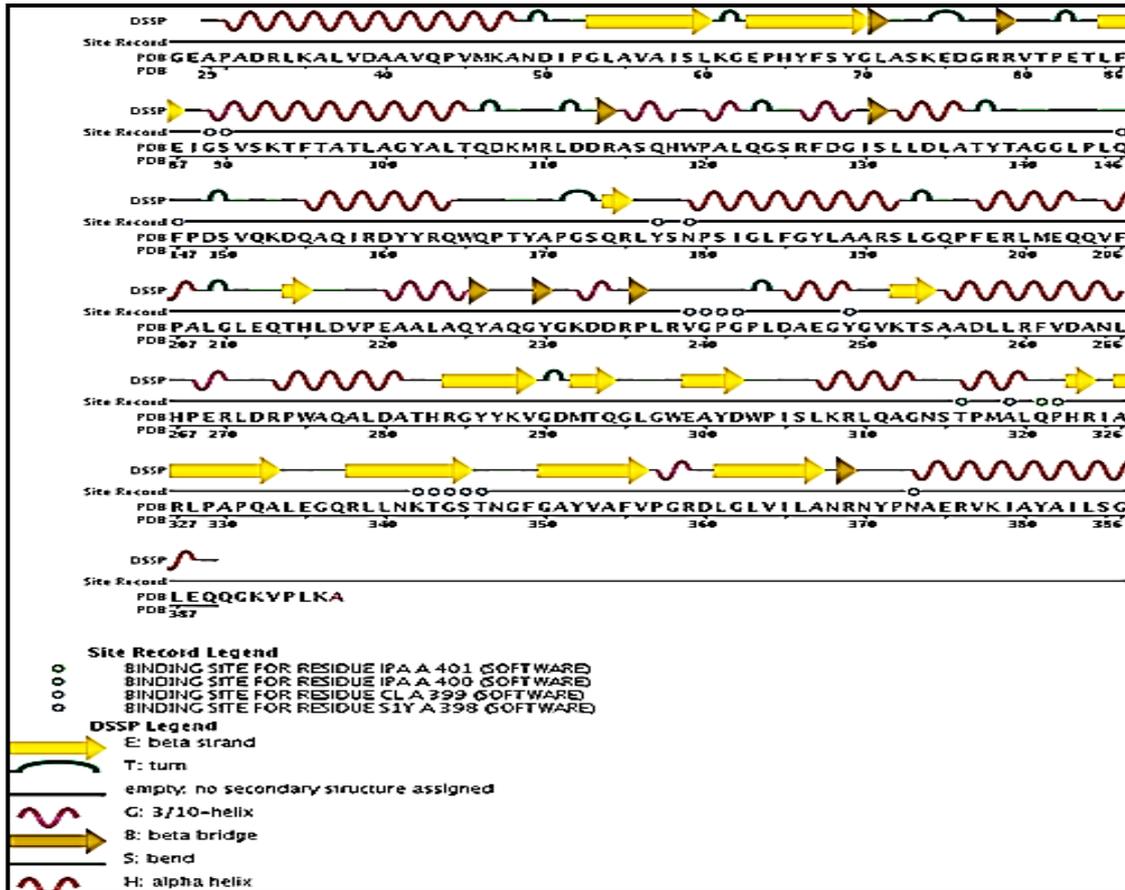
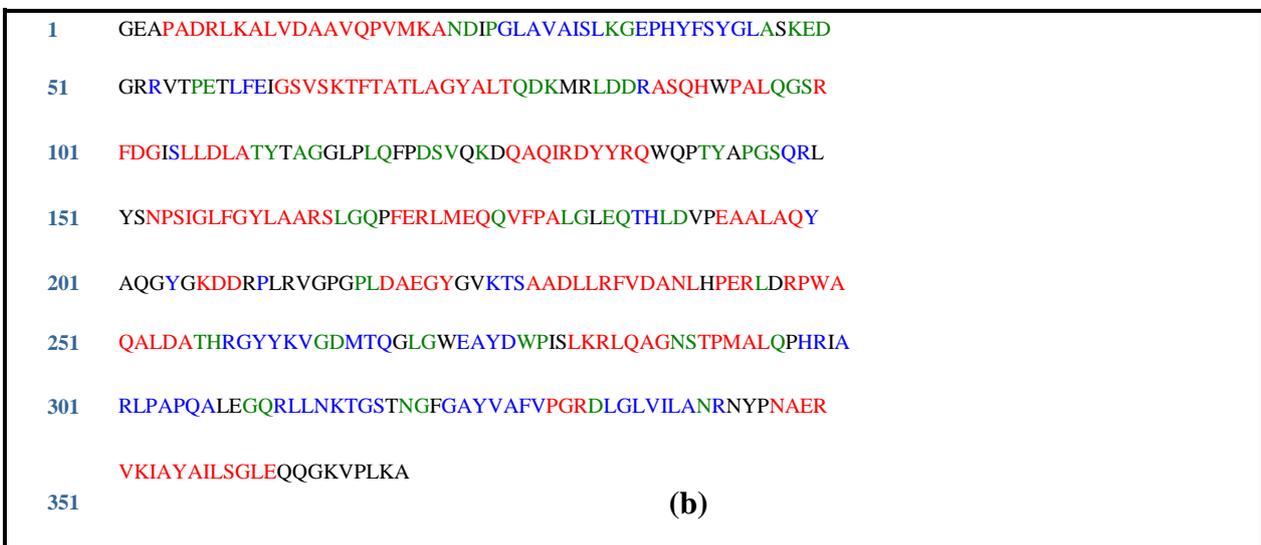


Figure N°9 : Structure cristallographique de la Bêta-Lactamase AmpC en combinaison avec son ligand pdb [27].

La banque de données PDB nous a fourni des détails supplémentaires sur cette protéine notamment sa structure secondaire (hélice α + feuillet β) ainsi que sa séquence protéique qui indique qu'elle est constituée d'une séquence de 371 résidus d'acides aminés (voir figures N°9 et 10) [27].



(a)



(b)

Figure N°10 : Structure secondaire (a) et Séquence protéique (b) de la Bêta-Lactamase AmpC [27].

5.2. Site Actif :

La structure tertiaire en sandwich des Sérine Bêta-Lactamases dont les Céphalosporinases AmpC montre que le site actif se trouve dans l'espace existant entre les deux (02) domaines décrits de cette structure au centre de l'enzyme au bord gauche du feuillet β à cinq fragments avec le résidu Sérine réactif à l'extrémité amino de l'hélice α centrale [24, 26]. Le site d'interaction est plus ouvert que celui de la classe A reflétant sa plus grande capacité à accueillir les chaînes latérales plus volumineuses de Céphalosporines [26]. Le site actif contient quatre (04) éléments contenant des séquences d'acides aminés fonctionnels ou conservés. Dans l'élément 1, il y a la tétrade Lys-X-X-Ser (X = acide aminé variable). L'élément 2 est une triade d'acides aminés Asp-X-Tyr. L'élément 3, est une triade également formée de : Gly-Thr-Lys alors que l'élément 4 est formé d'un seul acide aminé Glu.

L'ensemble de ces éléments constituant les Sérine Bêta-Lactamases participe directement ou indirectement dans l'inactivation des Bêta-Lactamines [24].

Tableau N°4 : Les résidus d'acides aminés constituant les éléments conservés du site actif des Sérine-Bêta-Lactamases [24].

Classes de Bêta-Lactamase	Eléments			
	1	2	3	4
A	KXXS	NDS / SDS	KTG / KRS	E
C	KXXS	YXN	KTG	nd
D	KFTS	YAN	KTG	nd

Avec :

Nd : non déterminé, **K**: Lysine, **S**: Serine, **F**: Phenyl-alanine, **T**: Threonine, **N**: Asparagine, **D**: acide aspartique, **Y**: tyrosine, **A**: Alanine, **G**: Glycine, **R**: Arginine, **E**: acide glutamique, **X**: acide aminé variable.



Figure N°11 : Structure 3D de la Bêta-Lactamase AmpC isolée d'*Escherichia coli* et liant Ceftazidime [26].

Les résidus clés du site actif dans la protéine pliée en plus du résidu Ser64 pour la classe C de ces enzymes comprennent Lys67, Tyr150, Asn152, Lys315 et Ala318 [26].

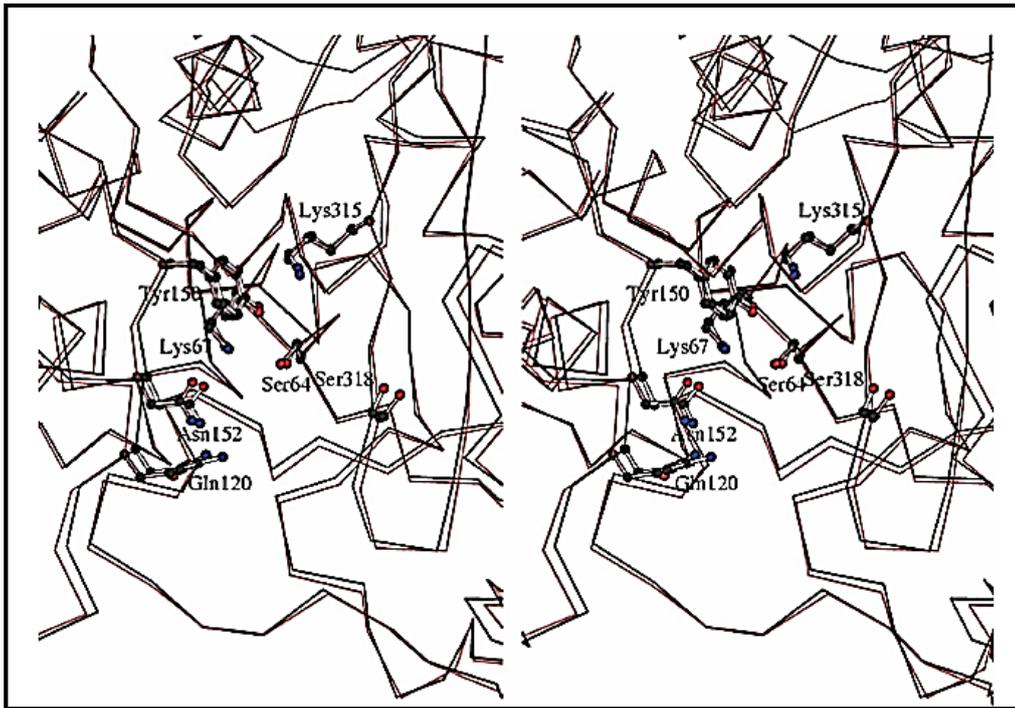


Figure N° 12 : Site actif d'un type de la Bêta-Lactamase P99 de classe C d'*Enterococcus cloacae* [28].

Il ressort que les Bêta-Lactamases AmpC sont des Céphalosporinases cliniquement importantes codées par le chromosome de nombreuses Entérobactéries. Elles confèrent une résistance aux Céphalosporines, aux Pénicillines et à de nombreux inhibiteurs de Bêta-Lactamases d'où nécessité de leur étude dans le présent travail en faisant appel au Docking moléculaire et ce pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de l'enzyme en question.

6. Epidémiologie :

Durant les dix dernières années, la résistance aux antibiotiques est déclarée comme un problème majeur de la santé publique en Algérie en particulier chez les bactéries à Gram négatif. Elle est dominée par la production de Bêta-Lactamases à spectre étendu (BLSE) [3].

Le tableau N°5 résume les différentes souches bactériennes productrices de Bêta-Lactamase au nord de l'Algérie.

Tableau N°5 : Souches bactériennes productrices de différents types de Bêta-Lactamases au nord de l'Algérie. [3].

Espèces concernées	Enzymes décrites	Lieu
<i>Salmonella senftenberg</i>	CMY-2	NP
<i>Proteus mirabilis</i>	CMY-12	Constantine
<i>Providencia stuartii</i>	VEB-1	Alger
<i>Salmonella enterica</i>	CTX-M-3	Constantine
Enterobacteriaceae	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Béjaia
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Alger
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>E. coli</i>	CTX-M-15	NP
<i>S. enterica</i>	CTX-M-15	NP
<i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	NP
<i>E. cloacae</i>	CTX-M-15	Béjaia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TEM-110	Tlemcen
<i>E. cloacae</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15 ; SHV-12 ; VEB-1	Alger ; Tizi-Ouzou ; Tlemcen
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Alger
<i>S. enterica</i>	CTX-M-14	Tizi-Ouzou
Enterobacteriaceae	CTX-M-15 ; SHV-12 ; CMY-2 ; DHA-1	Alger
<i>S. enterica</i>	CTX-M-3	Constantine
Enterobacteriaceae	CTX-M-28	Annaba
<i>Proteus vulgaris</i> ; <i>P. stuartii</i>	PER-1	Alger
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23	NP
Enterobacteriaceae	VIM-19	Alger
<i>E. cloacae</i> ; <i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	NP
<i>A. baumannii</i>	OXA-58	Tlemcen
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15 ; SHV-98 ; SHV-99 ; SHV-100	Alger
<i>S. enterica</i>	CTX-M-15	Constantine
<i>Salmonella non-Typhi</i>	CTX-M-15	Annaba
<i>A. baumannii</i>	NDM-1	NP
<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>E. cloacae</i>	CTX-M-15	Tlemcen
<i>Klebsiella sp.</i> ; <i>Enterobacter sp.</i> ; <i>Serratia sp.</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15 ; SHV-12 ; DHA-1	Annaba
<i>A. baumannii</i>	OXA-23 ; OXA-24	NP
<i>A. baumannii</i>	OXA-23 ; OXA-58	Annaba
<i>A. baumannii</i>	NDM-1	Oran
Enterobacteriaceae	CTX-M-15	Alger
<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>E. cloacae</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Béjaia
<i>S. enterica</i>	CTX-M-15 ; TEM-4 ; TEM-48 ; TEM-188	Alger
<i>A. baumannii</i>	OXA-23 ; OXA-72	Sétif ; Tizi-Ouzou
<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>E. cloacae</i>	CTX-M-3 ; CTX-M-15	Tlemcen
<i>P. aeruginosa</i>	VIM-2	Annaba
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15, SHV-11, SHV-12, SHV-28, SHV-110	NP
<i>A. baumannii</i>	OXA-23 ; OXA-24 ; NDM-1	NP

La figure N°13 démontre la répartition géographique des Bêta-Lactamases au nord de l'Algérie [3].

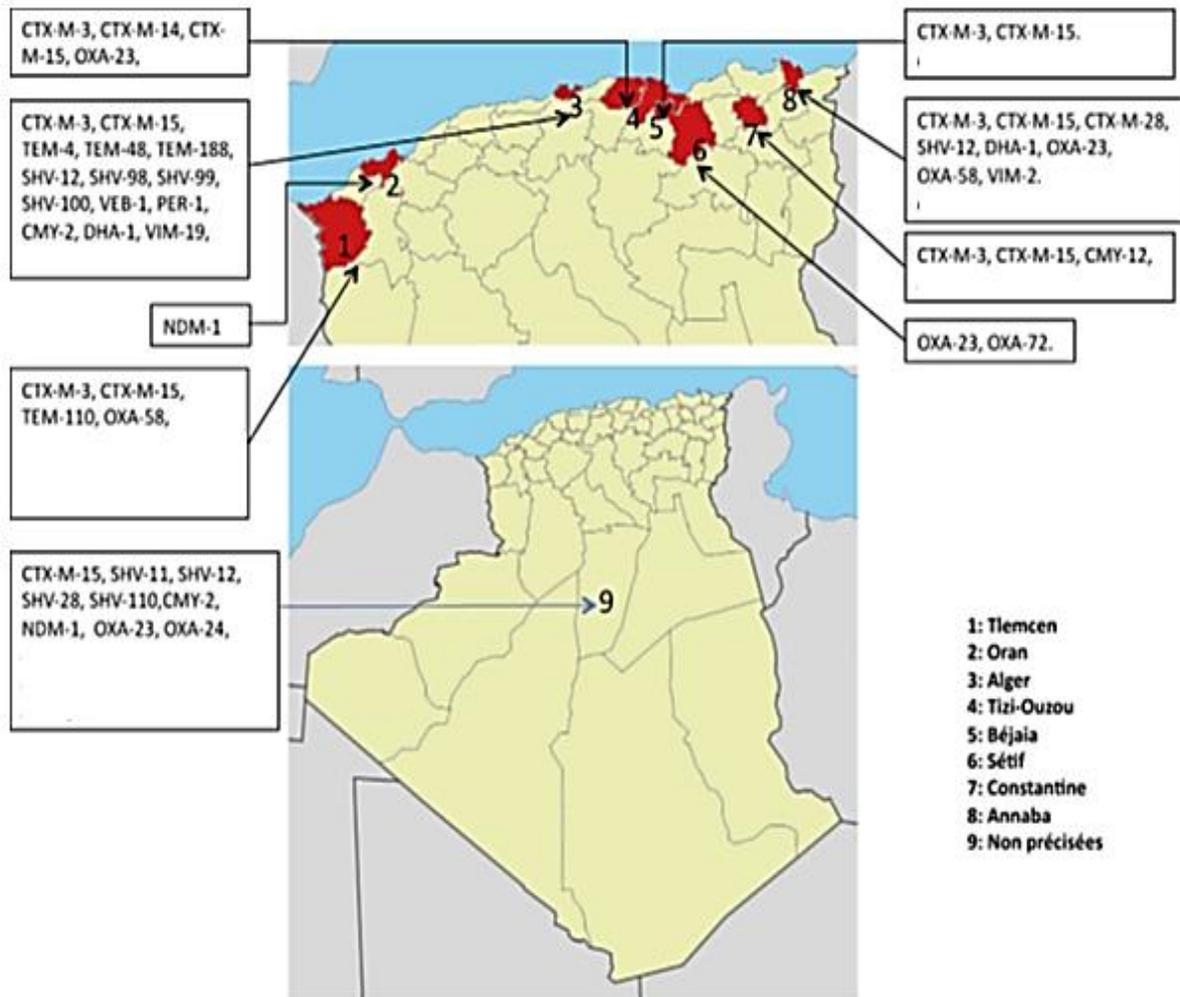


Figure N°13 : Répartition des différentes Bêta-Lactamases dans le territoire algérien et plus particulièrement en Algérie septentrionale [3].

Après réalisation d'une étude sur 140 souches d'Entérobactéries isolées de différents services de centre hospitalo-universitaire de Sidi Bel Abbes entre octobre 2009 et mai 2010, il a été démontré qu'*Escherichia coli* est au sommet des bactéries résistantes (37.1%) suivie de *Klebsiella pneumoniae* (21.4%) puis *Proteus sp.* (19.3%) et enfin *Enterobacter cloacae* (18.6%) [29].

Il en découle que l'analyse des phénotypes de résistance aux Bêta-Lactamines est en faveur d'une dominance des souches productrices de Bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) : 37.1%, pour lesquelles l'origine plasmidique est une source principale dont un plasmide commun de poids moléculaire supérieur à 55 kb [29].

A Constantine, les premiers pneumocoques de sensibilité diminuée ont été décrits et isolés d'infections invasives, chez l'enfant et l'adulte avec un taux de 12%. L'étude a décrit une résistance intermédiaire à la Pénicilline pour la majorité des infections [30].

À Alger, la résistance de 240 souches bactériennes rencontrées en pédiatrie représentait 17% pour la Pénicilline dans les infections invasives et cela dans la période entre 1996 et 2001 contre 49% dans la période allant de 2005 à 2012, ce qui confirme la nette augmentation de la résistance aux antibiotiques notamment les Bêta-Lactamines [30].

Ces chiffres alarmants expliquent les raisons ayant motivé notre choix pour étudier les différents mécanismes d'inhibition des Bêta-Lactamases afin de développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs par Docking moléculaire.

Chapitre 2

Inhibiteurs de Bêta-Lactamases

1. Développement d'inhibiteurs de Bêta-Lactamases et leur combinaison aux antibiotiques Bêta-Lactamines :

La synthèse et la conception de puissants médicaments Bêta-lactames ont été contestées par l'isolement de bactéries synthétisant de nouvelles Bêta-Lactamases avec des capacités d'hydrolyse très élevées confirmant ainsi la plasticité du génome bactérien et le développement continu de résistance vis-à-vis de la plupart des nouvelles molécules de Bêta-Lactamines. Pour lutter contre la résistance aux antibiotiques dont les Bêta-Lactamines, deux stratégies ont évolué. La première approche consiste en la synthèse d'antibiotiques Bêta-Lactames résistants à l'hydrolyse, citons à titre d'exemple : les Céphalosporines de différentes générations, Monobactames et Carbapenemes [8]. La deuxième approche consiste en la mise au point d'inhibiteurs de Bêta-Lactamases couplés aux Bêta-lactames et qui sont capables de se lier au site actif en bloquant la désactivation des Bêta-Lactames [8, 17].

Ces molécules, co-administrées à l'antibiotique Bêta-Lactamine, ont pour la plupart une structure homologue au noyau Bêta-Lactame [16] et vont préserver l'activité des Bêta-Lactamines auxquels ils sont associés [11]. Elles sont d'origine naturelle, semi-synthétique ou sont issues par synthèse chimique. De ce fait, la combinaison antibiotique Bêta-Lactame / inhibiteur Bêta-Lactamase a connu un grand essor et une large utilisation vis-à-vis des cibles thérapeutiques appartenant à différentes classes de Bêta-Lactamases (A, B, C et D) [31, 32].

La figure N°14 illustre le mode d'action des inhibiteurs de Bêta-Lactamase.

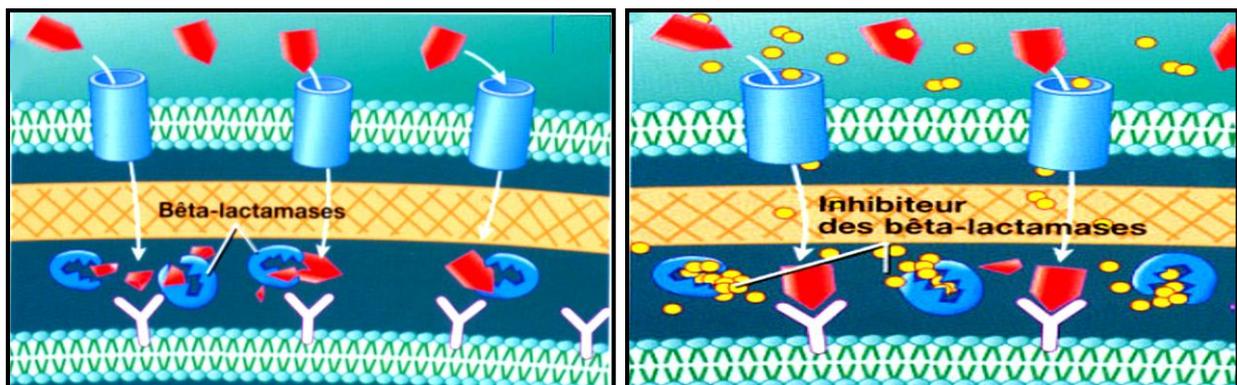


Figure N°14: Mode d'action des inhibiteurs de Bêta-Lactamases [18].

2. Types d'inhibiteurs de Bêta-Lactamases :

Les inhibiteurs des Bêta-Lactamases peuvent être classés soit en fonction de leur structure chimique (contenant ou pas un noyau Bêta-lactame) soit en fonction de leur mode d'action.

2.1. Selon la structure de l'inhibiteur :

Selon leur structure chimique, on distingue deux classes d'inhibiteurs de Bêta-Lactamases :

2.1.1. Inhibiteurs type Bêta-Lactames :

Ces composés approuvés en clinique dès les années 1970 [22] possèdent dans leur structure un noyau Bêta-Lactame mais sont dépourvus de toute activité antibactérienne [16]. Ce type de molécules, également appelées « inhibiteurs suicides », inhibe l'enzyme Bêta-Lactamase en faisant intervenir une liaison covalente (inhibition irréversible) entre l'inhibiteur et le site actif enzymatique. Ainsi, la molécule Bêta-Lactame préserve son rôle antibactérien [31, 32]. Dans cette famille d'inhibiteurs, nous citons l'acide clavulanique (naturellement produit par *Streptomyces clavuligerus*), Sulbactam et Tazobactam [22] agissant principalement sur les Bêta-Lactamases appartenant à la classe A [32].

2.1.2. Inhibiteurs non Bêta-Lactames :

Le développement de ces inhibiteurs a permis d'éviter l'évolution de tout mécanisme de résistance car ces derniers ne contiennent pas dans leur structure de noyau Bêta-lactame et par conséquent ne sont pas hydrolysés par les Bêta-Lactamases [31].

Exemple : Avibactam, les acides boroniques et leurs dérivés, les inhibiteurs protéiques ...etc.

2.2. Selon le mode d'action de l'inhibiteur :

On peut classer les inhibiteurs de Bêta-lactamases en fonction de leur mode d'interaction aux Bêta-Lactamases :

2.2.1. Inhibiteurs Irréversibles :

Les inhibiteurs de cette classe bloquent complètement l'enzyme en faisant intervenir une liaison covalente lors de leur interaction avec le site actif notamment avec l'hydroxyle du résidu Sérine (Enzyme-Ser-OH-Inhibiteur de Bêta-Lactamase) pour les classe A, C et D de Bêta-Lactamases, avec ouverture de la structure cyclique de l'inhibiteur ce qui empêche l'enzyme d'attaquer l'antibiotique Bêta-Lactame. Dans cette classe d'inhibiteurs, nous citons :

a- **L'acide clavulanique** isolé à partir d'une bactérie tellurique *Streptomyces clavuligerus* est le premier inhibiteur utilisé en clinique pratique en association avec l'Amoxicilline. Il désactive les Pénicillinases produites par *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella sp* [22].

b- **Sulbactam** est un inhibiteur synthétique dont l'absorption par voie orale est faible d'où la nécessité de son administration par voie parentérale en association avec l'Ampicilline [22].

c- **Tazobactam** est utilisé en association avec Piperacilline [22].

La Figure N° 15 illustre le mécanisme d'inhibition irréversible de l'acide clavulanique.

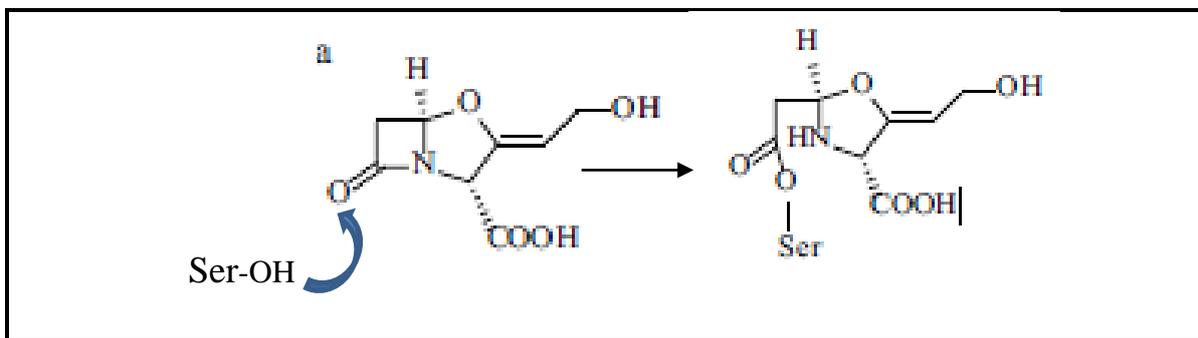


Figure N°15 : Mécanisme d'inhibition induit par l'acide clavulanique sur les Sérine Bêta-Lactamases appartenant aux classes A, C et D [33].

2.2.2. Inhibiteurs Réversibles :

Il s'agit d'inhibiteurs compétitifs se liant au site actif de l'enzyme via de faibles interactions. C'est le cas de l'Avibactam utilisé en association avec les céphalosporines [34, 35]. Il contracte de multiples liaisons hydrogènes avec des résidus d'acides aminés conservés du site actif. Ces liaisons sont dues au groupement sulfate à caractère polaire. L'Avibactam se lie à l'enzyme aussi rapidement que possible et le complexe E-I se dissocie plus lentement offrant ainsi une caractéristique remarquable à cette inhibition [36].

L'anneau de l'Avibactam ouvert conserve une conformation semblable à celle de sa forme native permettant ainsi un mécanisme de régénération pour cet inhibiteur et l'absence d'hydrolyse est une caractéristique unique de ce nouveau inhibiteur approuvé en clinique parmi ceux de Bêta-Lactamases : l'Avibactam régénéré étant intact et compétent pour initier un autre cycle d'inhibition [31, 36] (voir figure N°16).

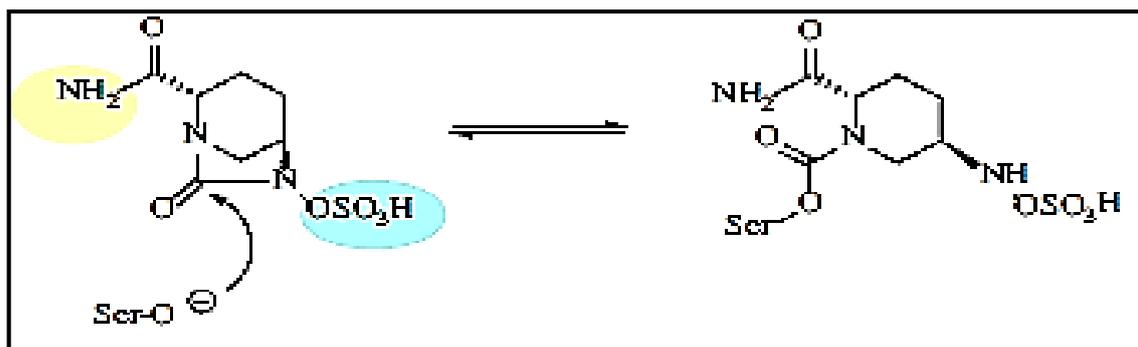


Figure N°16 : Mécanisme d'inhibition induit par l'Avibactam sur les Sérine- Bêta-Lactamases appartenant à la classe A [34].

3. Mécanisme d'inhibition :

Les inhibiteurs des Sérine Bêta-Lactamases (classe A, C et D) agissent pour désactiver l'enzyme considérée en deux (02) étapes successives. Dans un premier temps, l'inhibiteur Bêta-Lactamase est reconnu comme un substrat à l'enzyme Bêta-Lactamase. Cette reconnaissance conduit à la formation d'un complexe Enzyme-Inhibiteur dans un second temps (voir figure N°13). Ainsi, en thérapeutique, l'objectif recherché est la formation permanente du complexe enzymatique inactif Enzyme-Inhibiteur (E-I) [8].

Pour la classe B des Bêta-Lactamases, le mécanisme d'inhibition est différent et les inhibiteurs des Bêta-Lactamases de classe A, C et D sont sans effet sur la classe B. l'inhibition est assurée par plusieurs mécanismes dont la chélation du Zinc au niveau du site actif [24].

4. Combinaison Bêta-Lactame-Inhibiteurs de Bêta-Lactamase :

Pour les antibiotiques type Bêta-Lactames, l'inactivation enzymatique de ces composés est un obstacle pour l'efficacité du traitement, mécanisme par lequel les bactéries deviennent résistantes aux différents antibiotiques. Pour s'opposer à ce processus enzymatique altérant, il est quasiment impératif d'associer à l'agent antibactérien un composé susceptible d'inhiber l'enzyme considérée [7]. La combinaison Bêta-Lactame-Inhibiteur de Bêta-Lactamase a permis l'évolution de l'aptitude à traiter plusieurs types d'infections communes et nosocomiales ainsi que des infections polymicrobiennes [8].

Dans cet usage clinique courant, il y a cinq (05) combinaisons commerciales disponibles très répandues : Amoxicilline-clavulanate, Ticarcilline-clavulanate, Ampicilline-sulbactam,

Piperacilline-Tazobactam et Cefoperazone-sulbactam [17] auxquelles s'ajoute la combinaison Ceftazidime-Avibactam [17]. Ces combinaisons sont mises en œuvre sous forme de compositions pharmaceutiques couramment utilisées en thérapeutique, en mélange avec des excipients inertes et sous différentes formes galéniques avec différentes voies d'administration [7] (Voir Tableau N° 6).

Tableau N°6 : Quelques combinaisons commerciales disponibles de Bêta-Lactame-Inhibiteurs Bêta-Lactamase [37, 38, 14].

INHIBITEURS β-LACTAMASE	COMBINAISON	VOIE D'ADMINISTRATION	COMPAGNIE PHARMACEUTIQUE
Acide clavulanique « AUGMENTIN »	Amoxicilline	Orale, Parentérale	GlaxoSmithKline
TicarcillineParentérale « TIMENTIN »			GlaxoSmithKline
Sulbactam Ampicilline « UNASYN » « SULTAMICILLINE » (pro-drogue)		Orale, Parentérale	Pfizer
Tazobactam « ZOSYN »	Piperacilline	Parentérale Wyeth/Pfizer	
Ceftolozane « ZERBAXA »			
Avibactam « AVYCAZ »	Ceftazidime, Ceftaroline	Parentérale	Allergan

5. Résistance aux inhibiteurs de Bêta-Lactamases :

A l'heure actuelle, les inhibiteurs Bêta-Lactamases développés reconnaissent des cas de résistance et le nombre de ces derniers est en augmentation continue [9].

En effet, après plusieurs années de l'introduction des combinaisons de clavulanate pour usage en clinique pratique, des résistances vis-à-vis de l'Amoxicilline-clavulanate et de Ticarcilline-clavulanate ont été observé dans des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* produisant des Bêta-Lactamases insensibles aux inhibiteurs. Cette résistance peut se traduire par une hyperproduction de Bêta-Lactamases qui est due à une mutation d'une région du gène codant pour ces enzymes et/ou par l'existence d'un nombre élevé de copies de plasmides porteurs du gène *bla* codant pour ce type d'hydrolases [17].

Les causes de l'acquisition de résistance à de telles combinaisons par *Escherichia coli* sont les suivantes :

- ✓ Hyperproduction de Pénicillinases qui est due à la présence de multiples petits plasmides contenant des copies de gène codant pour ces enzymes ;
- ✓ Production excessive de Céphalosporinases AmpC ;
- ✓ Présence d'enzyme type OXA (Oxacillinases) ;
- ✓ Développement de résistance aux inhibiteurs par évolution des enzymes en mutants plus complexes [22].

Dans la classe A de Bêta-Lactamases, des mutations par substitution au niveau de positions particulières d'acides aminés permettent d'expliquer cette résistance notamment : Arg244, Met69, Trp165, Met182, Val216, Arg275 et Asn276. A titre d'exemple, pour l'Arg244 la perte de la charge positive du groupe guanidinium contribue à l'acquisition de cette résistance alors que pour d'autres types de mutation, l'acquisition de charge positive par un autre site confère une résistance à un inhibiteur particulier [8].

1. Les nouveaux inhibiteurs prometteurs de deuxième génération :

Parmi les inhibiteurs naturels produits par *Streptomyces clavuligerus*, il n'y a pas seulement l'acide clavulanique mais également une protéine inhibitrice de Bêta-Lactamases a été mise au point = BLIP= Beta-Lactamase Inhibitor Protein, un puissant inhibiteurs de Bêta-Lactamases de classe A chez les Gram négatifs et positifs et l'étude de l'ingénierie de cet inhibiteur va permettre le développement de nouveaux puissants inhibiteurs [39].

Plusieurs caractéristiques sont considérées et doivent être prises en compte pour l'optimisation du développement de ces nouveaux inhibiteurs après apparition de résistance aux inhibiteurs classiques [17] :

- ✓ Avoir une grande affinité pour le site actif de l'enzyme Bêta-Lactamase cible pour une action efficace qui se traduit par une valeur de K_i et/ou d' IC_{50} très faible. Les inhibiteurs prometteurs sont ceux qui maintiennent une grande affinité vis-à-vis de plusieurs groupes de Bêta-Lactamases, ex : LN-1-255, Phosphonates, etc...;
- ✓ Imiter le substrat naturel dont les analogues de Bêta-Lactames qui sont pour la plupart actifs sur la classe A de Bêta-Lactamases ;

✓ Stabiliser l'interaction au site actif : prolonger l'étape intermédiaire de la liaison Enzyme-Inhibiteur est primordial pour la réussite de l'inactivation par cet inhibiteur, rôle approuvé par Tazobactam et Avibactam (figure N°17) ;

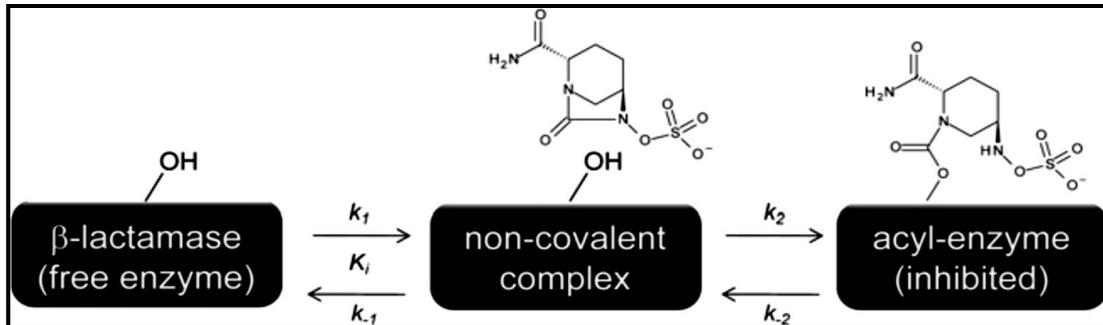


Figure N° 17 : Inhibition de TEM-1 par Avibactam [40].

- ✓ Pénétrer rapidement dans la cellule pour atteindre aussi tôt que possible leurs cibles enzymatique (les Bêta-Lactamases) dans le périplasme ex : BAL30072 ;
- ✓ Faible probabilité d'induction d'expression de Bêta-Lactamases ex : Sulfonamides ;
- ✓ Avoir une bonne corrélation d'inhibition quantifiable à l'échelle cellulaire.

Pour les nouveaux inhibiteurs synthétiques développés, l'acide boronique RPX7009 représente une nouvelle classe d'inhibiteurs non Bêta-Lactames -avec d'autres acides boroniques et leurs dérivés- contre plusieurs classes de Sérine-Bêta-Lactamase en combinaison avec les Meropenemes [9].

La connaissance des détails moléculaires et de l'ingénierie des Bêta-Lactamases permet l'amélioration des interactions entre ces cibles thérapeutiques et leurs inhibiteurs dans le but d'avoir de nouvelles applications pratiques. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition des Bêta-lactamases par différents inhibiteurs, nous avons fait appel aux approches par docking moléculaire et ce dans l'espoir de proposer *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants.

Chapitre 3

DOCKING MOLÉCULAIRE

1. Introduction :

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, allant de l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique jusqu'au patient, dans lequel les essais cliniques succèdent au développement pré-clinique [41].

Avec le développement de la cristallographie aux rayons X et l'outil informatique, les méthodes de modélisation par docking moléculaire sont devenues des étapes cruciales dans de nombreux programmes de développement de nouveaux médicaments. Ces méthodes consistent à rechercher *in silico* le mode d'interaction le plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur. L'avantage majeur de ces méthodes est d'aider à la prédiction de molécules en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser les composés (lorsque ceux-ci proviennent de chimiothèques commerciales) [42].

2. Les outils du Docking moléculaire :

Les éléments indispensables pour pratiquer un docking moléculaire se limitent en un récepteur macromoléculaire de nature protéique appelée : cible, une petite molécule appelée ligand et un programme de docking qui prédit la conformation la plus favorable du ligand au sein du récepteur choisi [41].

2.1. Les Récepteurs :

Pour l'obtention des récepteurs, on utilise les structures 3D des protéines qui sont accessibles gratuitement dans la banque de donnée PDB (Protéine Data Bank). Il s'agit d'une grande archive de données structurales de macromolécules biologiques : protéines et acides nucléiques (ADN, ARN) [42]. Les données structurales sont obtenues par cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMN et sont accessibles gratuitement sur internet via des sites Web définis de ses organisations membres dont : wwPDB, RCSB PDB, PDBj, PDBe,...etc. En mois d'Avril 2017, la PDB compte plus de 129000 structures de bio-macromolécules [27].

Les différentes conformations tridimensionnelles sont téléchargeables sous extension *pdb* lisibles par les logiciels de docking et contenant diverses informations sur la protéine en question. Par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolue la structure, la méthode expérimentale, ...etc. On y retrouve aussi des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée.

Dans certains cas, lorsque la structure 3D de la cible souhaitée n'est pas encore disponible dans la PDB, on doit faire appel dans ce cas à la modélisation par homologie pour construire cette structure à partir d'une protéine avec des séquences similaires [42].

2.2 Le(s) ligand(s) :

Pour un docking moléculaire, le ligand doit être également sous forme 3D. Pour y obtenir, il existe deux moyens :

Le premier moyen consiste à utiliser des programmes de construction moléculaire 3D tels que ChemDraw, Arguslab, Titan, Marvin, Sybyl...etc. [42]. Chacun de ces programmes contient une banque d'atomes permettant de dessiner le ligand tout en tenant compte de l'état d'hybridation de chaque atome et du type de liaisons simple, double ou triples. Ensuite, la géométrie du ligand doit être optimisée à l'aide d'un algorithme semi-empirique.

Le second moyen d'obtenir un ligand 3D est souvent d'aspect commercial, consistant à consulter des banques de données de ligands appelées chimiothèques. Les chimiothèques virtuelles comportent un ensemble d'informations plus ou moins organisées et hiérarchisées regroupant des données (structure, activité, propriétés physico-chimiques...) de différents ligands. Dans ce type de chimiothèques, la structure 3D de chaque composé est enregistrée dans de fichiers avec les formats SMILES, SDF, MOL2 et PDB. Parmi les chimiothèques virtuelles nous citons : La chimiothèque Nationale Française, la chimiothèque ZINC, PubChem.....etc.

2.2.1. PubChem :

C'est une banque de données de molécules chimiques et de leurs bioactivités. Le système est maintenu par le « NCBI » (National Center for Biotechnology Information) des Etats Unis. Cette chimiothèque est consultée gratuitement via une interface utilisateur Web (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Elle contient des descriptions de substances et de petites molécules avec moins de 1000 atomes et 1000 liaisons et offre des données d'ordre chimique, biochimique, pharmacologique, toxicologique...etc. [43].

2.2.2. Drugbank .:

C'est une base de données en ligne (<https://www.drugbank.ca>), accessible gratuitement et contenant des informations sur les médicaments et leurs cibles. Elle est largement utilisée en industrie pharmaceutique et en chimie médicale et combine les données chimiques,

pharmacologiques et pharmaceutiques avec des informations complètes sur le médicament (nomenclature, description, métabolites, séquence des cibles, données sur les brevets, prix,...etc). Sa dernière version est 5.0 contenant 8227 entrées de médicaments [44], [57], [58], [59].

2.3. Programmes :

Pour cribler une chimiothèque d'une dizaine de composés, l'utilisation des méthodes lentes et précises est recommandée (GLIDE, GOLD). Cependant, si le criblage virtuel concerne des millions de produits, il ne pourra pas être accompli avec les algorithmes lents mais plutôt des codes plus simples, dans lesquels les approximations engendrent un gain de temps de calcul (LigandFit, FlexX) [45, 46]. Dans la simulation par Docking, rapidité et précision conditionnent l'obtention d'un résultat correcte pour un nouveau composé lead. Pour cela, plusieurs programmes peuvent être utilisés : DOCK, AUTODOCK, GOLD, FLEXX, ZDOCK, M-ZDOCK, MSDOCK, SURFLEX, MCDOCK et bien d'autres [47, 48].

Le premier algorithme développé pour le docking de petites molécules vis-à-vis du site de liaison d'une macromolécule est l'algorithme DOCK avec ceux les plus largement utilisés : AUTODOCK, GOLD, FlexX et plus récemment : GLID, ICM, FRED et SURFLEX. Tous ces programmes contiennent 02 composantes : un algorithme de docking permettant au ligand d'adopter plusieurs conformations et plusieurs positions au niveau de son récepteur afin de retenir celle la plus favorable. Une fonction de score qui tant à coïncider avec l'énergie libre minimale globale du système cible-ligand et une méthode de recherche utilisée pour positionner l'interface de recherche dans laquelle le score est optimisé [49]. Le Tableau N°7 résume les différents programmes du docking moléculaire.

Tableau N°7 : Les programmes de Docking moléculaire [48].

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

Chapitre 4

Matériel et Méthodes

1. Matériels :

L'objectif essentiel de notre travail de Master est de s'initier aux approches de modélisation par docking moléculaire afin de proposer *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Bêta-Lactamase. Pour ce faire, nous avons utilisé le matériel suivant :

1.1. Microordinateur :

Nous avons utilisé microordinateur ayant une mémoire vive de 4.00 Go et 1.00 Go respectivement. Tous les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7- 64 bits version 2009.

1.2. Programmes :

Plusieurs programmes ont été utilisés pour la réalisation de notre partie pratique :

- Le premier programme utilisé : « **Titan** » version 6.0.2 (1999), nous a permis de construire les ligands issus de la littérature tout en minimisant leur énergie intramoléculaire.
- Concernant le programme du docking moléculaire, nous avons utilisé « **Surflex** » version 1.3 (2005).
- Nous avons utilisé également le programme « **VMD** » (*Visual Molecular Dynamics*), version 1.9.1 (2012), afin de préparer et visualiser aussi bien l'enzyme que les ligands étudiés.
- Le programme « **OpenBabel** » version 2.0.2 nous a facilité l'inter conversion des données chimiques d'un format à un autre de fichiers de divers types (pdb, mol, mol2, sdf, smi...etc).
- Grâce au programme « **ViewerLite** » version 4.2, nous avons pu visualiser les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes formées entre les différents inhibiteurs et le site actif de l'enzyme étudiée.
- Le dernier programme utilisé dans cette étude « **Microsoft Excel 2013** » nous a permis de tracer la courbe de corrélation linéaire servant à tester la fiabilité du programme « Surflex ».

1.3. Banques de données :

Plusieurs collections de données ont été interrogées afin de réaliser notre partie pratique :

- **Protein Data Bank « PDB »** : pour obtenir la structure 3D de la Bêta-Lactamase, objet de notre étude.

- Pubchem et Drugbank : pour rechercher des inhibiteurs de la Bêta-Lactamase.

2. Méthodes :

2.1. Préparation des Ligands :

Les inhibiteurs de la Bêta-Lactamase tirés de la littérature ont été dessinés par le programme Titan en tenant compte de l'état d'hybridation de chaque atome. Par la suite, une étape de minimisation d'énergie intramoléculaire (en appliquant la méthode semi-empirique AM1) est nécessaire afin d'optimiser géométriquement les molécules dessinées. Enfin, les ligands construits sont enregistrés sous format *.pdb*.

2.2. Préparation du Récepteur :

La structure 3D de la Bêta-Lactamase, faisant l'objet de notre étude, a été obtenue via la banque de donnée PDB. Cette dernière nous a proposé 35 structures cristallographiques de complexes Bêta-Lactamases-Inhibiteur, avec une résolution inférieure à 2 Å et appartenant à des classes différentes notamment A, B, C et D (voir annexe N°1).

Parmi ces complexes, nous avons choisi les codes 2ZD8, 1M2X, 3S1Y et 5DTK correspondant respectivement aux classes A, B, C et D de la Bêta-Lactamase (voir tableau N°8). Ce choix est dicté par leur faible valeur de résolution.

Tableau N°8 : Les complexes pdb choisi représentant les classes A, B, C et D avec leur ligand correspondant.

N°	CLASSE β -LACTAMASE / ENZYME	COPMLEXE PDB	LIGAND PDB
08	A (SHV-1)	2ZD8	MER
11	B (MBL- BlaB-1)	1M2X	MCO IC ₅₀ =70 μ M
10	C (AmpC)	3S1Y	S1Y IC ₅₀ = 0.6 μ M
09	D (Oxa-48)	5DTK	5F3

Par la suite, nous avons gardé, pour chaque complexe, la chaîne A uniquement tout en éliminant les molécules d'eau et les différents ligands et ce pour une utilisation plus aisée de l'enzyme lors du docking moléculaire. Les protéines ainsi préparées sont enregistrées dans des fichiers de format *.mol2* que reconnaît le programme Surflex.

A l'aide du programme VMD, nous avons pu définir les résidus d'acides aminés de la cavité catalytique des quatre complexes retenus en visualisant ceux entourant leur inhibiteur de référence dans un périmètre de 6Å. Pour ne prendre que l'exemple du code 3S1Y, les résidus d'acides aminés de la cavité catalytique représentée en mode « Surf » dans la figure N°18 sont les suivants : Ile88, Gly89, Ser90, Val91, Lys93, Leu145, Gln146, Tyr177, Asn179, Val239, Gly240, Pro241, Gly242, Pro243, Asp245, Gly248, Tyr249, Glu299, Asn314, Ser315, Ala319, Lys342, Thr343, Gly344, Ser345, Thr346, Asn347, Asn370, Asn373 et Arg376.

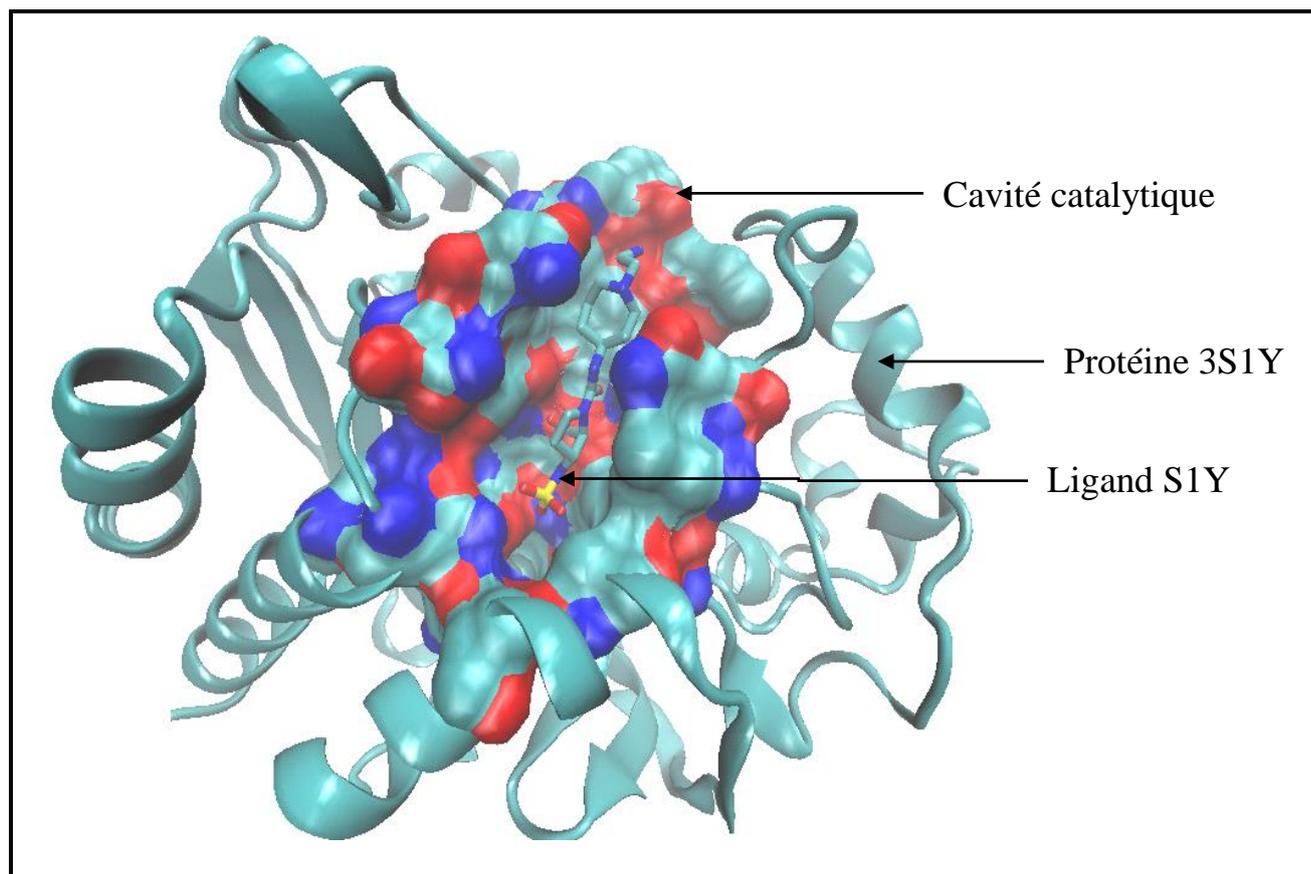


Figure N°18 : Représentation par VMD de la protéine 3S1Y avec le ligand pdb S1Y positionné dans la cavité catalytique.

Les quatre ligands de référence correspondant aux quatre protéines préparées 3S1Y, 2ZD8, 5DTK et 1M2X sont représentés dans la figure N°19.

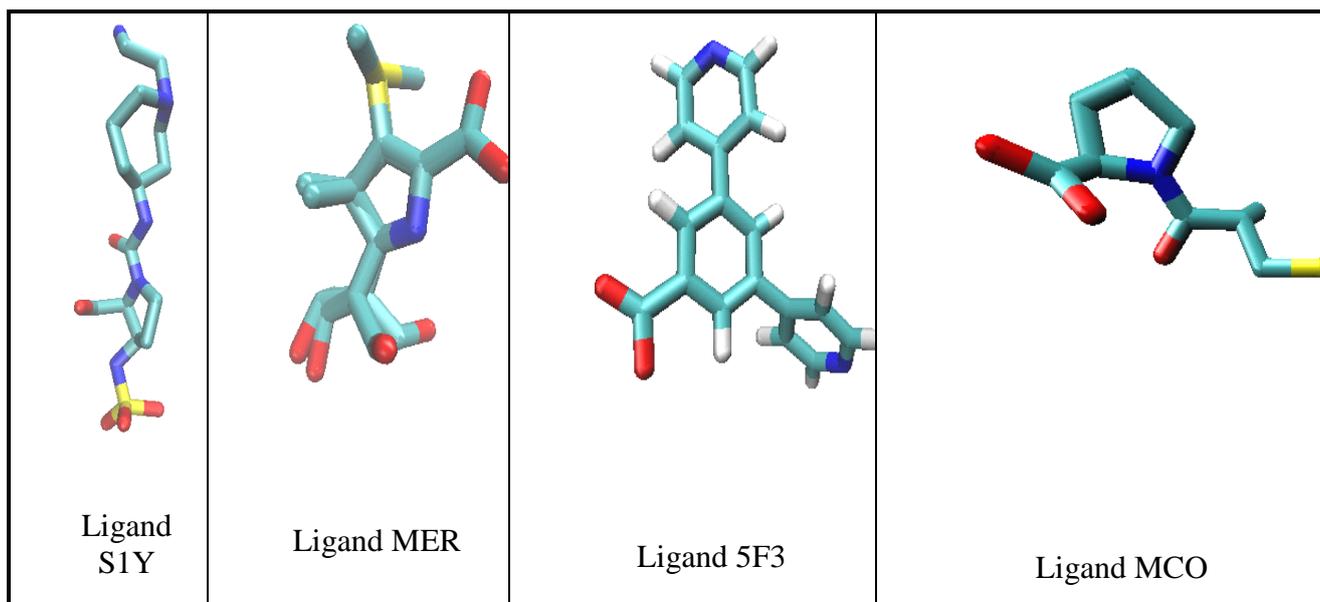


Figure N°19 : Représentation des ligands de référence S1Y, MER, 5F3 et MCO.

2.3. Génération du protomol

Le programme Surfex utilise l'algorithme de *Hammerhead* modifié pour réaliser le docking semi-flexible des ligands dans le site actif d'une cible donnée. Dans un premier temps, il génère une pseudo-molécule idéale pour interagir avec le site de liaison étudié, communément appelé «*protomol*» [49, 50].

Dans notre travail, nous avons généré le protomol des quatre protéines retenues en utilisant leur ligand de référence sous format *.pdb* et les fichiers de chacune des enzymes préparées sous format *.mol2* selon la commande suivante :

```
surfex-dock proto ligand.pdb proteine.mol2 pl
```

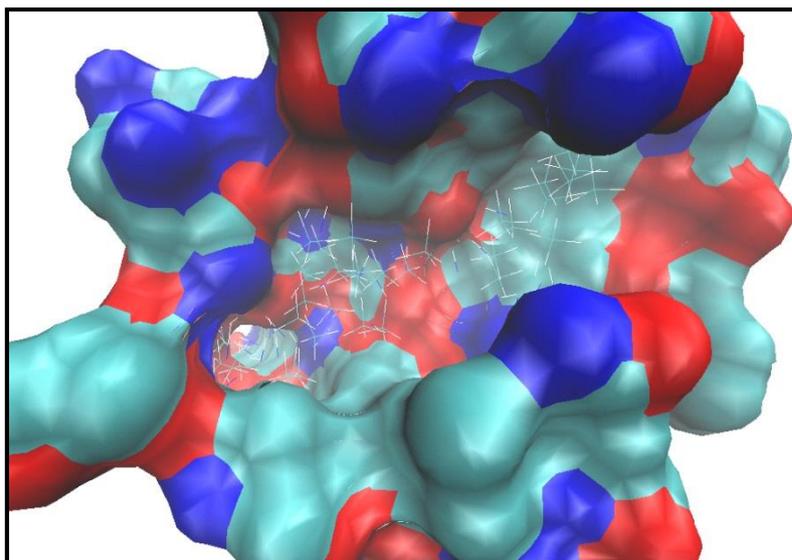


Figure N°20 : Protomol généré pour le complexe 3S1Y.

2.4. Docking Moléculaire :

Cette étape nécessite la disponibilité de la protéine format *.mol2*, le protomol généré dans l'étape précédente et les ligands sous format *.pdb*. Le docking moléculaire par « Surflex » permet d'avoir les dix (10) meilleures positions (conformations) de chaque ligand au sein du site actif étudié, classées par leur score [49, 50]. Cette étape a été réalisée en utilisant la commande suivante :

```
surflex-dock dock ligand.pdb pl-protomol.mol2 proteine.mol2
```

2.5. Règle de Lipinski :

Chaque médicament potentiel doit de se conformer à plusieurs critères de base, tel son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologique d'absorption, de distribution, métabolisme, d'excrétion et de toxicité. Dans ce contexte, « **la règle de 5** » communément appelé « **Règle de LIPINSKI** » permet de déterminer si un composé chimique ayant des propriétés pharmacologiques ou biologiques quelconques possède des propriétés qui en feraient de lui un médicament susceptible d'être administré par voie orale chez les humains [51].

Selon cette règle, un composé est capable d'être administré par voie oral s'il remplit les cinq (05) critères suivants [51]:

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da) ;

- Le logarithme décimal du coefficient de partage Octanol / eau ($\log P$) doit être inférieur ou égal à cinq (≤ 5) ;
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène (groupements OH et NH : n OHN) doit être inférieur ou égal à cinq (≤ 5) ;
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (atomes O et N : n ON) doit être inférieur ou égal à dix (≤ 10) ;
- Le nombre de liaisons rotatives (flexibles et linéaires) doit être inférieur ou égal à quinze (≤ 15).

Selon Lipinski, tous les composés ne validant pas au moins trois (03) de ces conditions sont susceptibles de poser des problèmes d'absorption par voie orale [41, 51].

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur « Molinspiration » version 2013 utilisant la commande « **Calculate Properties** » : voir Figure N°21 [52].

The screenshot shows the Molinspiration website interface. At the top, there is a browser address bar with the URL 'www.molinspiration.com/cgi-bin/properties' and a search bar with the text 'Rechercher'. Below the browser bar, the Molinspiration logo is displayed in colorful letters, followed by the text 'Calculation of Molecular Properties and BioactivityScore'. The main content area features a text input field labeled 'Enter SMILES' with a 'Clear' button to its right. Below the input field, it says 'or draw molecule below'. A chemical drawing toolbar is visible, containing various icons for drawing atoms, rings, and bonds. To the right of the drawing area, there are three prominent buttons: 'Calculate Properties' (blue), 'Predict Bioactivity' (yellow), and 'Galaxy 3D Generator' (pink). At the bottom right, there are three blue links: 'Molinspiration home', 'Molinspiration products and services', and 'Molinspiration services FAQ'.

Figure N°21 : Représentation de l'interface du serveur Molinspiration pour le calcul des paramètres décrits par Lipinski [52].

Chapitre 5
Résultats
Et
Discussion

Discussion

1. Test de fiabilité du programme Surfex :

1.1. Test de fiabilité du logiciel Surfex et coefficient de corrélation « r » :

Afin de vérifier si le protocole du docking moléculaire décrit ci-dessus est fiable, nous avons jugé utile de tester la performance du programme « Surfex » utilisé. Pour cela, nous avons fait appel au **test de corrélation linéaire** consistant à évaluer le degré de corrélation existant entre les scores de docking des inhibiteurs simulés avec Surfex et les valeurs de leur IC₅₀ déterminées expérimentalement.

Au total, 41 inhibiteurs appartenant aux quatre (04) classes de Bêta-Lactamase (A, B, C et D), connus à travers la littérature, ont été retenus pour cette étude. La disponibilité des valeurs de leur IC₅₀ est parmi les critères de choix de ces molécules. Les scores des inhibiteurs étudiés ainsi que les valeurs de leur IC₅₀ sont représentés dans le tableau N°9 (les structures 2D de chaque composé sont représentées dans l'annexe N° 2).

Tableau N°9 : Résultat du docking de 41 inhibiteurs et les valeurs de leur log IC₅₀

(Classe A : jaune, classe B : vert, classe C : bleu, classe D : mauve).

N°	TYPE BÊTA-LACTAMASE	CLASSE	IC ₅₀	SCORE	log IC ₅₀
1	SHV	A	0.0093	6.32	-2.03151705
2			0.011	4.08	-1.95860731
3			0.025	5.76	-1.60205999
4			0.75	5.13	-0.12493874
5			0.16	6.79	-0.79588002
6	MBL : NDM	B	55	1.53	1.74036269
7			1	3.2	0
8			1.2	2.78	0.07918125
9			7.9	1.82	0.89762709
10			56	2.04	1.74818803
11			81	2.27	1.90848502
12			53	1.68	1.72427587
13			20	1.86	1.30103
14			48	1.04	1.68124124
15			55	1.77	1.74036269
16			92	1.23	1.96378783
17			200	2.78	2.30103
18			135	2.16	2.13033377
19			52	1.47	1.71600334
20			21	2.28	1.32221929
21			13	2.84	1.11394335
22			120	2.85	2.07918125
23			5	2.7	0.69897
24			1.5	2.83	0.17609126
25			0.3	3.44	-0.52287875
26	0.6	3.33	-0.22184875		
27	AmpC	C	0.128	2.8	-0.89279003
28			3	1.51	0.47712125
29			0.0093	4.51	-2.03151705
30			0.011	4.17	-1.95860731
31			0.025	5.25	-1.60205999
32			1.2	2.62	0.07918125
33			0.0075	3.94	-2.12493874
34	OXA	D	3	5.01	0.47712125
35			370	2.39	2.56820172
36			5.6	3.1	0.74818803
37			0.7	4.04	-0.15490196
38			17	5.23	1.23044892
39			0.004	2.41	-2.39794001
40			0.1	3.01	-1
41			0.0007	3.73	-3.15490196

Conformément aux travaux de Bensegueni A. (2007) « $r = 0.828, r = 0.747$ » [53], Chikhi A. et Bensegueni A. (2010) « $r = 0.83, r = 0.90, r = 0.84$ » [54], Mokrani E.H.(2012) « $r = 0.86$ » [41], Boucherit H., Chikhi A. , Bensegueni A., Merzoug A., Hioual k. S. et Mokrani E. H. (2014) « $r = 0.76$ »[55] et Merzoug A., Mermoum S., Khaled S., Chikhi A., Bensegueni A., Boucherit H. (2015) « $r = 0.728$ » [56] concernant les résultats du coefficient de corrélation utilisant un programme de docking donné, un programme de docking moléculaire est performant quand la valeur absolue du coefficient de corrélation linéaire « r » dépasse 0.5. Ce qui est en parfait accord avec les résultats trouvés. Comme le montre la figure N°22, il existe une corrélation significative entre les scores donnés par « Surfex » et les IC_{50} des inhibiteurs étudiés ($\text{Log } IC_{50}$), avec un coefficient de corrélation « r » égal à **0.7776**. Par conséquent, nous pouvons conclure que le programme « Surfex » est suffisamment performant pour étudier *in silico* l'inhibition de la Bêta-Lactamase par différents inhibiteurs.

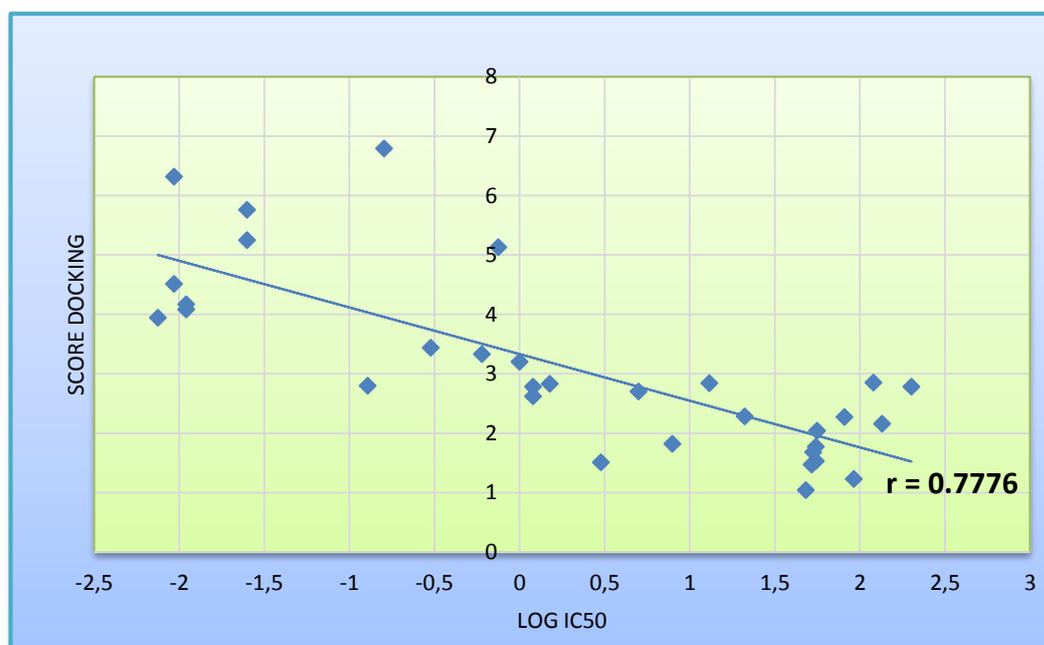


Figure N°22 : Corrélation entre l'activité biologique « $\text{Log } IC_{50}$ » et le score de docking définissant l'affinité de 41 inhibiteurs de Bêta-Lactamases.

1.2. Etude des interactions du composé N°29-Bêta-Lactamase AmpC :

L'étude de corrélation linéaire menée sur 41 inhibiteurs envers les 04 classes de Bêta-Lactamase montre que le composé N°29 (un acide boronique appelé : Glycylboronate) inhibant

la classe C de Bêta-lactamase se présente comme meilleur inhibiteur connu pour cette classe avec un meilleur score de 4.51 et une forte affinité exprimée par une IC_{50} de $0.0093\mu M$.

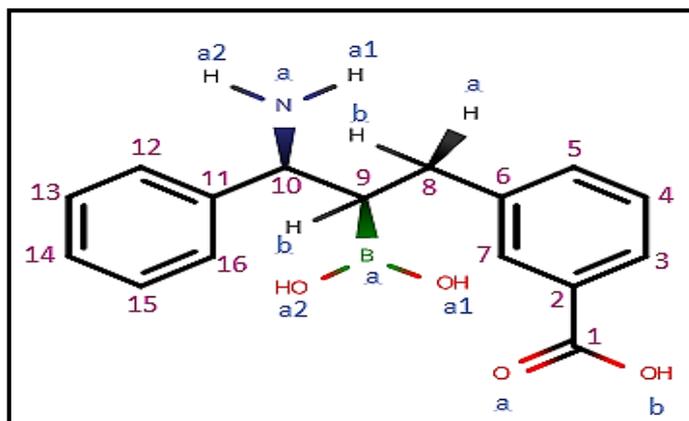


Figure N°23 : Structure du « Composé N°29 ».

En regard des références bibliographiques énoncées ci-dessus, aucune référence bibliographique ne fait état sur le mode d'interaction de ce composé envers le site actif de la Bêta-Lactamase, ni encore moins sur celui de n'importe quel composé envers la classe C de Bêta-Lactamase. De ce fait, il sera donc très intéressant d'envisager une étude *in silico* plus poussée et approfondie, portée sur les mécanismes d'inhibition mis en place par les inhibiteurs de la Bêta-Lactamase de classe C afin de rationaliser au mieux la conception de nouveaux inhibiteurs encore plus affins envers la classe précitée.

1.3. Etude des interactions du composé N°29 envers le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC :

La reconstruction du complexe Bêta-Lactamase AmpC-composé N°29 par docking moléculaire avec « Surflex » montre un bon positionnement de ce composé dans la cavité catalytique de l'enzyme (voir figure N°24) avec un score s'évaluant à 4.51. Ce score résulte de la mise en place de 7 liaisons hydrogène lors de la formation de ce complexe (Voir figure N°25).

En Effet, le premier oxygène de la fonction carboxylique portée par le C2 de l'inhibiteur établit deux liaisons hydrogène avec la fonction amine du résidu Gly344 (distance = 3.06Å) d'une part et la fonction amine liée au C-alpha du résidu Ser345 (distance = 3.17Å) d'autre part. De son côté, le deuxième oxygène de la même fonction carboxylique établit un autre pont hydrogène avec la fonction amine appartenant au radical du résidu Thr343 (distance = 2.97Å). L'hydroxyle du radical du résidu Ser90 s'engage par deux liaisons hydrogène avec les hydroxyles portés sur les carbones en positions C9a1 et C9a2 (distances = 2.99Å et 2.91Å).

respectivement). La sixième liaison hydrogène est constatée entre l'hydroxyle en position C9a2 et la fonction amine du radical du résidu Asn179 (distance = 2.90Å). Enfin, la fonction amine en position C10a de l'inhibiteur forme une dernière liaison hydrogène avec l'hydroxyle du radical du résidu Ser345 (distance = 1.93Å).

Il est également important de noter que de nombreuses interactions hydrophobes participent à la stabilité du complexe Bêta-Lactamase-Composé N°29 faisant intervenir les résidus Ser90, Leu145, Gln146, Tyr177, Asn179, Gly248, Tyr249, Thr343, Gly344, Ser345 et Thr346 comme le montre la figure N°26.

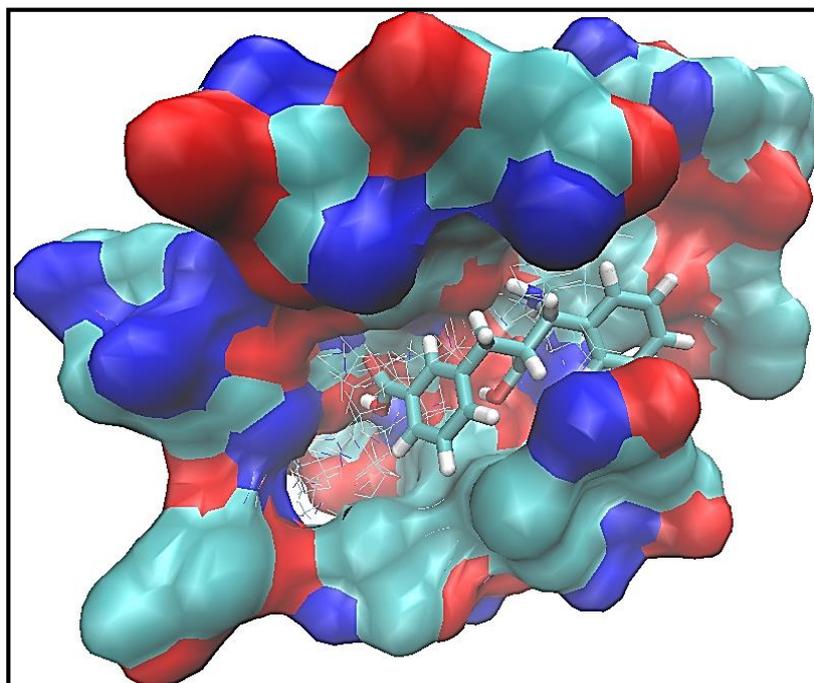


Figure N°24 : Représentation du positionnement du composé N°29 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

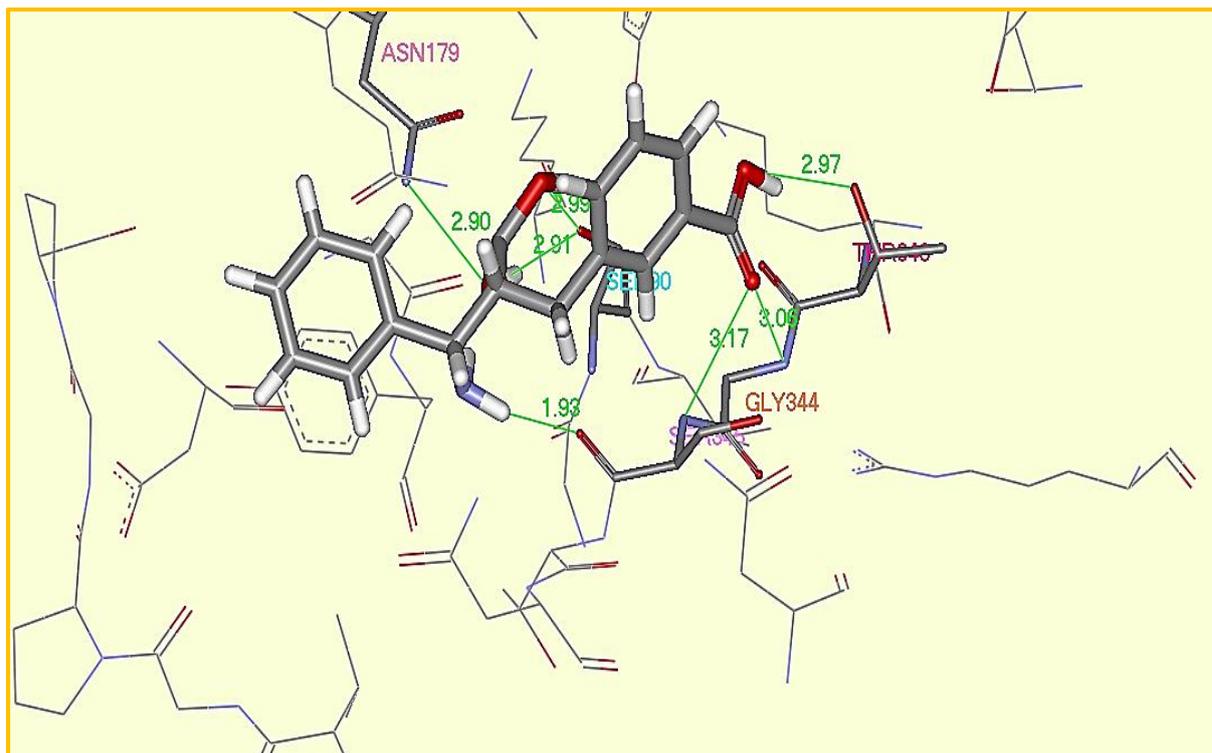


Figure N°25 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°29 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

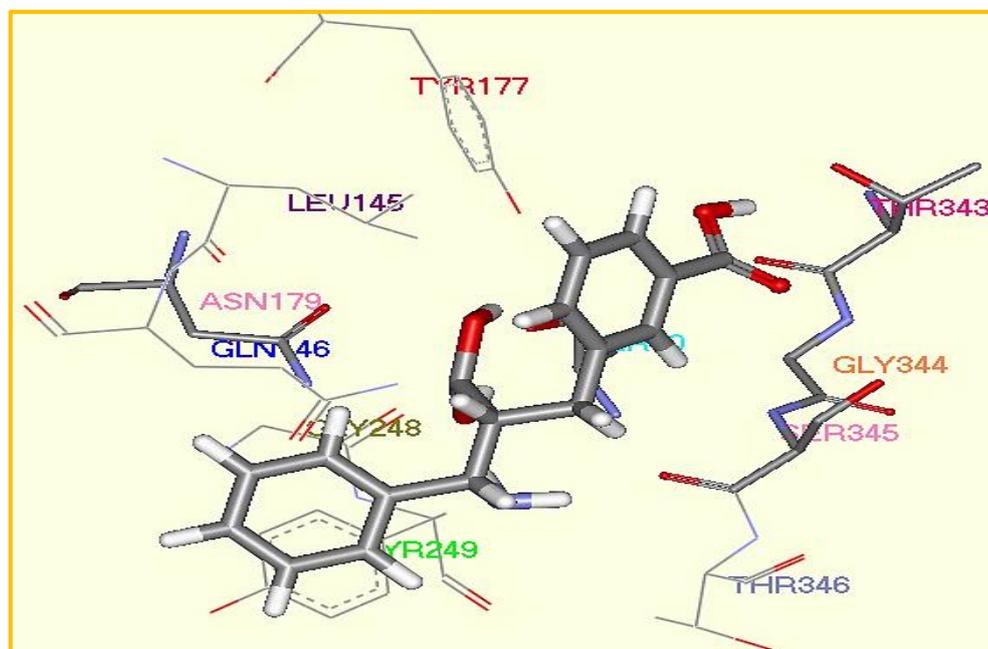


Figure N°26 : Analyse visuelle des liaisons hydrophobes entre le composé N°29 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

2. Mono-Substitutions :

Dans la perspective de proposer de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la Bêta-Lactamase AmpC, nous avons pris le composé N°29 comme structure de départ sur lequel nous avons d'abord réalisé une mono-substitution en introduisant de nouveaux groupements chimiques fonctionnels. Il est à noter que les groupements ajoutés présentent la capacité d'établir des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme, citons à titre d'exemple : (-OH), (-COOH), (-CO), (-CON), (-CHO), (-NH₂), (-NHO₂) et (-NO₂).

Dans cette partie, nous avons réalisé 120 substitutions, à raison de 15 substitutions par groupement chimique ajouté. Le docking moléculaire des composés mono-substitués envers le site actif de la Bêta-Lactamase considérée fait ressortir 19 inhibiteurs ayant présenté un score supérieur à celui du composé de départ, soit > 4.51.

Le tableau N°10 regroupe les scores de docking des meilleurs composés mono-substitués (les résultats non significatifs n'ont pas été reportés y compris ceux des groupements « CO » et « NHO₂ »).

Tableau N°10 : Score de docking des nouveaux inhibiteurs théoriques de la Bêta-Lactamase type AmpC obtenus après mono-substitutions du composé de départ N°29.

N° Composé Et position	MONO-SUBSTITUTIONS														Score Docking : Affinité
	C3	C4	C5	C7	C8b	C9b	C10b	C12	C13	C14	C15	C16	C10a1	C10a2	
1		OH													4.85
2			OH												5.01
3								OH							4.81
4										OH					5.02
5													OH		4.76
6				COOH											4.57
7							COOH								<u>5.98</u>
8	CON														5.00
9		CON													4.71
10			CON												4.58
11						CON									4.57
12				CHO											<u>6.08</u>
13					CHO										4.81
14										CHO					4.67
15								NH2							4.66
16										NH2					5.03
17												NH2			5.37
18													NH2		4.75
19												NO2			4.54

Le tableau N°10 montre que, suite à la mono-substitution, l'introduction de la fonction carboxylique COOH dans la position C12 du composé de départ N°29 améliore davantage son score pour atteindre une valeur de 5.98 dans le cas du composé N°7 avec une bonne pose dans la cavité (voir figure N°29).

L'analyse visuelle montre que ce dernier établit six (06) liaisons hydrogènes avec le site actif de la Bêta-Lactamase (voir figure N°27).

Deux liaisons sont formées entre les deux oxygènes du groupement carboxyle porté par le C2 de l'inhibiteur et : la fonction hydroxyle du résidu Thr343 (distance de 2.89 Å) et la fonction amine du résidu Gly344 (distance de 3.17 Å). De même, l'oxygène du groupement hydroxyle porté par C9 s'engage par une liaison hydrogène avec l'oxygène du Ser90 (distance =2.86 Å). Nous constatons également la présence d'une quatrième liaison hydrogène entre l'hydroxyle lié au C9 de l'inhibiteur et la fonction C=O du résidu Ser345 (distance =1.95 Å). Une cinquième liaison hydrogène est observée entre la fonction amine en C9 et la fonction C=O du résidu Ser345 (distance =2.33 Å). Enfin, la fonction C=O du résidu Asn347 établit un pont hydrogène avec le groupement carboxyle portés par le C12 de l'inhibiteur (distance =1.98 Å).

Il est également important de noter que de nombreuses interactions hydrophobiques participent à la stabilité du complexe Bêta-Lactamase-composé N°7. Ces interactions sont formées entre l'inhibiteur et les résidus Gly89, Ser90, Gln146, Tyr177, Asn179, Tyr249, Thr343, Gly344, Ser345, Thr343, Thr346 et Asn347 (voir figure N°28).

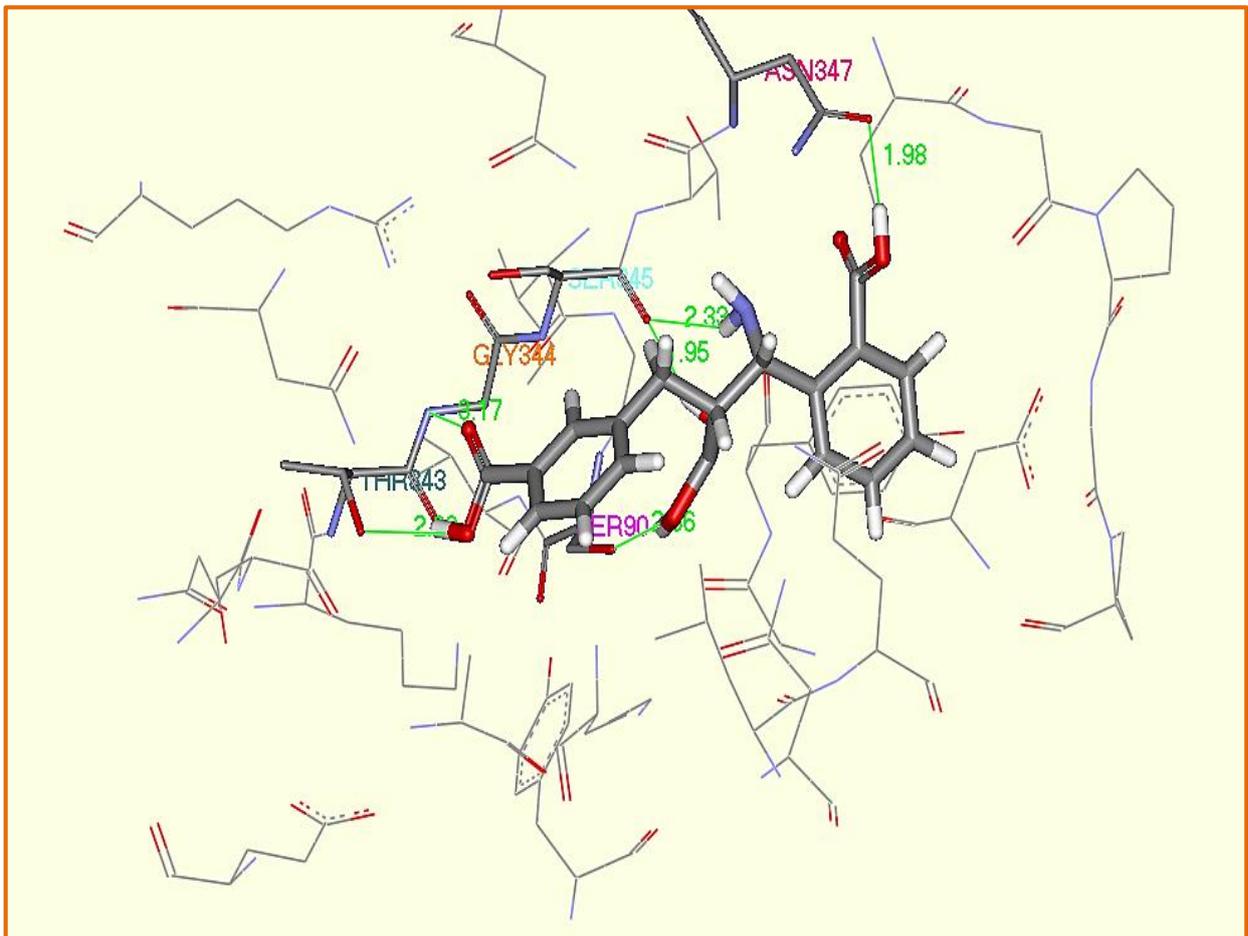


Figure N°27 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°7 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

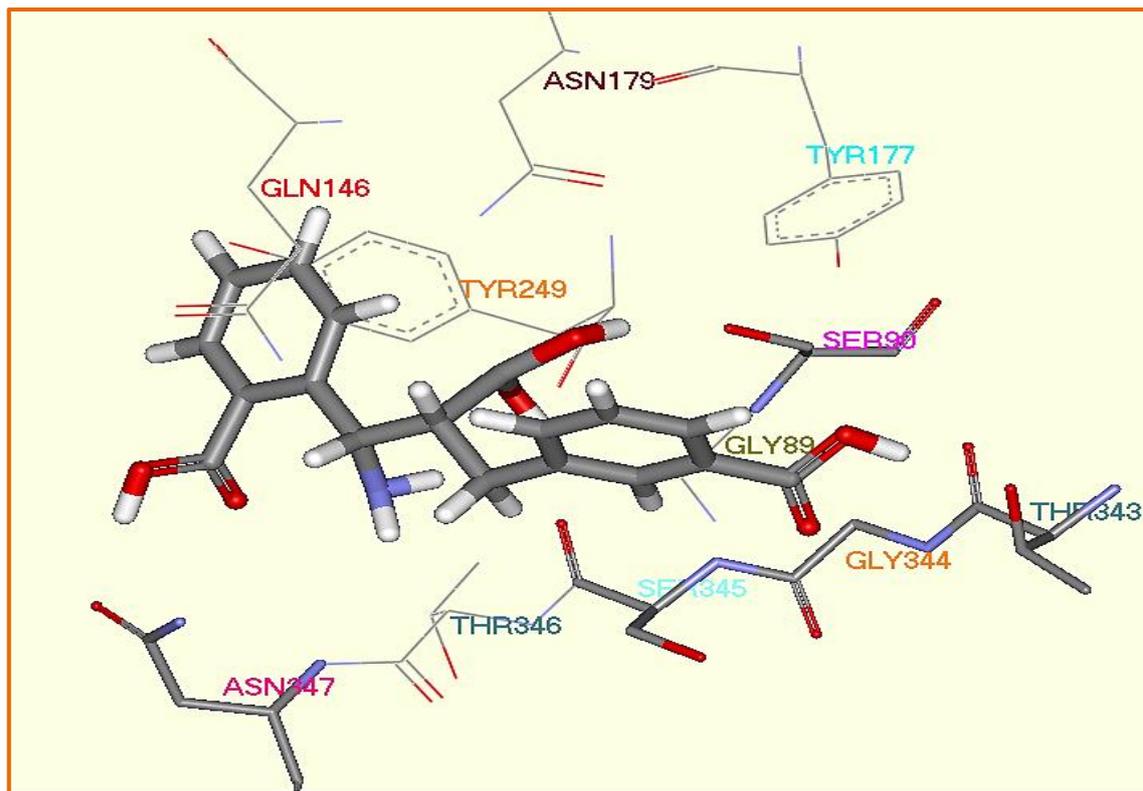


Figure N°28 : Analyse visuelle des liaisons hydrophobes entre le composé N°7 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

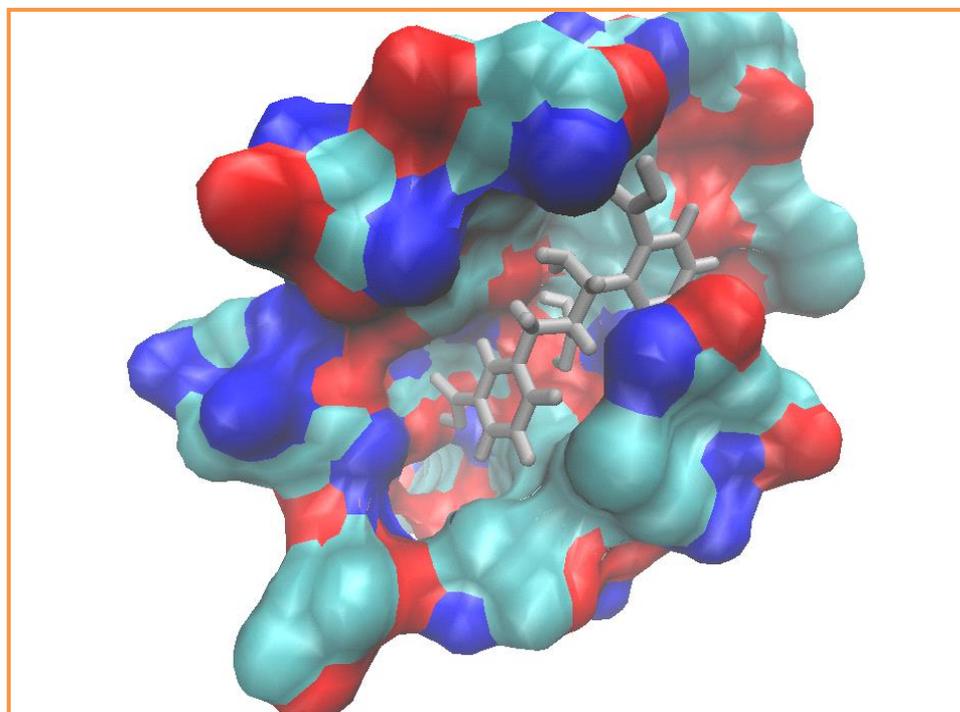


Figure N°29 : Représentation du positionnement du composé N°7 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

Il ressort également du tableau N°10 que l'introduction du groupement CHO dans le carbone 7, pour le composé N°12, améliore le score qui passe de 4.51 dans le cas du composé de départ jusqu'à 6.08 avec un bon positionnement dans la cavité (voir figure N°32).

L'analyse visuelle montre que le composé N°12 inhibe la Bêta-Lactamase en formant 08 liaisons hydrogène avec la cavité catalytique de l'enzyme (voir figure N°30).

Le premier oxygène de la fonction carboxyle portée sur le C2 de l'inhibiteur forme une liaison hydrogène avec la fonction amine du radical du résidu Gln146 (distance = 2.83Å). La première fonction hydroxyle en position C9a1 forme trois liaisons hydrogène avec l'hydroxyle du résidu Ser90 (distance = 2.40 Å), l'azote de la fonction amine liée au C-alpha du résidu Ser345 (distance = 3.05 Å) et l'oxygène lié au C-alpha du résidu Ser345 (distance = 2.08 Å). De son côté, l'oxygène en position C9a2 forme deux liaisons Hydrogène : l'une avec l'hydroxyle du résidu Ser90 (distance = 2.72 Å) et l'autre avec l'hydroxyle du résidu Tyr177 (distance = 2.80 Å).

Enfin, la fonction amine en position C10a l'inhibiteur forme deux liaisons hydrogène avec l'oxygène lié au C-alpha du résidu Asn373 (distance = 3.01Å) d'une part et l'hydroxyle du résidu Ser345 (distance = 2.73 Å).

Le complexe Bêta-Lactamase-composé N°12 est stabilisé également grâce aux interactions hydrophobiques faisant intervenir les résidus Ser90, Leu145, Gln146, Tyr177, Tyr249, Ser315, Ala319, Thr343, Ser345, Thr346 et Asn373 (voir Figure N°31).

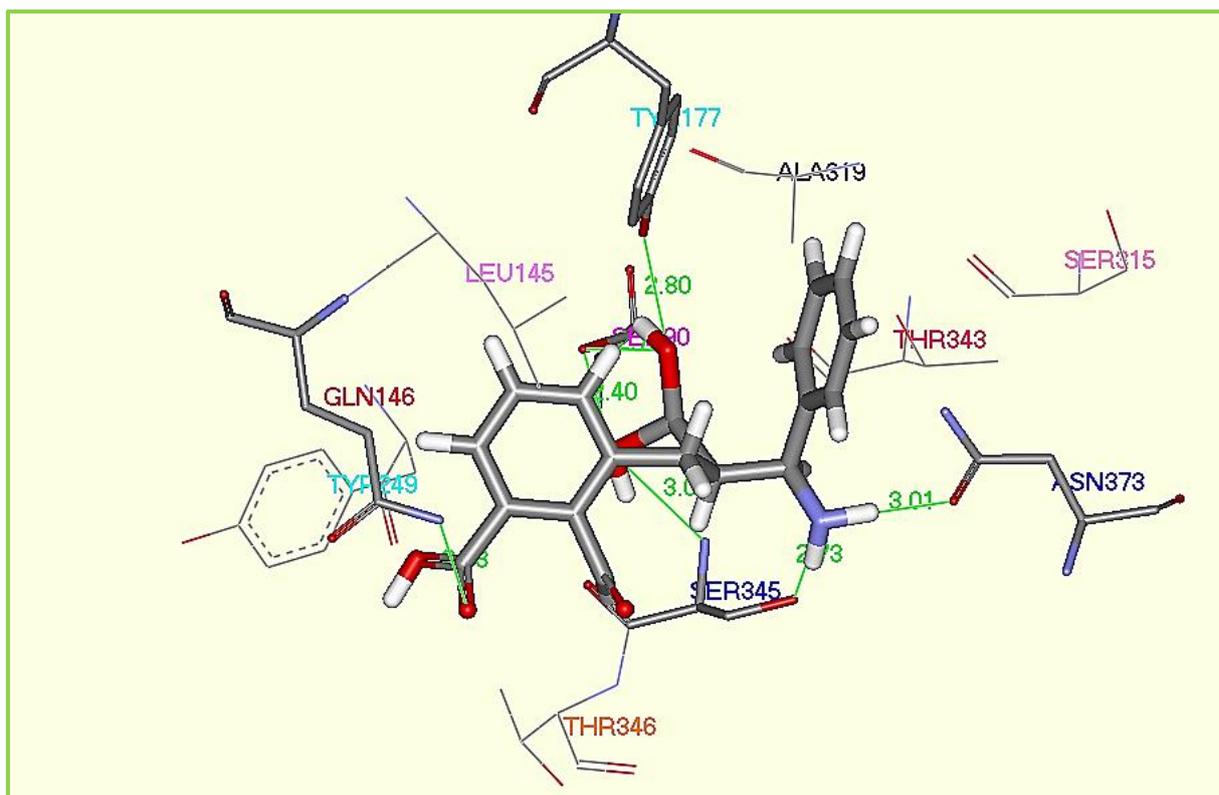


Figure N°30 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°12 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

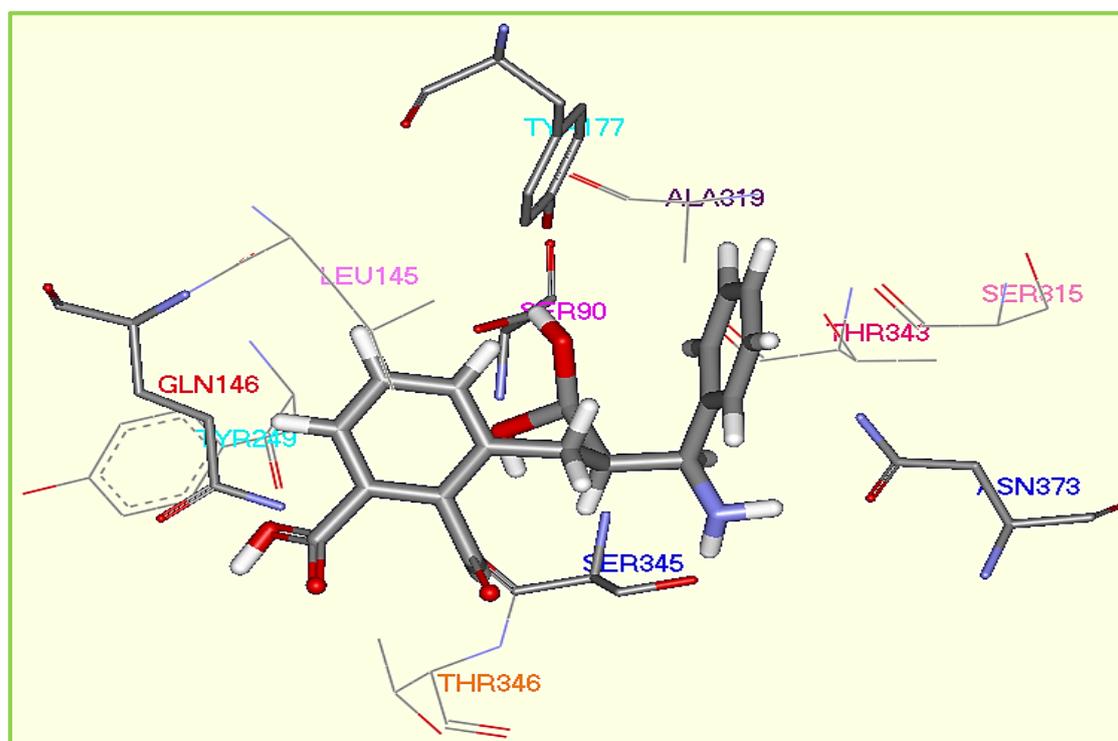


Figure N°31 : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°12 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

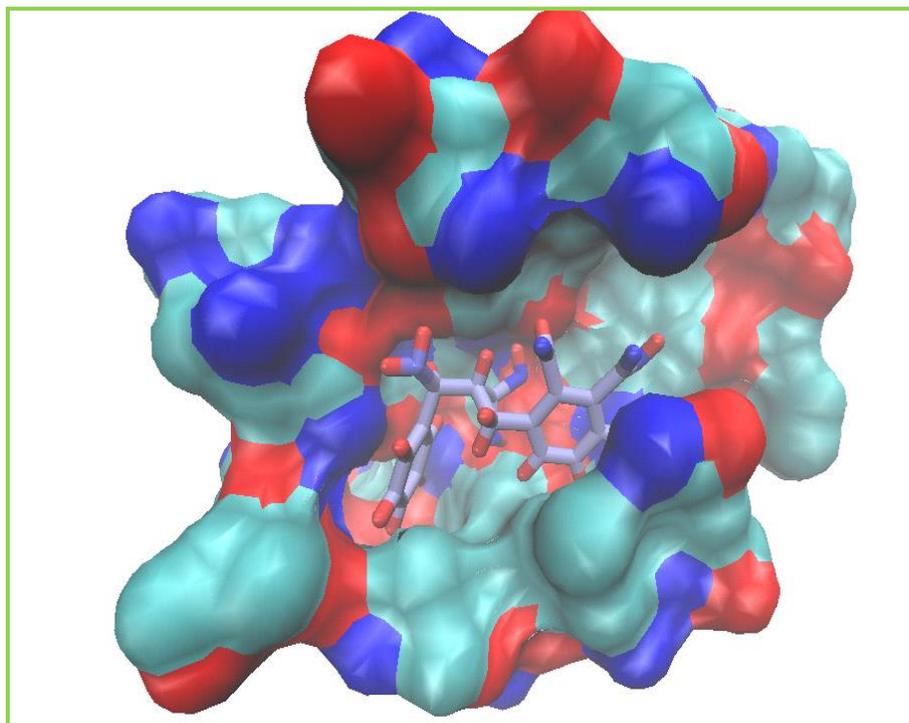


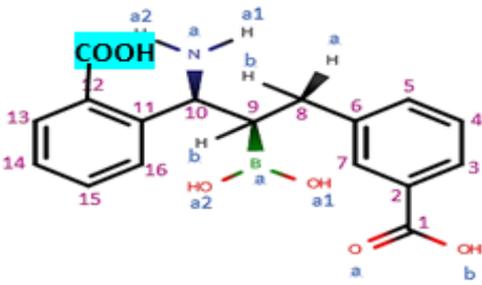
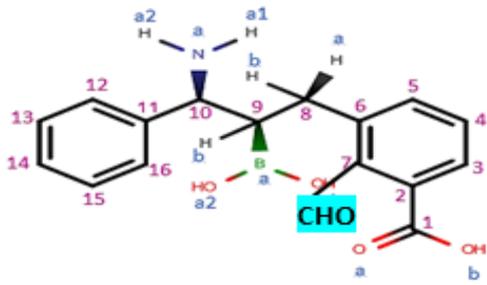
Figure N°32 : Représentation du positionnement du composé N°12 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

3. **Bi-substitution :**

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à une substitution en prenant les deux meilleurs inhibiteurs issus de la mono-substitution (le composé N°7 et le composé N°12), sur lesquels nous avons introduit les groupements (-OH), (-COOH), (-CO), (-CON), (-CHO), (-NH₂), (-NHO₂) et (-NO₂) dans différentes positions. Au total, nous avons effectué 240 bi-substitutions dont 120 pour chacun des deux composés de départ.

Le docking moléculaire de ces composés bi-substitués envers le site actif de la Bêta-Lactamase choisie fait ressortir 22 inhibiteurs ayant présenté un score supérieur à celui des composés N°7 et N°12, dont 2 inhibiteurs (composés N°30 et 34) ayant un score supérieur à celui du composé N°12 issu de la mono-substitution soit > 6.08. (Voir tableau N°11). Les résultats non significatifs n'ont pas été reportés y compris ceux des groupements « CO » et « NHO₂ ».

Tableau N°11 : Score de docking des nouveaux inhibiteurs de Bêta-Lactamase type AmpC obtenus après bi-substitutions.

N° Composé Et position	BI-SUBSTITUTIONS												Score Docking Affinité	
	C3	C4	C5	C7	C8a	C8b	C12	C13	C14	C15	C16	C10a1		C10a2
														
	Composé N°7						Composé N°12							
20				COH						OH				5.43
21				COH							OH			5.14
22				COH									OH	4.55
23		COOH		COH										4.71
24				COH			COOH							4.81
25				COH								COOH		4.93
26				COH						COH				4.56
27				COH		NH2								5.09
28				COH								NH2		4.90
29				COH						NO2				4.76
30					OH	COOH								6.67
31						COOH		OH						4.61
32						COOH							OH	5.29
33	COOH					COOH								5.35
34					COOH	COOH								6.37
35					CO	COOH								5.00
36			CHO			COOH								5.60
37		NH2				COOH								5.10
38					NH2	COOH								5.83
39						COOH	NH2							5.05
40						COOH							NH2	4.90
41					NO2	COOH								4.87

Les résultats obtenus après bi-substitution présentés dans le tableau N°11 montrent que l'introduction d'un groupement OH dans la position C8b et un groupement COOH dans la position C12 améliore davantage le score du composé obtenu N°30 s'évaluant à 6.67. Ce score se traduit par la formation de six (06) liaisons hydrogène entre l'inhibiteur et le site actif de la Bêta-Lactamase comme le montre la figure N°33.

La première liaison hydrogène est formée entre l'hydroxyle en position C8b et la fonction amine de l'Asn373 (distance = 3.14 Å). Le premier oxygène porté par le Bore en position C9a1 forme deux liaisons hydrogènes, l'une avec l'hydroxyle du résidu Ser345 (distance = 2.85 Å) et l'autre avec l'oxygène du résidu Asn370 (distance = 2.39 Å). Quant au deuxième oxygène porté par le Bore en position C9a2, il forme une liaison Hydrogène avec la fonction amine du résidu Asn370 (distance = 2.86 Å). La fonction amine en position C10a de l'inhibiteur forme deux liaisons Hydrogène : l'une avec l'oxygène du résidu Asn370 (distance = 2.03 Å) et l'autre avec la fonction amine du résidu Asn373 (distance = 3.15 Å).

De nombreuses interactions hydrophobes contribuant à la stabilisation du complexe Bêta-Lactamase-Composé N°30 sont constatées entre l'inhibiteur et les résidus Ser315, Ala319, Ser345, Asn370, Asn373 et Arg376 (voir figure N°34).

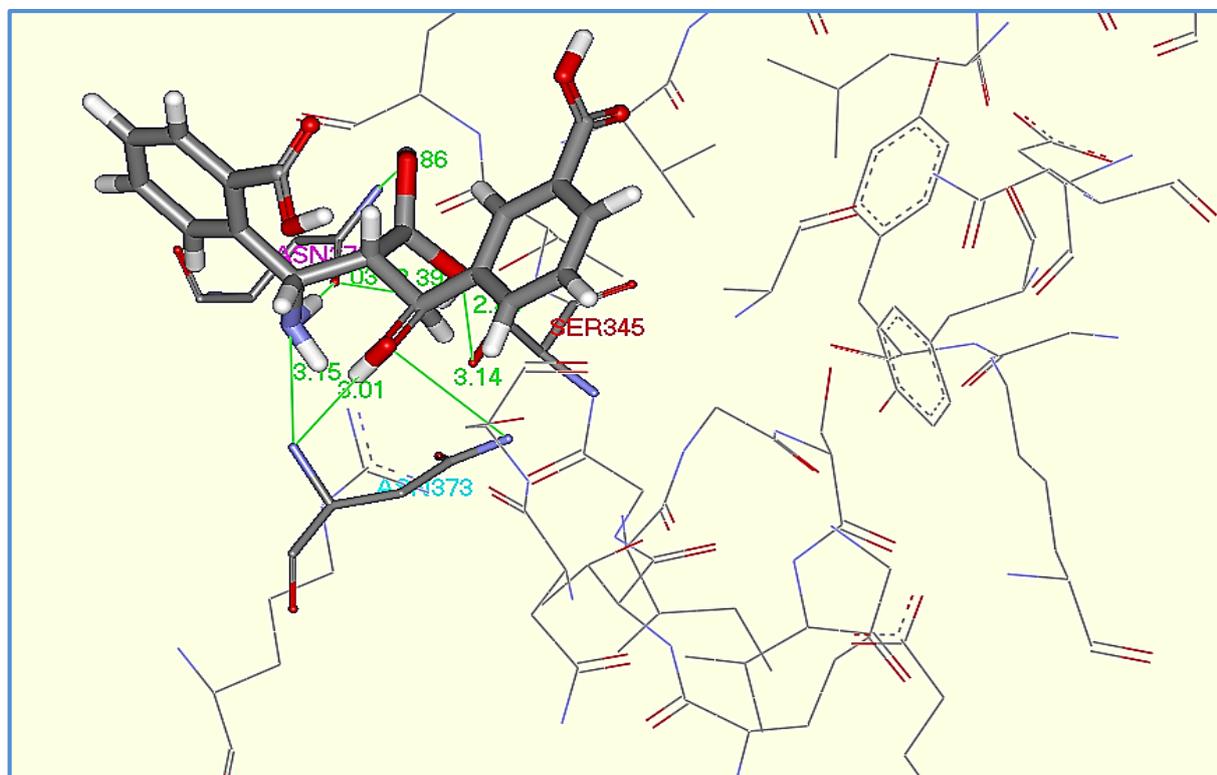


Figure N°33 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°30 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

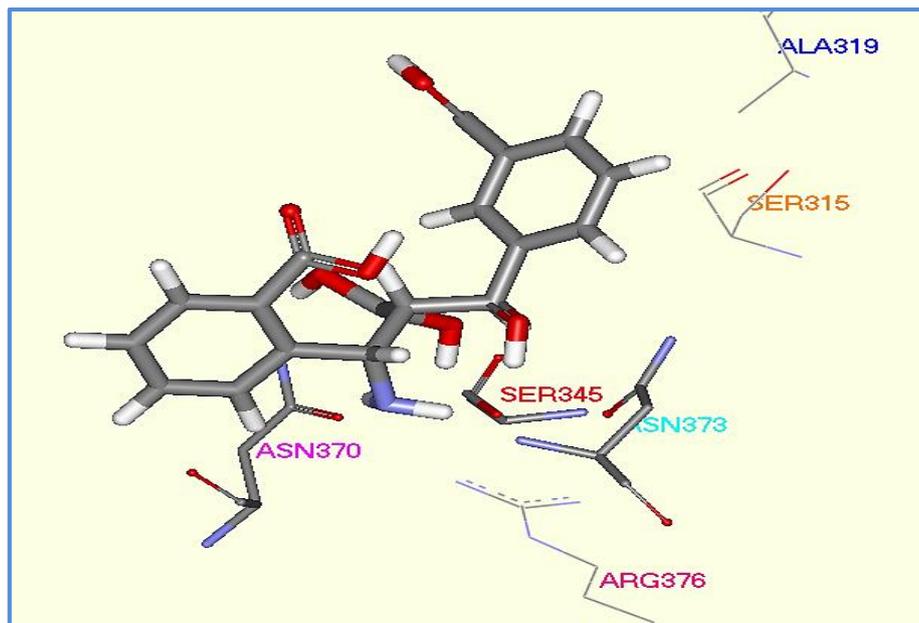


Figure N°34 : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°30 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

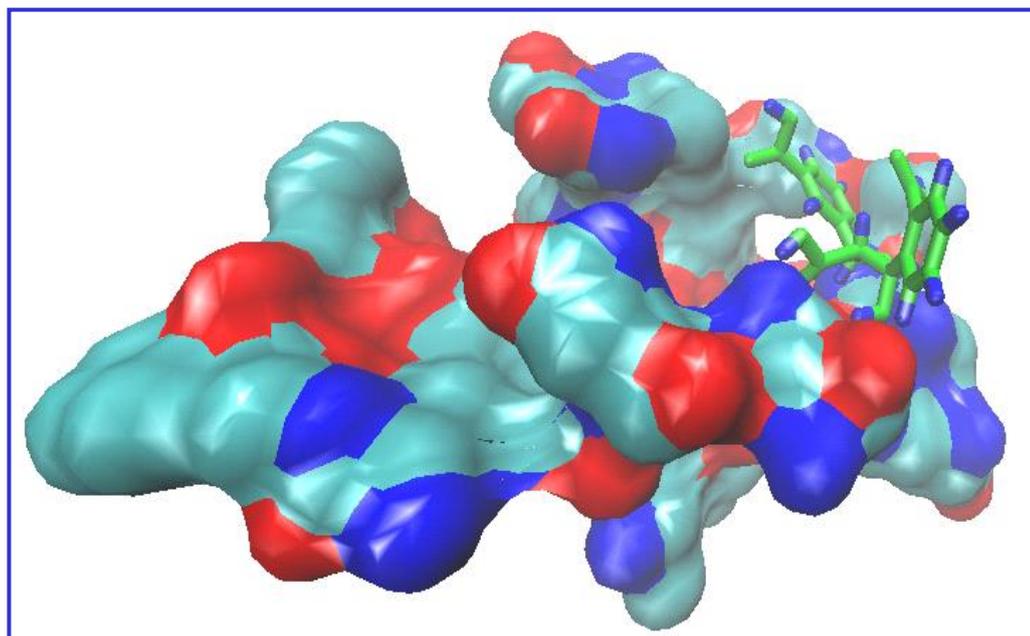


Figure N°35 : Représentation du positionnement du composé N°30 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

Il ressort également du tableau N°11 que l'introduction d'un groupement COOH dans les positions C8a et C12 améliore le score du composé N°7 qui passe de 5.98 à 6.37 pour le composé N°34. L'analyse visuelle faisant suite au docking moléculaire montre que ce composé bi-substitué obtient inhibe sélectivement la Bêta-Lactamase en formant dix (10) liaisons Hydrogène (voir figure N°36) avec un bon positionnement dans la cavité (voir figure N°38).

L'oxygène en position C1a de la fonction carboxyle portée par le carbone C2 de cet inhibiteur s'engage par deux ponts hydrogènes : l'une avec la fonction amine du radical de Asn347 (distance = 3.16 Å) et l'autre avec la deuxième fonction amine liée au C-alpha du même résidu Asn347 (distance = 3.08 Å). L'oxygène en position C1b de la fonction carboxyle portée par le carbone C2 de l'inhibiteur forme une liaison hydrogène avec l'azote du radical du résidu Asn347 (distance = 2.96 Å). Le premier hydroxyle porté par le Bore en position C9a1 établit trois liaisons hydrogène avec l'hydroxyle du résidu Ser90 (distance = 2.40 Å), la fonction amine liée au C-alpha du résidu Ser345 (distance = 3.05 Å) et l'hydroxyle du résidu Ser345 (distance = 2.13 Å).

Le deuxième oxygène en position C9a2, forme deux liaisons hydrogène, l'une avec l'hydroxyle du résidu Ser90 (distance = 2.79 Å) et l'autre avec l'oxygène appartenant au radical du résidu Tyr177 (distance = 2.83 Å). La fonction amine portée sur le C10 de l'inhibiteur forme deux liaisons hydrogène, la première avec l'hydroxyle du résidu Ser345 (distance = 2.77 Å) et la deuxième avec l'oxygène du résidu Asn373 (distance = 1.97 Å).

Il est également important de noter que de nombreuses interactions hydrophobiques participent à la stabilité du complexe Bêta-Lactamase-composé N°34. Ces interactions sont formées entre l'inhibiteur et les résidus Gly89, Ser90, Leu145, Gln146, Tyr177, Tyr249, Ser315, Ala319, Gly344, Ser345, Thr346, Asn347 et Asn373 (voir figure N°37).

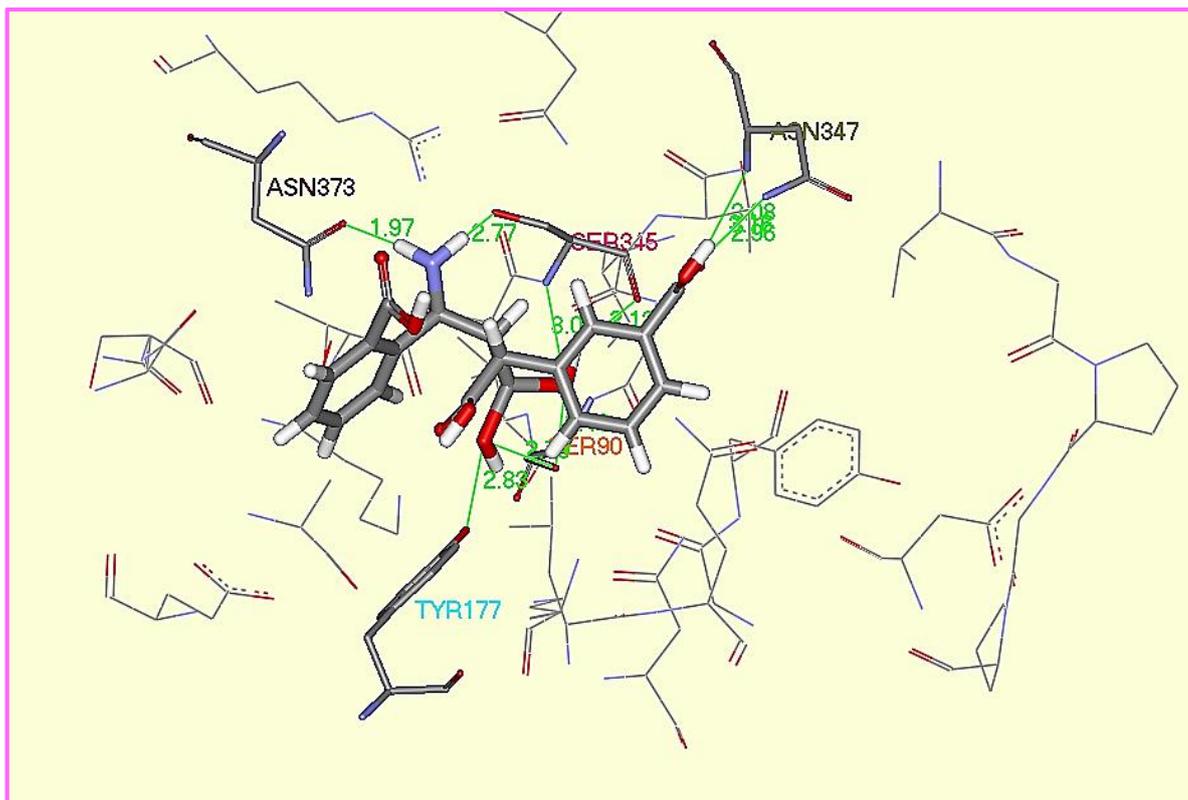


Figure N°36 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°34 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

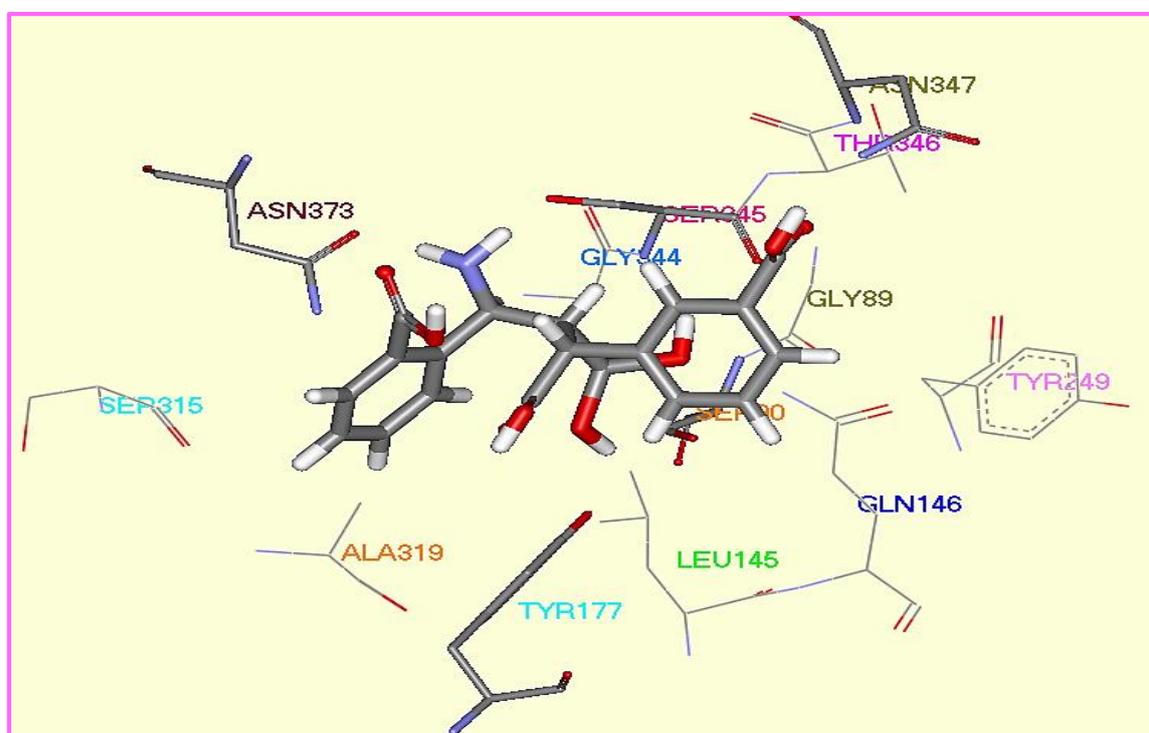


Figure N°37 : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°34 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC

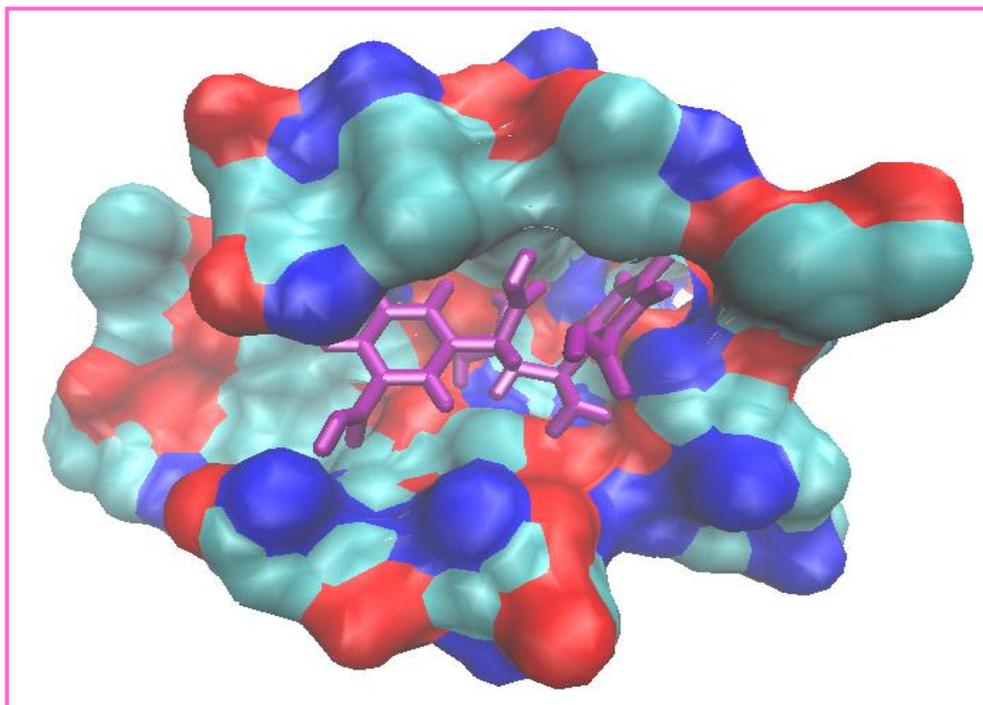


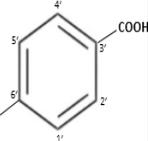
Figure N°38 : Représentation du positionnement du composé N°34 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

4. Tri-Substitution :

Rappelons que le composé N°30 se présente comme meilleur inhibiteur de la Bêta-Lactamase obtenu suite à une bi-substitution avec un score de 6.67.

Afin d'améliorer davantage son score et notamment son mode de positionnement au sein de la cavité catalytique de la Bêta-Lactamase (voir figure N°41), nous avons procédé à une tri-substitution (voir tableau N°12).

Tableau N°12 : Score de docking du nouvel meilleur inhibiteur de Bêta-Lactamase type AmpC obtenus après tri-substitution du composé N°30.

N° Composé Et position	TRI-SUBSTITUTION												Score Docking Affinité	
	C3	C8a	C8b	C9b	C10b	C12	C13	C14	C15	C16	C10a1	C10a2		
42			OH			COOH								7.91

En effet, l'introduction, en position C3, d'un cycle benzène- 3'-COOH au composé N°30 améliore nettement son score qui passe à 7.91 pour le composé N°42 avec une parfaite pose dans la cavité (voir figure N°41).

L'analyse visuelle montre que ce composé est bien positionné au sein de la cavité catalytique de l'enzyme en formant de nombreuses interactions hydrophobiques avec les résidus Gly89, Leu145, Asn179, Val239, Gly240, Pro241, Gly242, Pro243, Ser345, Gly248, Tyr249, Asn314, Ala319, Gly344, Asn347 et Asn373 du site actif de la Bêta-Lactamase (voir figure N°40).

De même, la figure N°39 montre que l'inhibiteur obtenu forme huit (08) liaisons hydrogènes avec le site actif de l'enzyme.

L'oxygène en position C1b l'inhibiteur établit trois liaisons hydrogène : la première est constatée avec l'hydroxyle du radical de Ser345 (distance = 2.70 Å), la deuxième est observée

avec l'oxygène lié au C-alpha du résidu Asn314 (distance = 6.21 Å), la troisième est formée avec l'oxygène du résidu Asn373 (distance = 1.83 Å).

Le premier oxygène porté par le Bore en position C9a1 établit une liaison hydrogène avec l'oxygène lié au C-alpha du résidu Ser345 (distance = 1.96 Å). De son côté, l'oxygène en position C9a2 de l'inhibiteur s'engage par un autre pont hydrogène avec l'oxygène lié au C-alpha du résidu Ser345 (distance = 1.96 Å).

La fonction amine portée sur le carbone C10 forme une liaison hydrogène avec l'oxygène lié au C-alpha du résidu Ser345 (distance = 2.47 Å). La fonction carboxyle portée sur le carbone C12 de l'inhibiteur forme une liaison Hydrogène avec l'oxygène appartenant au radical du résidu Asn347 (distance = 1.96 Å).

Enfin, la fonction carboxyle greffée en position C3' au niveau du noyau benzène substitué en position C3 de l'inhibiteur forme une liaison hydrogène avec l'azote lié au C-alpha du résidu Ala319 (distance = 2.88 Å).

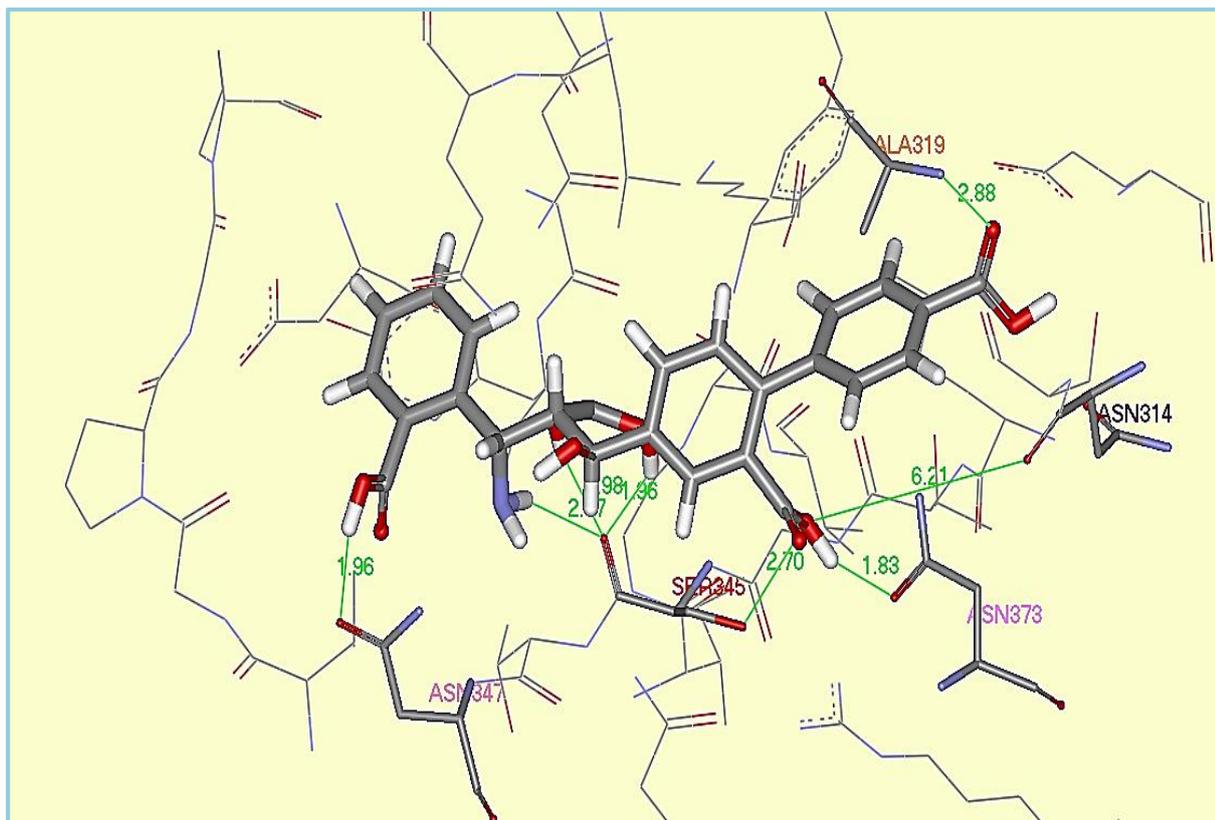


Figure N°39 : Analyse visuelle des liaisons hydrogène entre le composé N°42 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

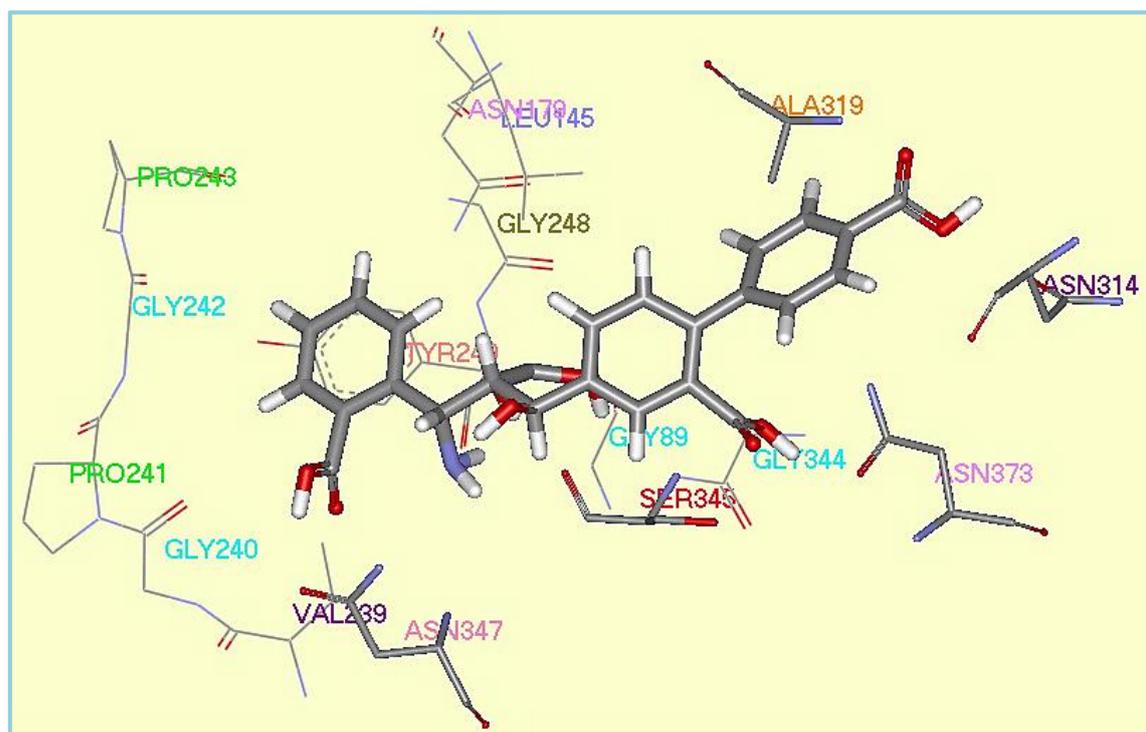


Figure N°40 : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°42 et le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

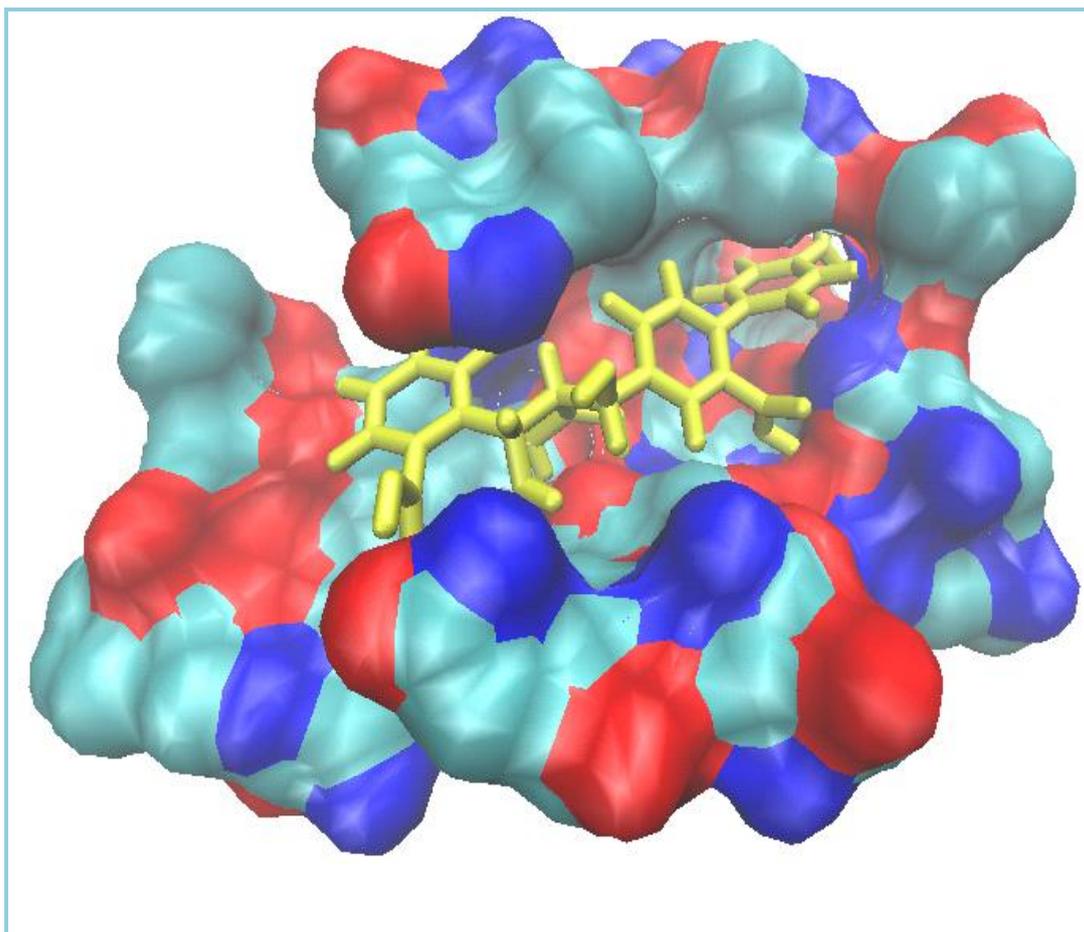


Figure N°41 : Représentation du positionnement du composé N°42 dans le site actif de la Bêta-Lactamase AmpC.

5. Règle de Lipinski :

Il était important de compléter notre étude par l'application de la méthode de filtre ADME qui est basée sur la règle de 5 de Lipinski [51], afin de nous renseigner sur les propriétés pharmacocinétiques (ADME) des composés N°7, 12, 30, 34 et 42 issus de la substitution structurale du Glycylboronate « composé N°29 ».

Rappelons que la règle de Lipinski a été appliquée en utilisant le serveur Molinspiration [52]. Les résultats sont représentés dans le tableau N°13.

Tableau N°13 : Critères de Lipinski des meilleurs inhibiteurs de la Bêta-Lactamase AmpC obtenus après mono, bi et tri-substitution.

2	N° Composé	Log P	PM « Dalton »	Nbr Accepteurs de liaisons H : nON	Nbr		Score Docking
					Donneurs de liaisons H : nOHNH	Nbr Liaisons rotables	
Composé de départ	29	1.37	299.141	5	5	6	4.51
Mono substitution	7	0.90	343.151	7	6	7	5.98
	12	0.75	327.151	6	5	7	6.08
	30	- 0.10	359.147	8	7	7	6.67
	34	0.41	387.161	9	7	8	6.37
Tri- substitution	42	1.22	463.251	10	8	9	7.91

Il ressort du tableau N° 12 que les composés 7, 12, 30, 34 et 42 peuvent être proposés comme étant de nouveaux inhibiteurs de la Bêta-lactamase AmpC sans poser de problèmes d'administration par voie orale et ce conformément aux travaux de Lipinski et al. [51].

Conclusion

Conclusion et perspectives :

Ce travail de master avait pour objectif d'acquérir des connaissances en simulation informatique, notamment le docking moléculaire par « Surfex » afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Bêta-Lactamase : cible thérapeutique validée pour le traitement des infections induites par de nombreuses bactéries résistantes aux antibiotiques Bêta-Lactamines, notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Au préalable, nous avons testé la fiabilité du programme « Surfex » par le biais du test de corrélation linéaire qui existe entre les valeurs expérimentales de l'IC₅₀ de 41 inhibiteurs de la Bêta-Lactamase et leur score de docking par Surfex. Avec un coefficient de corrélation linéaire égale à **0.7776**, ce test nous apporte la preuve de la fiabilité du programme Surfex pour étudier *in silico* l'inhibition de la Bêta-Lactamase.

Dans l'espoir de proposer de nouveaux inhibiteurs plus affins et plus puissants de la Bêta-Lactamase, nous avons choisi le Glycylboronate ; un inhibiteur très puissant de l'enzyme étudiée, auquel nous avons apporté des modifications structurales en introduisant des groupements à différentes positions. Le docking moléculaire par Surfex des composés substitués envers le site actif de la Bêta-Lactamase fait ressortir de nouveaux inhibiteurs davantage plus puissants.

En effet, l'introduction d'un groupement hydroxyle en position C8b, d'un groupement carboxyle en position C12 et d'un cycle benzène-3'-COOH a amélioré nettement le score qui passe de 4.51 dans le cas du composé de départ (Glycylboronate) jusqu'à 7.91 pour ce qui est du composé N°53 (composé tri-substitué).

Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne positivement sur les propriétés ADME de ce composé tri-substitué qui se présente comme nouvel inhibiteur théoriquement plus puissant de la Bêta-Lactamase.

Il conviendrait dans le prolongement de ce travail de tester l'activité biologique du composé proposé afin de pouvoir vérifier les résultats théoriques obtenus *in silico*.

Références

Bibliographiques

- [1] Zervosen A., Sauvage E., Frère J-M., Charlier P. & Luxen A. Development of New Drugs for an Old Target — The Penicillin Binding Proteins. *Molecules*. 2012; **17**: 12478-12505p.
- [2] Résistance aux antibiotiques (Dossier réalisé en collaboration avec le Pr Laurent Gutmann, Service de microbiologie de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, Unité 872 Inserm/UPMC/Université Paris Descartes - Mai 2013 [En ligne] [Http://Www.Inserm.Fr/Thematiques/Immunologie-Inflammation-Infectiologie-Et-Microbiologie/Dossiers-D-Information/Resistance-Aux-Antibiotiques](http://Www.Inserm.Fr/Thematiques/Immunologie-Inflammation-Infectiologie-Et-Microbiologie/Dossiers-D-Information/Resistance-Aux-Antibiotiques). Consulté le : [24/02/2017].
- [3] Baba Ahmed-Kazi Tani Z., Arlet G. Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie- News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Elsevier Masson, Pathologie Biologie*. 2014; **62**:169–178p.
- [4] La résistance aux antibiotiques [En ligne] <http://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/resistance-antibiotiques.html>. Consulté le : [07/02/2017].
- [5] Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. *European Commission*. 2009. 87p.
- [6] Lamotte-Brasseur J.; et al. The Structures and Catalytic Mechanisms of Active-Site Serine β -Lactamases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1994 ; **12**: 188-230p.
- [7] AVENTIS PHARMA S.A. Nouveaux composés hétérocycliques, procédé et intermédiaires de préparation et utilisation comme médicament, notamment comme inhibiteurs de bêta-lactamase et antibactériens : Brevet d'invention –certificat d'utilité- certificat d'addition - copie officielle. Institut National de la Propriété Industrielle. *Paris*. 2003. 72p.
- [8] Bonomo R.A., Rice L.B. Inhibitor resistant class A Beta-Lactamase. *Frontiers in Bioscience*. 1999; **4**: 34-41p.
- [9] Bush K., Bradford P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold spring harbor laboratory press. Perspectives in Medicine*. 2016. 23p.
- [10] Vallée M. Résistance aux Bêta-Lactamines à large spectre chez les bactéries à Gram négatif : épidémiologie et diagnostic. Mémoire de maîtrise en microbiologie-immunologie, Université LAVAL du Québec, Canada. 2015. 137p.

- [11] Chemelle J.A. Etude par modélisation moléculaire de l'effet allergène des antibiotiques de la famille des β - lactamines, tant sur le plan immédiat que retardé. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard,Lyon.2010. 1.244 p.
- [12] Structure du noyau Bêta-Lactame[En ligne] :[https://images.search.yahoo.com/search/images/cycle beta-lactam](https://images.search.yahoo.com/search/images/cycle_beta-lactam). Consulté le : [15/05/2017].
- [13] Mensah S.E.P., Koudandé O.D., Sanders P., Laurentie M., Mensah G.A., Abiola F.A. Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*.2014; **33**: 27p.
- [14] Herzog K., Krause M. La problématique est désormais réelle : Résistance bactérienne : début de l'ère post-antibiotique. *EMH Media*.2015; **15**: 266 –270p.
- [15] Guillot J.F. Apparition et évolution de la résistance aux antibiotiques. *HAL archive ouverte : (HAL Id: hal-00901839), Elsevier/INRA Annuaire de Recherche Vétérinaire*. 1989; **20**: 3-16p.
- [16] Pharma études Chapitre V-24 : Bêta-Lactames & apparenté[En ligne] www.scribd.com/document/339072449/24-Beta-Lactamines. consulté le: [07/02/2017] .
- [17] Drawz S.M., Bonomo R.A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Review*. 2010 ; **23**: 167-171p.
- [18] Archambaud M. Les Antibiotiques : mode d'action et mécanisme de résistance. Laboratoire de Bactériologie-Hygiène .CHU Ranguel–Toulouse. 2009. 38p.
- [19] Zervosen A.,Sauvage E. , Frère J.M., Charlier P., Luxen A. Development of New Drugs for an Old Target — The Penicillin Binding Proteins. *molecules ISSN 1420-3049* .2012; **17**: 12480-12481p.
- [20] Piéboji J. G. Caractérisation des Bêta-Lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de Doctorat en Biochimie. Centre d'ingénierie des protéines. Université de Liège. Belgique. 2007. 127 p.
- [21] Schlesinger S.R., Lahousse M.J., Foster T.O., Kim S.K. Metallo- β -Lactamases and Aptamer-Based Inhibition. *Pharmaceuticals ISSN 1424-8247*.2011; **4**:420-421p.
- [22] Ghafourian S., Sadeghifard N., Soheili S., Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology .*Current Issues in Molecular Biology*. 2015; **17**: p

- [23] Pr. Bingen E. Mécanisme de résistance aux Bêta-Lactamines. Hôpital Robert Debré. Paris. 99p.
- [24] Houchi S. Les métallobêta-Lactamases-Recherche de souches bactériennes productrices- Essais d'inhibition de l'activité enzymatique relative par trois flavonoïdes commerciaux et deux extraits de *Terminalia chebula*. Thèse de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. Algérie. 2014. 87 p.
- [25] Marsik F.J., Nambiar S. Review of Carbapenemases and AmpC-beta Lactamases. *Concise reviews of Pediatric Infectious Diseases*. 2011; **30**: 1094-1095p.
- [26] Jacoby G. A. AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, January 2009 vol. **22** N°. 1; 161-182.
- [27] Protein Data Bank (PDB) Biological Macromolecular Resource [En ligne] <http://www.rcsb.org/pdb>. Consulté le: [21/03/2017].
- [28] Shimizu-Ibuka A., Bauvois C., Sakaiand H., Galleni M. Structure of the plasmid-mediated class C beta-lactamase ACT-1. Acta Crystallographica section F. *Structural Biology and Crystallization Communications-Protein structure communications* .2008 ; **64**: 334–337p.
- [29] Souna D., Sefraoui I., Drissi M. Résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du CHU de Sidi Bel Abbas (Algérie). *Microbiology Hygiene Alimentary*. 2016 ; **23**: 36-41p.
- [30] Ramdani-Bouguessa N., Ziane H., Djennane F., Bachtarzi M., Tazir M. Évolution de la résistance aux antibiotiques et des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* en Algérie. *Santé-MAGN*°18. 2013. 6-7p.
- [31] Chen J et al. Bêta-Lactamase Inhibitors: An Update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013; **13**, N°12: 16p.
- [32] Bebrone C. et al. Current Challenges in Antimicrobial Chemotherapy Focus on β -Lactamase Inhibition. *Drugs* 2010; **70** (6):651-679p.
- [33] Drugs.com. Drugs: A to Z. Penicillins and Beta-Lactamase inhibitors (Systemic). [En ligne] www.drug.com. Consulté le: [10/05/2017].

- [34] Drawz S.M., Papp-Wallace K.M., Bonomo R.A. New Beta-Lactamase Inhibitors: a Therapeutic Renaissance in an MDR World. *Journals ASM. org. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.2014;**58**, N° 4:1835-1846p.
- [35] Drawz S.M., Papp-Wallace K.M., Bonomo R.A. New Beta-Lactamase Inhibitors: a Therapeutic Renaissance in an MDR World. *AAC Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;**2**: 54p.
- [36] Watkins R.R., Papp-Wallace K.M., Drawz S.M., Bonomo R.A. Novel β -lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Frontiers in microbiology*. 2013 ; **4**: 8p.
- [37] Adam D. Beta-lactam/Beta-lactamase Inhibitor Combinations in Empiric Management of Pediatric Infections. *The Journal of International Medical Research*.2002;**30**: 10-19p.
- [38] Ehmann D.E.et al. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *PNAS, antibacterial, drug discovery, enzymology*.2012;**109**, N° 29: 11663–11668p.
- [39] Therrien C., Levesque R.C. Molecular basis of antibiotic resistance and Beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS MicrobiologyReviews*.2000 ; **24**:251-262p.
- [40] Bilami Y., Boukahil M .Etude in silico de l'inhibition de la Butyrylcholinestérase. Thèse de Mastère Université Mentouri Constantine. Algérie. 2015.43p.
- [41] E. H. Mokrani. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.
- [42] Grosdidier A. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie, Grenoble : Université Joseph Fourier. France. 2007.
- [43] PubChem OPEN CHEMISTRY DATA BASE. PubChem substance, compound and bioassay [En ligne] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Consulté le : [15/02/2017].
- [44] DRUGBANK DATA BASE, version 5.0. Drugs [En ligne] www.drugbank.ca/drugs. Consulté le:[15/02/2017].

- [45] Arrault A. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de Doctorat d'Université : Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. Université d'Orléans. France. 2007. 191p.
- [46] Dias R., Filgueira de Azevedo W.Jr. Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets .Bentham Science Publishers Ltd.* 2008; **9**: 1040-1047p.
- [47] Jacobsson M. Structure-Based Virtual Screening: New Methods and Applications in Infectious Diseases. Uppsala dissertation for the degree of doctor of philosophy. Faculty of Pharmacy.2008. 88p.
- [48] Chaib A., Guemmour S. Inhibition de la Bêta-Sécrétase 1, enzyme clef de la maladie d'Alzheimer, par la méthode du docking moléculaire. Mémoire de Master en Biochimie Moléculaire et Santé, Université des Frères Mentouri, Constantine. Algérie.2015. 71p.
- [49] Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions Peptide Deformylase–substances antibactériennes à l'aide de techniques de « docking » (arrimage) moléculaire. Thèse de Doctorat d'État en Microbiologie. 2007.126p.
- [50] Teniou S. Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.
- [51] Lipinski C. A., Lombardo F., Domini B. W., Feney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Elsevier, Advanced Drug Delivery Reviews.* 1997; **23**: 25p.
- [52] Molinspiration [En ligne] <http://www.molinspiration.com/>. Consulté le : [15/05/2017].
- [53] Bensegueni A. Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxgénase et la cyclooxygénase. Thèse de Doctorat d'État en Biochimie appliquée.Algérie.2007. 91p.
- [54] Chikhi A., BensegueniA. In Silico Study of the Selective Inhibition of Bacterial Peptide Deformylases by Several Drugs. *Journal of Proteomics & Bioinformatics.*2010; **3** Issue 2: 65p.

[55] Boucherit H., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Hioual k. S., Mokrani E. H. Theoretical study of the interactions involved in the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase by several molecules. *Computational Biology and Bioinformatics* . 2014;2: 73p.

[56] Merzoug A., Mermoum S., Khaled S., Chikhi A., Bensegueni A., Boucherit H. Theoretical Study of the Interactions Involved in the Inhibition of *Staphylococcus aureus* Peptide Deformylase by GSK1322322 Derivatives. *Journal Academia Fondation*. 2015; Vol.5 N° 2: 29p.

[57] DRUGBANK DATA BASE, version 5.0. Drugs. [En ligne] : redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank. Consulté le : [17/02/2017].

[58] DRUGBANK DATA BASE, version 5.0. Drugs [En ligne] www.rxlist.com. Consulté le : [17/02/2017].

[59] DRUGBANK DATA BASE, version 5.0. Drugs [En ligne] : www.porphyrifondation.com/drugdatabase/drug-list. Consulté le : [17/02/2017].

Annexes

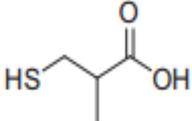
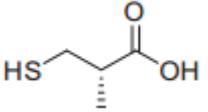
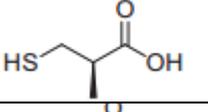
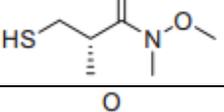
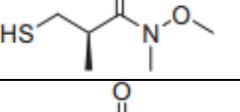
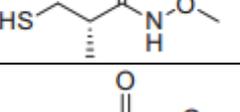
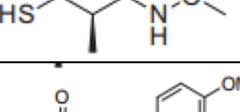
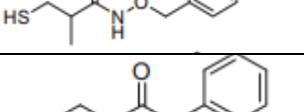
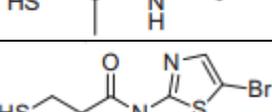
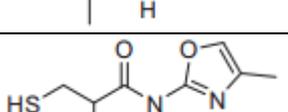
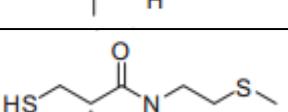
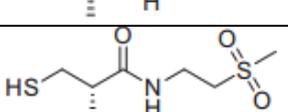
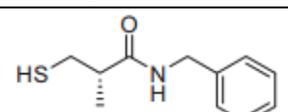
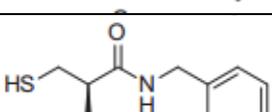
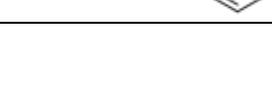
Annexe N°1 : Classe et code PDB des 35 complexes de Bêta-lactamase-inhibiteur étudiés
[27].

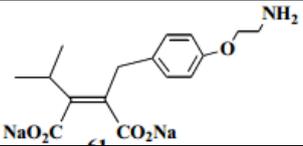
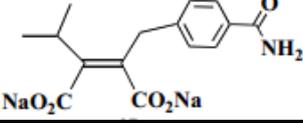
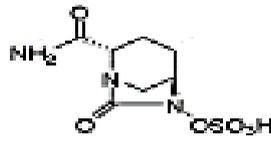
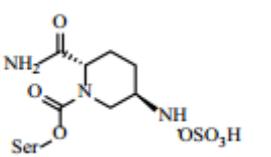
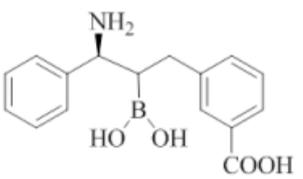
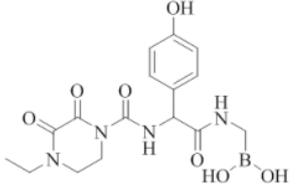
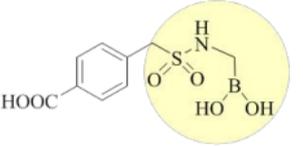
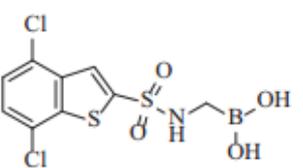
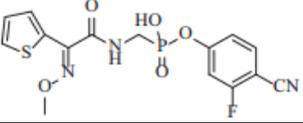
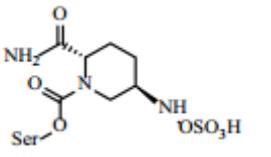
N°	Complexe pdb / type enzyme	Classe Bêta-Lactamase	Inhibiteur (ligand pdb)	Résolution Å	Organisme	Chaines protéiques
01	5HH4 (enzyme= MBL IMP-1)	B	60M (phosphonates)	2.0	<i>Serratia marcescens</i>	A, B
02	5HH5 (enzyme= B3 MBL L1)	B	60M (phosphonates)	1.8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A
03	5HH6 (enzyme= B3 MBL L1)	B	60N (phosphonates)	1.8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A
04	5LSC (enzyme= MBL VIM-2)	B	752 (triazolyl-thioacetamide)	1.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A, B
05	5EVB (enzyme= MBL L1)	B	3R9 (Bisthiazolidine D-CS319)	1.84	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A
06	5EVD (enzyme= MBL L1)	B	VC2 (bisthiazolidine D-VC26)	1.8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A
07	5EVK(enzym z= MBL L1)	B	3C7 (bisthiazolidine L-CS319)	1.63	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A
08	2ZD8(SHV1)	A	MER	1.05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A
09	5DTK (Oxa-48)	D	5F3	1.6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A, B, C, D
10	3S1Y (AmpC)	C	S1Y	1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A
11	1M2X (MBL-carbapenemase BlaB-1)	B	MCO (D-Captopril)	1.5	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	A, B, C, D
12	4ZAM (enzyme= SHV-1)	A	NXL104 Avibactam	1.42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A
13	5DTS (enzyme= OXA-48)	D	5F8	1.94	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A, B, C, D
14	5EEC (enzyme= KPC-2)	A	ZXM (S02030 acide boronique)	1.87	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A, B

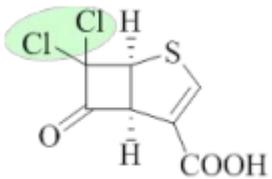
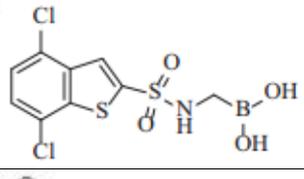
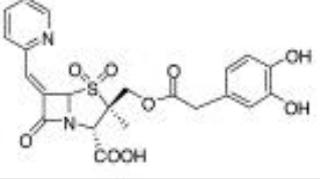
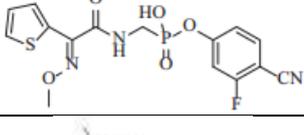
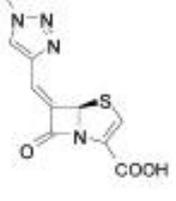
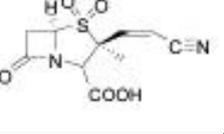
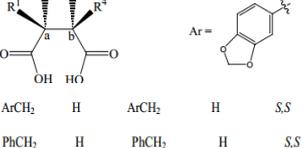
N°	Complexe pdb / type enzyme	Classe Bêta-Lactamase	Inhibiteur (ligand pdb)	Résolution Å	Organisme	Chaines protéiques
15	4ZAM (enzyme= SHV-1)	A	NXL104 Avibactam	1.42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A
16	4ZBE (enzyme= KPC-2)	A	NXL104 Avibactam	1.8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A
17	5EE8 (enzyme= SHV-1)	A	ZXM (S02030 acide boronique)	1.54	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A
18	5FAS (enzyme= OXA-48)	D	5VR (FPI-1523)	1.74	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A, B
19	5ACW (enzyme= MBL VIM-2)	B	RHU (SRP Thio-triazole))	1.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A, B
20	5ACX (enzyme= MBL VIM-2)	B	WL3 (SPR acide fluorophenyl benzoïque)	1.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A, B
21	4QHC (enzyme= BlaC)	C	33V (methylidene peneme)	1.96	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	A
22	4X68(enzyme= AmpC)	C	OP0 (OP0595 diazabicyclooctane)	1.68	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A, B
23	4OPZ (enzyme= TEM-1)	A	2UL (dérivé d'acide benzoïque)	1.45	<i>Escherichia coli</i>	A
24	4OQ0 (enzyme= TEM-1)	A	2UL (dérivé d'acide benzoïque)	1.42	<i>Escherichia coli</i>	A
25	4OQH (enzyme= TEM-1)	A	2UL (dérivé d'acide benzoïque)	1.7	<i>Escherichia coli</i>	A
26	4PVT (enzyme= MBL VIM-2)	B	S3C (dérivé ac.propanoïque)	2.0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A, B
27	4U4L (enzyme= MBL NDM-1)	B	3C7(Bisthiazolidine)	1.9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A, B, C, D
28	4LV0 (enzyme= AmpC)	C	APB (acide boronique)	1.65	<i>Escherichia coli</i>	A, B
29	4LV1 (enzyme= AmpC)	C	NL9 (acide boronique)	1.74	<i>Escherichia coli</i>	A, B

N°	Complexe pdb / type enzyme	Classe Bêta-Lactamase	Inhibiteur (ligand pdb)	Résolution Å	Organisme	Chaines protéiques
30	4LV3 (enzyme= AmpC)	C	25N (acide boronique)	1.42	<i>Escherichia coli</i>	A, B
31	4MBK (enzyme= SHV-1)	A	MA4 (maltoside) SA2-13	1.46	<i>Klebsiellapneumoniae</i>	A
32	4KZ3 (enzyme= AmpC)	C	1U1 (thiophene)	1.67	<i>Escherichia coli</i>	A, B
33	1JJT (enzyme= MBL IMP-1)	B	BDS (dérivé de l'acide succinique) IC ₅₀ = 0.009µM	1.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A, B
34	2QDS (MBL= IMP-1)	B	MCO (D-Captopril) Ki= 72µM	1.66	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A
35	1LLB (AmpC)	C	PCN IC ₅₀ = 0.9µM	1.72	<i>Escherichia coli</i>	A

N°	TYPE BÊTA-LACTAMASE	CLASSE	STRUCTURE	INHIBITEUR	
1	SHV	A		GLycylboronate et boronate analogues	
2					
3					
4					4,7-dichloro- 1-benzothien-2-yl sulfonaminomethyl DSABA
5					Oxapenem AM-112
6	MBL : NDM	B		CaEDTA	
7				Phenazine SB212305	
8				2- ω -phenylalkyl-3- mercaptopropionic acids PhenylC4SH	
9				D-Captopril	

10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			Analogues dérivés Captopril : Acide 3- Mercapto-2- methylpropanoic
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			

25				Dérivés de l'acide maléique
26				
27	AmpC	C		NXL104 <i>trans</i> -7-oxo-6-(sulfooxy)-1,6-diazabicyclo[3.2.1]octan-2-carboxamide (Inhibiteur non β -lactam)
28				Avibactam Inhibiteur non β -lactame
29				GLylylboronate et boronate analogues
30				
31				
32				
33				thiophenyl oxime-derived phosphonate
34				Avibactam Inhibiteur non β -lactame

35	OXA	D		Cyclobutanone
36				4,7-dichloro-1-benzothien-2-yl sulfonylaminomethyl DSABA
37				LN-1-255 penem sulfone
38				thiophenyl oxime-derived phosphonate
39				BRL 42715 C ₆ (N ₁ -methyl-1,2,3-triazolylmethylene) methylidene penem
40				Ro 48-1220 penem sulfone
41				Oxapenem AM-112

Annexe N°2 : Nom, classe et structure des 41 inhibiteurs de Bêta-Lactamase expérimentalement approuvés.

Résumé

Résumé :

Le docking moléculaire « *in silico* » est une nouvelle approche théorique qui permet la prédiction du mode d'interaction le plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur (cible thérapeutique) en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser les composés. Dans notre recherche, le programme Surflex a été utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Bêta-Lactamase de classe C « AmpC » désactivant plusieurs antibiotiques Bêta-lactames y compris les céphalosporines. Par tri-substitution, d'un composé référencé N°29, nous avons pu améliorer nettement son score de 4.51 à 7.91 et ce par l'introduction d'un groupement hydroxyle en position C8b, d'un groupement carboxyle en position C12 et d'un cycle benzène-3'-COOH au niveau de son carbone C3. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous a permis de vérifier la biodisponibilité du composé résultant de la tri-substitution qui se présente comme nouveau inhibiteur théoriquement puissant et sélectif envers la Bêta-Lactamase « AmpC ».

Mots clés : Docking moléculaire, Bêta- Lactamase « AmpC », cible thérapeutique, Surflex, score, Tri-substitution, Règle de Lipinski.

Abstract:

"*In silico*" molecular docking is a new theoretical approach in pharmaceutical chemistry that allows the prediction of the most favorable mode of interaction of a ligand within its receptor (therapeutic target) in a limited time and especially sometimes without having to synthesize these compounds. In our research, the molecular docking program, Surfex, has been used to develop "*in silico*" new inhibitors of « AmpC », class C Beta-Lactamase deactivating several beta-lactam antibiotics including Cephalosporins. By tri-substitution of a compound N°29, we were able to improve significantly its score from 4.51 to 7.91 by introducing a hydroxyl group at the C8b position, a carboxyl group at the C12 position and a benzene-3'-COOH ring at its C3 carbon. The application of the Lipinski rule allowed us to verify the bioavailability of the compound resulting from the tri-substitution that is considered as a new powerful theoretical inhibitor and selective for Beta-lactamase "AmpC".

Key words: Molecular docking, « AmpC » Beta-Lactamase, therapeutic target, Surfex, score, tri-substitution, Lipinski rule.

ملخص

تعتبر طريقة Docking منهج نظري جديد في ميدان الكيمياء الصيدلانية حيث يسمح عن طريق الحاسوب بدراسة الارتباطات الملائمة بين رابط وبروتينه المستهدف علاجيا وذلك في وقت يسير دون الحاجة إلى صنع هذه المركبات العلاجية.

خلال بحثنا، قمنا باستعمال برنامج Surfex من أجل تطوير، نظريا، مثبطات جديدة لإنزيم AmpC الذي ينتمي إلى صنف البيتا لاكتماز فئة "س" (Bêta-Lactamase «AmpC» de classe C) و الذي يقوم بتنشيط مفعول عدة مضادات حيوية تنتمي إلى عائلة بيتا لاكتام بما في ذلك سيفالوسبورين.

بواسطة استبدال ثلاثي للمركب رقم 29، استطعنا تحسين فعالية هذا الأخير بعد أن ارتفع معدل انجذابه وارتباطه مع مقر نشاط الإنزيم من 4.51 إلى 7.91 وهذا بعد أن قمنا بإضافة الهيدروكسيل OH إلى الكربون C8b، الكربوكسيل COOH إلى الكربون C12 وحلقة البنزين 3-COOH إلى الكربون C3.

ومن أجل التأكد من إمكانية استعمال هذا المركب الجديد كدواء لتنشيط نشاط الإنزيم AmpC من أجل الحفاظ على فعالية المضاد الحيوي، قمنا بتطبيق قاعدة ليبينسكي (Lipinski) التي سمحت بإعلامنا عن خصائص ADME لهذا المركب الثلاثي الاستبدال والذي يعتبر مثبطا نظريا جديدا ذو فعالية أقوى ضد إنزيم بيتا لاكتماز AmpC

الكلمات المفتاحية: طريقة Docking، البيتا لاكتماز فئة "س"، البروتين المستهدف علاجيا، برنامج Surfex ، معدل انجذاب، استبدال ثلاثي، قاعدة ليبينسكي.

Présenté et soutenu par :

**BENHAMOUD Amina
BOUFRAH Mohsane**

Date de soutenance : 20/06/2017

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
spécialité : *Biochimie Moléculaire et Santé*.

**Thème : Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Bêta-Lactamase de classe C
par docking moléculaire.**

Résumé :

Le docking moléculaire « *in silico* » est une nouvelle approche théorique qui permet la prédiction du mode d'interaction le plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur (cible thérapeutique) en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser les composés. Dans notre recherche, le programme Surflex a été utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Bêta-Lactamase de classe C « AmpC » désactivant plusieurs antibiotiques Bêta-lactames y compris les céphalosporines. Par tri-substitution, d'un composé référencé N°29, nous avons pu améliorer nettement son score de 4.51 à 7.91 et ce par l'introduction d'un groupement hydroxyle en position C8b, d'un groupement carboxyle en position C12 et d'un cycle benzène-3'-COOH au niveau de son carbone C3. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous a permis de vérifier la biodisponibilité du composé résultant de la tri-substitution qui se présente comme nouveau inhibiteur théoriquement puissant et sélectif envers la Bêta-Lactamase « AmpC ».

Mots clés : Docking moléculaire, Bêta- Lactamase « AmpC », cible thérapeutique, Surflex, score, Tri-substitution, Règle de lipinski.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biochimie Appliquée.

Jury d'évaluation :

Président : Mr. BENSEGUENI A.

Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1.

Rapporteur : Mr. MOKRANI E.H.

M.A.«A ».Université Frères Mentouri Constantine 1.

Examineur : Mr. CHIKHI A.

Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1.

Année Universitaire : 2016-2017