

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Frères Mentouri - Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire



N° d'ordre : 52/DS/2020

N° de série : 02/EV/2020

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Biochimie Appliquée

Présentée par : Hanane BOUCHERIT

Thème

**Recherche *in silico* de nouveaux composés bioactifs et applications à
l'inhibition de la méthionine aminopeptidase**

Soutenue le : 15 / 10 / 2020

Devant le jury :

Président : M. BENSEGUENI Abderrahmane Professeur U. Frères Mentouri Constantine 1

Examineurs

M. LAHOUAL Mesbah Professeur Univ. M.S. Benyahia - Jijel

M. BOUBENDIR Abdelhafid Maître de conférences A Univ. A. Boussof - Mila

M. DEMS Mohamed Abd Essalem Maître de recherche - CRBt - Constantine

Mlle. MOSBAH Asma Maître de conférences A U. Frères Mentouri Constantine 1

Directeur de thèse : M. CHIKHI Abdelouahab Professeur U. Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire : 2019 – 2020

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

فَاللّٰهُمَّ لَكَ الْحَمْدُ كَمَا يَنْبَغِي لِجَلَالِ وَجْهِكَ وَعَظِيمِ سُلْطَانِكَ .

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Monsieur CHIKHI Abdelouahab, Professeur à l'université Frères Mentouri - Constantine 1 pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ainsi que ses remarques constructives qui ont permis d'améliorer ce manuscrit.

J'adresse également tous mes remerciements à Monsieur BENSEGUENI Abderrahmane, Professeur à l'université Frères Mentouri - Constantine 1, de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse malgré ses nombreuses occupations.

Je remercie vivement Monsieur LAHOUAL Mesbah, Professeur à l'université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel, de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je le remercie également de me consacrer de son temps et d'avoir accepté de se déplacer.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement, Monsieur BOUBENDIR Abdelhafid, Maître de Conférences A à l'université Abdelhafid Boussouf - Mila, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.

J'adresse également ma gratitude à Monsieur DEMS Mohamed Abd Essalem, Maître de recherche au Centre de recherche en Biotechnologie - Constantine, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse et pour le temps qu'il y a consacré.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mademoiselle MOSBAH Asma, Maître de Conférences A à l'université Frères Mentouri - Constantine 1, pour avoir accepté sans hésiter d'examiner ce travail.

Afin de n'oublier personne, mes vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui m'ont aidés et contribués d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de cette thèse.

Mes vives remerciements s'adressent également à :

Mes très chers Parents

Merci pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant mes études. Puisse Dieu leur accorde santé, bonheur et longue vie.

Mon mari kamel

Tu es toujours là pour moi, tu m'écoutes quand je te raconte mes soucis, tu me remontes le moral quand je suis triste et fatiguée et tu m'encourages quand je baisse les bras. Merci beaucoup mon amour.

Mon fils Adam

Je t'aime plus que tout au monde mon petit homme.

Mes frères Walid et Nassim

Mes sœurs Samira et Houda

Ma très chère amie Amina et tous mes collègues

Je ne saurais conclure ces remerciements sans exprimer ma gratitude pour le soutien constant de ma famille et mes amis.

Hanane

RESUME

Thème : Recherche *in silico* de nouveaux composés bioactifs et applications à l'inhibition de la méthionine aminopeptidase

Résumé

L'émergence de microorganismes pathogènes multi-résistants, due à l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques, pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant. En effet, la résistance des bactéries aux antibiotiques rend quelque fois le traitement thérapeutique inefficace, et met le praticien dans des situations délicates, surtout lorsque la vie du malade est en cause. La solution de ce problème s'avère donc urgente et impose la recherche de nouveaux agents antimicrobiens. A ce titre, la méthionine aminopeptidase (MetAP) est utilisée comme une cible attrayante pour développer de nouveaux antibiotiques car elle est essentielle à la survie bactérienne. La MetAP est une métalloprotéase qui assure le clivage de la méthionine N-terminale au cours de la synthèse de protéines, une des étapes critiques dans la maturation des protéines.

Ce travail est axé sur le criblage virtuel *in silico* de la chimiothèque commerciale ZINC dans le but de découvrir des inhibiteurs à activité inhibitrice plus élevée contre la MetAP bactérienne. Deux opérations de filtrage à partir de la base de données ZINC ont permis de retenir 200 000 composés, parmi les 3.700.000 structures proposées, pour un criblage virtuel par FlexX. Après ce criblage, neuf composés chimiques des meilleurs hits prédits ont été achetés et évalués *in vitro*. L'activité antimicrobienne de chaque inhibiteur de MetAP a été testée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé contre deux bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium smegmatis*) et deux bactéries Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Parmi les composés étudiés, les inhibiteurs ZINC04785369 et ZINC03307916 ont montré une bonne activité antibactérienne. Pour caractériser davantage leur efficacité, la concentration minimale inhibitrice a été déterminée pour chaque composé par la méthode de microdilution qui a donné des résultats significatifs. Ces résultats suggèrent que les composés ZINC04785369 et ZINC03307916 sont des molécules prometteuses pour le développement de nouveaux inhibiteurs de la MetAP bactérienne.

Mots clés: Criblage virtuel, FlexX, chimiothèque ZINC, méthionine aminopeptidase, agents antimicrobiens.

Subject: *In silico* research for new bioactive compounds and their applications for inhibition of methionine aminopeptidase

Abstract

The great emergence of multi-resistant pathogenic microorganisms, due to the misuse and inappropriate use of antibiotics, poses a particularly serious public health problem. Indeed, the resistance of bacteria to antibiotics sometimes makes the therapeutic treatment ineffective, and puts the practitioner in difficult situations, especially when the life of the patient is involved. The solution of this problem is therefore urgent and requires the search for new antimicrobial agents. As such, methionine aminopeptidase (MetAP) is used as an attractive target for developing new antibiotics because it is essential for bacterial survival. MetAP is a metalloprotease that cleaves N-terminal methionine during protein synthesis, a critical step in protein maturation.

This work focuses on the *in silico* virtual screening of the commercial ZINC database to discover inhibitors with higher inhibitory activity against bacterial MetAP. Two filtering operations from the ZINC database have made it possible to retain 200 000 compounds, allowed the 3.700.000 structures proposed, for a virtual screening by FlexX. After this screening, nine chemical compounds of the top hits predicted were purchased and evaluated *in vitro*. The antimicrobial activity of each MetAP inhibitor was tested by the disc-diffusion assay against two Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium smegmatis*) and two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). Among the studied compounds, inhibitors ZINC04785369 and ZINC03307916 showed promising antibacterial activity. To further characterize their efficacy, the minimum inhibitory concentration was determined for each compound by the microdilution method which showed significant results. These results suggest that ZINC04785369 and ZINC03307916 are promising molecules for the development of new inhibitors of bacterial MetAP.

Keywords: Virtual screening, FlexX, Zinc database, Methionine aminopeptidase, antibacterial agents.

الموضوع: البحث *in silico* عن المركبات الجديدة النشطة حيويًا وتطبيقاتها لتثبيط الميثيونين أمينوبيبتيداز

الملخص

ظهور الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض متعددة المقاومة، بسبب سوء الاستخدام أو الاستخدام غير المناسب للمضادات الحيوية، يشكل مشكلة صحية عامة خطيرة للغاية. في الواقع، فإن مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية تجعل العلاج في بعض الأحيان غير فعال، ويضع الممارس في مواقف صعبة، خاصة عندما يتعلق الأمر بحياة المريض. لذلك فإن حل هذه المشكلة أمر ملح ويتطلب البحث عن عوامل جديدة مضادة للميكروبات. على هذا النحو، يستخدم الميثيونين أمينوبيبتيداز (MetAP) كهدف جذاب لتطوير المضادات الحيوية الجديدة لأنه ضروري للبقاء على قيد الحياة. MetAP عبارة عن ميتالوبروتياز الذي يقطع الميثيونين الطرفي أثناء تخليق البروتين، وهي خطوة حاسمة في نضج البروتين.

يركز هذا العمل على الفحص الظاهري ان سيليكو لقاعدة البيانات زنك للمرئبلت الكيميائية لاكتشاف مثبطات ذات نشاط مانع أعلى ضد MetAP البكتيري. أُنحِت عمليتا ترشيح من قاعدة بيانات ZINC الاحتفاظ بـ 200000 مركبة، من بين 3.700.000 من الهياكل المقترحة، لفحص افتراضي بواسطة FlexX. بعد هذا الفحص، تم شراء تسعة مركبات كيميائية من أفضل النتائج المتوقعة وتقييمها في المختبر. تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات لكل مثبط MetAP من خلال طريقة نشر الأقراص على سطح الأجار ضد اثنين من البكتيريا إيجابية الجرام (*Staphylococcus aureus*) و (*Mycobacterium smegmatis*) واثنين من البكتيريا سالبة الجرام (*Escherichia coli*) و (*Pseudomonas aeruginosa*). من بين المركبات التي شملتها الدراسة، أظهرت المثبطات ZINC04785369 و ZINC03307916 نشاط واعد مضاد للجراثيم. لتأكيد فعاليتها، تم تحديد الحد الأدنى من تركيز المثبطة لكل مركب من خلال طريقة microdilution التي أعطت نتائج هامة. هذه النتائج تشير إلى أن ZINC04785369 و ZINC03307916 جزيئات واعدة لتطوير مثبطات جديدة ضد MetAP البكتيرية.

الكلمات المفتاحية: الفحص الظاهري، FlexX، قاعدة البيانات زنك للمرئبلت الكيميائية، الميثيونين أمينوبيبتيداز، مضادات الميكروبات.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUME

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DE GRAPHERS

LISTE DES ABREVIATIONS

GLOSSAIRE

INTRODUCTION..... 1

Première partie : Synthèse bibliographique

CHAPITRE I. LES INFECTIONS BACTERIENNES..... 3

I. Généralité..... 3

II. Les antibiotiques 3

III. Classification des antibiotiques et leurs mécanismes d'action..... 5

IV. La résistance bactérienne aux antibiotiques..... 6

V. Liste des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques..... 7

VI. La découverte des nouveaux agents antimicrobiens..... 8

CHAPITRE II. LA METHIONINE AMINOPEPTIDASE..... 10

I. L'excision de la méthionine N-terminale 11

I.1. Définition..... 11

I.2. L'excision de la méthionine N-terminale une cible thérapeutique attractive.... 11

II. La méthionine aminopeptidase..... 12

II.1. Définition..... 12

II.2. Classification des MetAP..... 12

II.3. Rôle physiologique de la MetAP..... 13

II.4. Mécanisme de catalyse..... 14

II.5. Propriétés de la MetAP.....	15
III. Structure générale de la MetAP	16
III.1. Structure tridimensionnelle.....	16
III.2. Le site actif de la MetAP.....	17
IV. Les inhibiteurs de la méthionine aminopeptidase.....	18
IV.1. Les inhibiteurs covalents.....	18
IV.2. Les inhibiteurs compétitifs.....	19
CHAPITRE III. LE CRIBLAGE VIRTUEL.....	21
I. La recherche de nouveaux médicaments.....	21
II. La place de l'ordinateur dans le processus de découvert de médicaments.....	22
III. Importance des chimiothèques dans la recherche de nouveaux candidats médicaments.....	23
IV. Le criblage virtuel <i>in silico</i>.....	25
IV.1. L'intérêt du criblage virtuel.....	25
IV.2. Les stratégies du criblage virtuel.....	26
V. Docking moléculaire.....	29
V.1. Définition.....	29
V.2. Principe du docking.....	30
V.3. Le programme de docking moléculaire FlexX.....	30
V.3.1. Définition.....	30
V.3.2. Approche incrémentale.....	31
V.3.3. Flexibilité conformationnelle du ligand.....	31
V.3.4. Interaction protéine-ligand.....	33
V.3.5. La fonction de score.....	34
VI. Exemples de réussites de criblage virtuel.....	35

Deuxième partie : Matériel et méthodes

CHAPITRE IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	38
Matériel et méthodes d'étude <i>in silico</i>	38

I.	Evaluation de programme de criblage.....	38
I.1.	Le RMSD.....	38
I.2.	Analyse visuelle.....	39
I.3.	Le coefficient de corrélation (r)	39
I.4.	La capacité de FlexX à discriminer les actifs des inactifs.....	40
II.	Les outils du criblage virtuel.....	41
II.1.	Le logiciel de criblage virtuel Flex X.....	41
II.2.	Choix de la cible enzymatique.....	45
II.3.	La collection de ligands.....	46
II.3.1.	La base de composés chimiques ZINC.....	46
II.3.2.	Filtrage de la base de données ZINC.....	48
II.4.	Le criblage virtuel par docking moléculaire de la banque de données ZINC...	52
II.5.	Evaluation des propriétés ADME-Tox.....	54
	Matériel et méthodes d'étude <i>in vitro</i>	59
I.	Les souches microbiennes testées.....	60
II.	Tests d'activité antimicrobienne.....	60
III.1.	Méthode de diffusion à partir d'un disque sur milieu solide.....	61
III.2.	Réalisation de l'antibiogramme.....	62
III.3.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de micro dilution en milieu liquide.....	63

Troisième partie : Résultats et discussion

CHAPITRE V.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	68
I.	Tests de fiabilité du programme de docking.....	68
I.1.	La précision du positionnement des composés (RMSD).....	68
I.2.	La superposition des géométries du ligand.....	69
I.3.	Coefficient de corrélation linéaire (r).....	72
I.4.	Evaluation de la capacité de FlexX à discriminer les actifs des inactifs.....	74
II.	Etude des interactions intervenant dans l'inhibition de la MetAP bactérienne par	76

diverses molécules provenant de la PDB.....	
II.1. Interaction MetAP-inhibiteurs.....	76
II.2. Analyse visuelle des interactions « EcMetAP - B21 ».....	78
III. Criblage virtuel basé sur la structure de la protéine.....	81
III.1. Filtrage et préparation finale de la chimiothèque ZINC.....	81
III.2. Protocole du criblage virtuel.....	83
III.3. Molécules sélectionnées comme candidates.....	85
III.4. Prédiction du mode d'interaction des meilleurs composés.....	88
III.5. Prédiction de la similarité médicamenteuse.....	103
IV. Activité antibactérienne <i>in vitro</i>	106
IV.1. Activité antibactérienne sur <i>Mycobacterium smegmatis</i>	106
IV.2. Activité inhibitrice sur les souches bactériennes <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>	109
IV.3. Détermination des CMI des meilleurs composés.....	111
CONCLUSION.....	114
BIBLIOGRAPHIE.....	116
ANNEXES	
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	

LISTE DE FIGURES

N° de figure	Titre de la figure	Page
I.1.	Ordre chronologique de l'apparition des classes d'antibiotiques en usage clinique.	4
I.2.	Mécanismes d'action des antibiotiques.	6
I.3.	Les décès attribuables à la RAM chaque année par rapport aux autres principales causes de décès.	9
II.1.	Synthèse protéique chez les bactéries.	10
II.2.	Réaction catalysée par la méthionine aminopeptidase.	12
II.3.	Classification des MetAP.	13
II.4.	Mécanisme réactionnel proposé.	14
II.5.	La spécificité de substrats des MetAPs.	15
II.6.	Structure tertiaire de l' <i>Ec</i> MetAP.	16
II.7.	Le site actif de l' <i>Ec</i> MetAP.	17
II.8.	Inhibiteurs de MetAP2s, la fumagilline et ses dérivés.	19
II.9.	Inhibiteurs des MetAPs.	20
III.1.	Applications de l'approche <i>in silico</i> aux différentes étapes du développement d'un médicament.	22
III.2.	Représentation schématique des stratégies du criblage virtuel.	27
III.3.	Criblage virtuel par docking moléculaire.	28
III.4.	Docking protéine-ligand.	29
III.5.	Principales étapes de docking.	30

III.6.	Construction incrémentale d'un ligand au sein du site actif.	31
III.7.	Technique utilisée pour placer le fragment de ligand dans le site actif.	32
III.8.	Reconstruction du ligand dans le site actif.	33
IV.1.	Page d'accueil de logiciel FlexX.	41
IV.2.	Préparation de l'enzyme MetAP par FlexX.	42
IV.3.	Résultat de l'inhibiteur docké par FlexX.	43
IV.4.	Description d'une molécule disponible commercialement dans la base ZINC.	47
IV.5.	Capture d'écran du logiciel <i>Screening Assistant</i> .	49
IV.6.	Exemple fictif de l'espace chimique projeté en deux dimensions.	52
IV.7.	Représentation schématique des étapes de criblage de la chimiothèque ZINC pour la découverte d'inhibiteurs de la MetAP bactérienne.	53
IV.8.	Les principales raisons de l'échec dans le développement de médicaments.	54
IV.9.	Répartition des médicaments métabolisés par les différentes isoenzymes de CYP450	56
IV.10.	Déroulement d'un test d'Ames.	58
V.1.	Superposition spatiale entre la pose du ligand FCD donné par rayon-X (coloré en vert) et celle calculée par FlexX.	70
V.2.	Superposition du ligand M2C donné par rayon-X (coloré en vert) et celle dockée par FlexX.	71
V.3.	Superposition du ligand Y02 donné par rayon-X (coloré en vert) et celle dockée par FlexX.	71
V.4.	Comparaison de la conformation expérimentale du ligand Met (coloré en	72

	vert) et sa conformation optimale simulée par FlexX.	
V.5.	Docking de l'inhibiteur B21 dans le site actif de l'enzyme EcMetAP.	80
V.6.	Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé B21 avec la MetAP de l' <i>E.coli</i>	80
V.7.	Représentation des résidus d'interaction de l'inhibiteur ZINC05515132 avec le site actif d'EcMetAP.	88
V.8.	Représentation des interactions hydrophobiques formées entre le composé ZINC05515132 et le site actif de l'EcMetAP.	89
V.9.	Représentation de liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur ZINC04785369.	90
V.10.	Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur ZINC04785369.	91
V.11.	Résultat de docking de composé ZINC03307916 avec le site actif de l'EcMetAP.	92
V.12.	Interactions hydrophobique entre l'inhibiteur ZINC03307916 et le site de liaison de l'EcMetAP.	93
V.13.	Représentation des interactions ZINC15085593-EcMetAP.	94
V.14.	Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé ZINC15085593 avec le site actif de l'EcMetAP.	94
V.15.	Docking de l'inhibiteur ZINC01396580 dans le site actif de la MtMetAP par FlexX.	95
V.16.	Représentation des interactions hydrophobiques formées entre l'inhibiteur ZINC01396580 et le site actif de l'MtMetAP.	96
V.17.	Représentation du mode de fixation prédit par le programme FlexX entre MtMetAP et l'inhibiteur ZINC15880082.	97

V.18.	Interactions hydrophobique entre l'inhibiteur ZINC15880082 et le site de liaison de la MtMetAP.	98
V.19.	Résultat de docking avec FlexX de l'inhibiteur ZINC72280453 avec le site actif de <i>S.aureus</i> MetAP.	99
V.20.	Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé ZINC72280453 avec le site actif de <i>S.aureus</i> MetAP.	99
V.21.	Mode de liaison de composé ZINC04139358 avec le site actif de <i>S.aureus</i> MetAP.	100
V.22.	Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur ZINC04139358 avec le site actif de la <i>S.aureus</i> MetAP.	101
V.23.	Représentation de l'inhibiteur ZINC31308822 dans le site actif de la MtMetAP par FlexX.	102
V.24.	Photographies de la zone inhibitrice des composés testés sur la souche bactérienne <i>M. smegmatis</i> .	107
V.25.	Diamètre des zones d'inhibition pour l'inhibiteur ZINC04785369.	108
V.26.	Photographies de la zone inhibitrice des composés testés sur les souches bactériennes.	110
V.27.	Utilisation des microplaques pour la détermination des CMI.	111

LISTE DES TABLEAUX

N° du tableau	Titre du tableau	Page
II.1.	Comparaison entre les sites de fixation de métal et de substrat pour la MetAP type I et type II.	18
III.1.	Le processus de découverte de nouveaux médicaments.	21
III.2.	Bases de données de petites molécules les plus connues.	24
III.3.	Types d'interactions rencontrés dans le complexe protéine-ligand.	33
III.4.	Types d'interactions de programme FlexX.	34
III.5.	Quelques exemples de médicaments commercialisés.	35
IV.1.	Résultats du docking de meilleures positions de ligand.	44
IV.2.	Principales caractéristiques des complexes utilisés.	45
IV.3.	Souches bactériennes étudiées.	60
IV.4.	Les antibiotiques de référence.	63
IV.5.	L'antibiotique de référence.	65
IV.6.	Préparation d'une microplaque 96 puits.	66
V.1.	Valeurs de RMSD des quatre complexes de la MetAP étudiés.	70
V.2.	Résultats de docking pour EcMetAP.	77
V.3.	Les différentes interactions formées par le composé B21.	79
V.4.	Meilleurs scores obtenus par FlexX des inhibiteurs dans le site actif de l'EcMetAP.	84
V.5.	Données chimiques et structurales des composés sélectionnés comme candidats.	86

V.6.	Les neufs ponts formés par le composé ZINC05515132 et les résidus du site actif de l'EcMetAP.	89
V.7.	Interactions formées par le composé ZINC04785369.	90
V.8.	Liaisons formées par le composé ZINC03307916 dans le site actif de l'EcMetAP.	92
V.9.	Les sept ponts formés par le composé ZINC15085593.	93
V.10.	Interactions formées par l'inhibiteur ZINC01396580.	96
V.11.	Ponts formés par l'inhibiteur ZINC15880082 dans le site actif de la MtMetAP.	97
V.12.	Les ponts formés par l'inhibiteur ZINC72280453.	98
V.13.	Les interactions formées par l'inhibiteur ZINC04139358.	101
V.14.	Liaisons formées par l'inhibiteur ZINC31308822.	102
V.15.	Propriétés pharmacocinétiques de petites molécules obtenues à partir de serveur SwissADME.	104
V.16.	Le profil de toxicité relative des composés étudiés obtenus à partir de serveur preADMET.	105
V.17.	Inhibition de la croissance de <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	106
V.18.	Inhibition de la croissance de <i>M. smegmatis</i> avec le composé ZINC04785369.	108
V.19.	Diamètres des zones d'inhibition de la croissance de trois souches bactériennes.	109
V.20.	Valeur de la CMI pour les meilleurs inhibiteurs relatifs aux bactéries testées.	112

LISTE DE GRAPHES

N° de graphe	Titre de graphe	Page
V.1.	Résultats en pourcentage du test RMSD à deux intervalles.	69
V.2.	Corrélation entre les énergies d'interaction des différents inhibiteurs données par FlexX et leur activité biologique (Log IC ₅₀).	73
V.3.	Courbe d'accumulation représentant 7884 molécules pour la cible thérapeutique TRYB1.	74
V.4.	Courbe d'accumulation représentant 10% de la chimiothèque totale.	75
V.5.	Molécules commerciales filtrées (1 915 167 million) de ZINC.	82
V.6.	Sélection par diversité (200 000 composés).	83

LISTE DES ABREVIATIONS

3D: Trois dimensions

Å : Angström

ADME/Tox : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité

CA-SFM : Société française de microbiologie

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CV : Criblage virtuelle

DUD-E: Directory of Useful Decoys Enhanced

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EcMetAP: Méthionine aminopeptidase de l'*E.coli*

IC₅₀ : Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition

ID : Code identifiant

INT : Iodonitrotétrazolium

MDR : Multiple Drug Resistance

MetAP : Méthionine aminopeptidase

MtMetAP : Méthionine aminopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis*

NME : Excision de la Méthionine N-terminale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PDB: Protein Data Bank

PDF: Peptide déformylase

RMSD: Root Mean Square Deviation

SDF: Structure Data File

SMILES: Simplified Molecular-Input Line-Entry System

TRYB1 : Tryptase beta-1

GLOSSAIRE

Antibiotique : molécule naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui détruit (bactéricide) ou bloque (bactériostatique) la croissance bactérienne.

Clusterisation : processus de rassemblement de molécules selon une propriété commune (en général, une similarité de structure ou de pose).

Chimiothèque : collection de molécules (existantes ou non) dont les structures et éventuellement les propriétés sont archivées sous un format électronique. La plupart des chimiothèques couramment utilisées existent à la fois physiquement (molécules disponibles en poudre) et électroniquement.

Concentration minimale inhibitrice : concentration minimale en antibiotique permettant d'inhiber totalement la multiplication bactérienne (absence de trouble ou d'activité métabolique).

Cible médicamenteuse : est une clé moléculaire qui se trouve dans un métabolisme particulier et évolue dans un cheminement de signalisation spécifique à une pathologie ou une infection, ou à la survie de pathogènes microbiens.

Composés formant des agrégats : ou promiscuous aggregating inhibitors, sont des inhibiteurs peu sélectifs et agissants de manière non compétitive. Ils forment des agrégats de taille variable (de 50 à 400 nm) qui se fixent en différents endroits de la protéine et inhibent certaines enzymes.

Composés réactifs : sont des molécules contenant des groupements essentiellement électrophiles. De part leur forte réactivité, ils forment généralement des liaisons covalentes avec la cible biologique.

Croissance bactérienne : est une augmentation des constituants cellulaires de micro-organismes. Elle peut se traduire par une augmentation de la taille des organismes et/ou du nombre d'organismes.

Drug design : processus consistant à modifier une molécule dans le but d'améliorer ses capacités en tant que médicament.

Drug discovery : ensemble des processus menant à l'identification de molécules actives pouvant être commercialisées en tant que médicament.

Decoy : molécule inactive, utilisée pour évaluer l'efficacité des méthodes employées.

Faux positifs : un résultat positif qui ne correspond pas à l'activité biologique attendue.

Format SMILES : (Simplified Molecular-Input Line-Entry System) permet la représentation d'une molécule par une chaîne de caractères, symbolisée par un enchaînement d'atomes et de liaisons.

Inhibiteur : une substance se liant à une enzyme, qui ralentit leur activité et empêche la fixation du substrat sur le site actif.

In-silico : est une technique effectuée à base d'ordinateur ou par l'intermédiaire des modèles mathématiques et des simulations informatiques.

Leads : candidats-médicaments les plus probables pour une évaluation plus poussée.

Ligand : une structure, généralement une petite molécule qui se lie à un site de liaison.

LogP : est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau ($\text{LogP} = \text{Log Coct/Ceau}$). Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule.

Pose d'arrimage : la conformation et la position prédite du ligand arrimé au sein du site actif d'une cible donnée.

Site de liaison : ensemble des acides aminés formant une cavité capable d'interagir avec un ligand.

Warheads : induisent des faux positifs en formant des liaisons non covalentes, et donc réversibles, avec la cible biologique, du type agents chélatants, inhibiteurs suicides, composés polyanioniques, ...etc.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'augmentation du nombre de bactéries multirésistantes aux antibiotiques est devenue une menace sanitaire majeure au niveau international. Il est évident de noter que l'utilisation abusive et non contrôlée des antibiotiques a longtemps contribué à l'émergence et à la large diffusion de la résistance, de même que de mauvaises pratiques de prévention et de lutte contre l'infection (OMS, 2017 ; Colombo et *al.*, 2017 ; Duin et Paterson, 2016 ; Jyoti et *al.*, 2014). Par conséquent, il est important de se concentrer sur le développement rationnel de nouveaux antibiotiques avec de nouvelles cibles moléculaires capables de surmonter les résistances développées par les bactéries Gram positives et Gram négatives contre les agents antibactériens actuels. L'un de ces domaines de recherche est d'agir sur les enzymes constituant la machinerie biochimique responsable de la biosynthèse des protéines cellulaires. Plus précisément, au cours des 20 dernières années, les enzymes responsables de l'incorporation et de l'élimination de la méthionine N-terminale dans la biosynthèse des protéines sont devenues des cibles de plus en plus importantes.

La méthionine aminopeptidase (MetAP) présente un intérêt particulier car son activité en tant qu'enzyme intracellulaire, coupant de manière co-translationnelle la méthionine en position N-terminale des chaînes peptidiques naissantes, fait partie intégrante de divers processus biologiques (Lowther et *al.*, 2002; Frottin et *al.*, 2006). Sa fonction principale dans la cellule, désignée dans la littérature par l'excision irréversible de la méthionine N-terminale (NME), constitue l'une des étapes critiques dans la maturation des protéines (Mitra et *al.*, 2008 ; Olaleye et *al.*, 2010).

De nos jours, les méthodes informatiques (*in silico*) jouent un rôle de plus en plus important dans la découverte et le développement de médicaments. Le criblage virtuel (CV) est une technique de calcul qui permet l'exploration de larges chimiothèques à la recherche de nouvelles molécules actives (appelées «hits») vis-à-vis d'une cible thérapeutique donnée. Lorsqu'il est utilisé avant le criblage expérimental, il peut être considéré comme un puissant filtre de calcul permettant de réduire la taille d'une chimiothèque, qui sera ensuite testée expérimentalement (Kumar et *al.*, 2015). Le CV a été historiquement essentiellement basé sur la connaissance de la structure tridimensionnelle de la cible (*structure based virtual screening*, SBVS). Dans ce cas, les molécules à évaluer sont d'abord arrimées (*docking*) artificiellement dans le site actif de la cible. L'interaction est ensuite quantifiée (*scoring*) pour conduire à la sélection de nouvelles entités chimiques potentiellement actives (Walters et *al.*,

1998; Shoichet, 2004). Dans le domaine de la conception de médicaments antibactériens, les méthodes de CV ont été largement utilisées et ont permis d'identifier de nouvelles molécules comme agents antibactériens potentiels (Cvijetić et *al.*, 2018 ; Fer et Corre., 2018).

Ce travail a été effectué autour de deux axes : l'évaluation de méthodes de criblage virtuel assisté par ordinateur et leur utilisation dans la recherche de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique ciblant la MetAP bactérienne en appliquant une stratégie combinant un criblage virtuel basé sur la structure de la cible et des tests microbiologiques. Par cette étude, nous essayons de contribuer d'une part, à la compréhension des mécanismes fondamentaux de la liaison entre une cible protéique et son inhibiteur et, d'autre part, à la recherche des nouveaux inhibiteurs potentiels de la MetAP bactérienne par deux approches complémentaires, *in silico* et *in vitro*.

Dans le premier chapitre de ce travail, nous avons donné un aperçu sur les infections bactériennes et les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. Le deuxième chapitre de ce manuscrit présente un descriptif détaillé de notre cible, la MetAP (structure, rôle, localisation et site de liaison) tout en citant les différents inhibiteurs déjà connus de la MetAP. Le troisième chapitre est consacré à l'étude bibliographique de l'application du criblage virtuel, qui représente un moyen de plus en plus utilisé pour détecter *in silico* des inhibiteurs de cibles d'intérêt thérapeutique. Le quatrième chapitre, intitulé « matériel et méthodes », décrit de manière approfondie les outils utilisés pour effectuer notre recherche. Un focus particulier est réalisé sur les programmes FlexX et *Screening Assistant*, ainsi que sur la base de données ZINC. L'analyse et l'interprétation des résultats de notre travail de recherche sont regroupées dans le cinquième chapitre. Nous terminons cette thèse par une conclusion suivie par la présentation de quelques perspectives pour des recherches futures.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. LES INFECTIONS BACTERIENNES

I. Généralités

Les maladies infectieuses sont les maladies les plus fréquentes, plus du tiers des malades hospitalisés reçoivent au moins un antibiotique. On distingue les maladies bactériennes dues aux bactéries et les maladies virales dues aux virus ; bactéries et virus sont encore appelés microbes, germes ou micro-organismes. Les infections peuvent être également d'origine fongique ou parasitaire. Leur niveau de contagion et leur mode de transmission diffèrent selon la nature de l'agent infectieux (Labayle, 2001).

Les bactéries pathogènes pour l'homme sont à l'origine de multiples maladies infectieuses qui, en particulier dans les pays en voie de développement, font encore des ravages. Le pouvoir pathogène d'une bactérie est dû à son aptitude propre à envahir les tissus en résistant aux défenses de l'hôte et en se multipliant (virulence). Il peut également être dû à l'aptitude du germe à sécréter une toxine, c'est une macromolécule douée d'une action toxique chez l'homme (ex : toxine diphtérique et tétanique), on parle alors de toxicité (Labayle, 2001).

La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle a constitué une véritable révolution dans le domaine médical. Ces molécules ont été considérées comme étant des armes puissantes qui sauraient éradiquer toute maladie infectieuse d'origine bactérienne « remède miracle ». Ils ont rapidement pris une place importante dans la médecine moderne, soignant les infections bénignes ou redoutées comme la tuberculose et la syphilis. Il existe de nombreux antibiotiques différents, qui ont chacun un mécanisme d'action spécifique. Ils agissent ainsi sur un certain type de bactérie, dans un certain environnement. La prescription d'antibiotiques est nécessairement faite par un médecin et repose sur un diagnostic précis pour identifier le germe impliqué et le traitement le plus adapté (Flandrois, 2000). Cependant, l'utilisation massive et déraisonnée des antibiotiques ces dernières années a entraîné l'apparition et la propagation de bactéries résistantes, voire multirésistantes.

II. Les antibiotiques

La découverte des antibiotiques est généralement attribuée à Alexander Fleming, qui a observé les effets de la pénicilline en 1928. Alors que, le terme « antibiotique » fut proposé en 1941 par Waksman pour désigner toute substance chimique produite par un microorganisme

(champignon ou bactérie) et agissant à faible dose pour inhiber la croissance ou de détruire d'autres microorganismes. Par la suite, cette notion s'est étendue aux substances semi-synthétiques ou même synthétiques ayant la même fonction. L'antibiotique doit répondre aux critères de la définition de Paul Ehrlich sur la chimiothérapie. Pour ce dernier, une substance chimio-thérapeutique utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses doit être nuisible pour le microorganisme pathogène mais inoffensive pour les cellules de l'hôte. De ce fait, un nombre restreint d'antibiotiques découverts est utilisé en médecine thérapeutique (Courvalin et *al.*, 2001 ; Nauciel et Vildé, 2005 ; Martínez, 2008).

Dès lors, la pénicilline a été massivement utilisée, et a permis de sauver des millions de vie. Par la suite, de nombreuses autres molécules antibiotiques ont été découvertes (figure I.1), conduisant à l'essor de cette classe thérapeutique, permettant de traiter nombre d'infections jusqu'alors considérées comme mortelles.

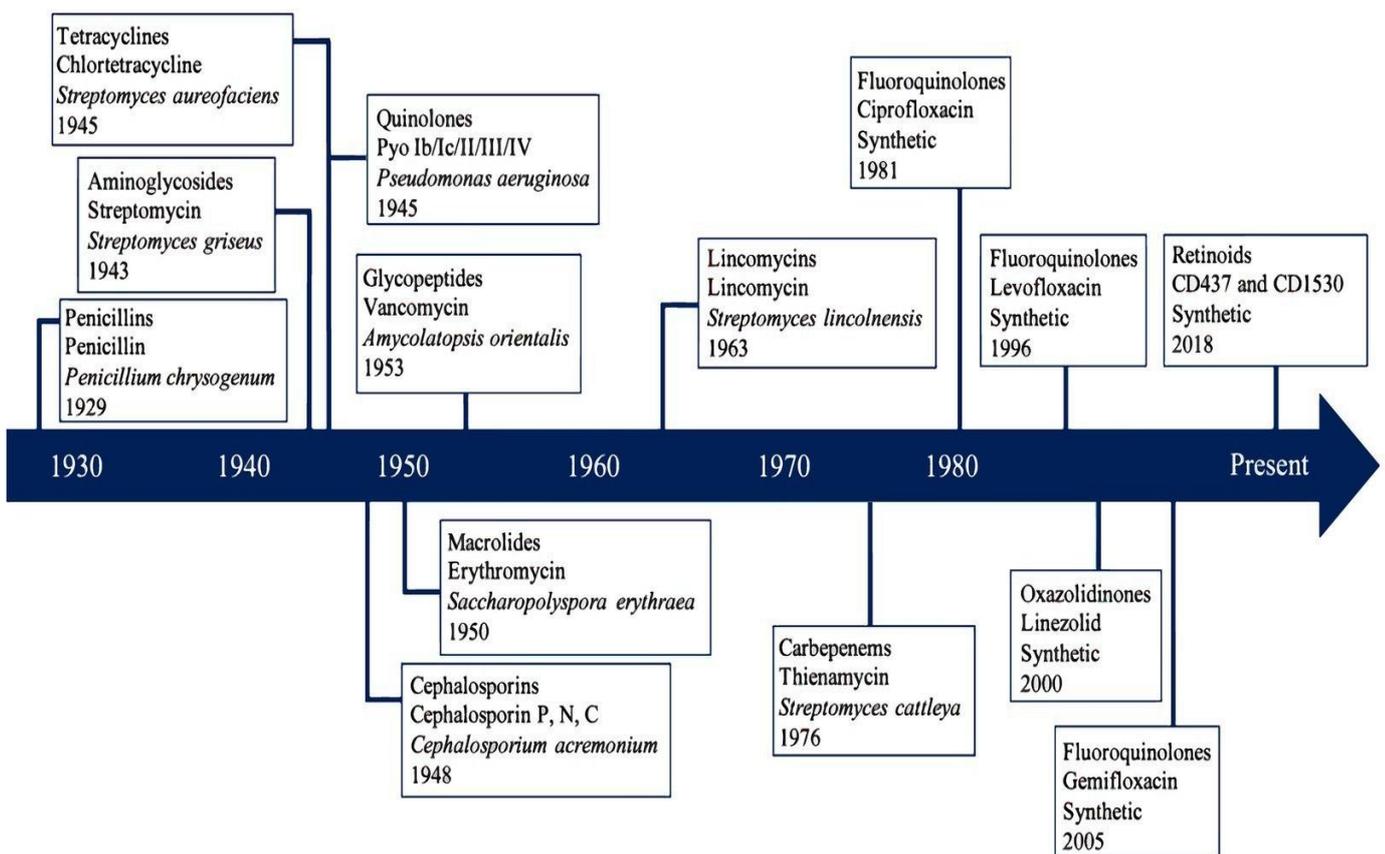


Figure I.1. Ordre chronologique de l'apparition des classes d'antibiotiques en usage clinique. Chaque carré contient la classe d'antibiotiques, le premier composé isolé, l'organisme qui a naturellement produit le composé et l'année d'isolement (Mullis et *al.*, 2019).

III. Classification des antibiotiques et leurs mécanismes d'action

Les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne (Walsh, 2000 ; Yala et *al.*, 2001) ; cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Les mécanismes d'action des antibiotiques sont très variables, ils sont résumés dans la figure I.2 ci dessous.

III.1. Action au niveau de la paroi bactérienne

L'antibiotique restreint la biosynthèse de peptidoglycane. Par exemple, les β -lactamines inhibent les transpeptidases limitant la formation des mailles de la paroi.

III.2. Action au niveau de la membrane

L'antibiotique fait des trous dans la membrane responsables de fuites cellulaires (par exemple les polypeptides).

III.3. Action au niveau des processus cytoplasmiques

- **La synthèse des protéines** : l'antibiotique se fixe sur les ribosomes bactériens et inhibe la synthèse des protéines (par exemple : tétracyclines, aminosides, phénicolés, macrolides, lincosamides).
- **La synthèse des acides nucléiques** : l'antibiotique inhibe la synthèse de l'acide folique qui participe à la formation du tétrahydrofolate (cofacteurs de la synthèse d'acides aminés et de bases puriques). C'est le cas des sulfamides et triméthoprimes.

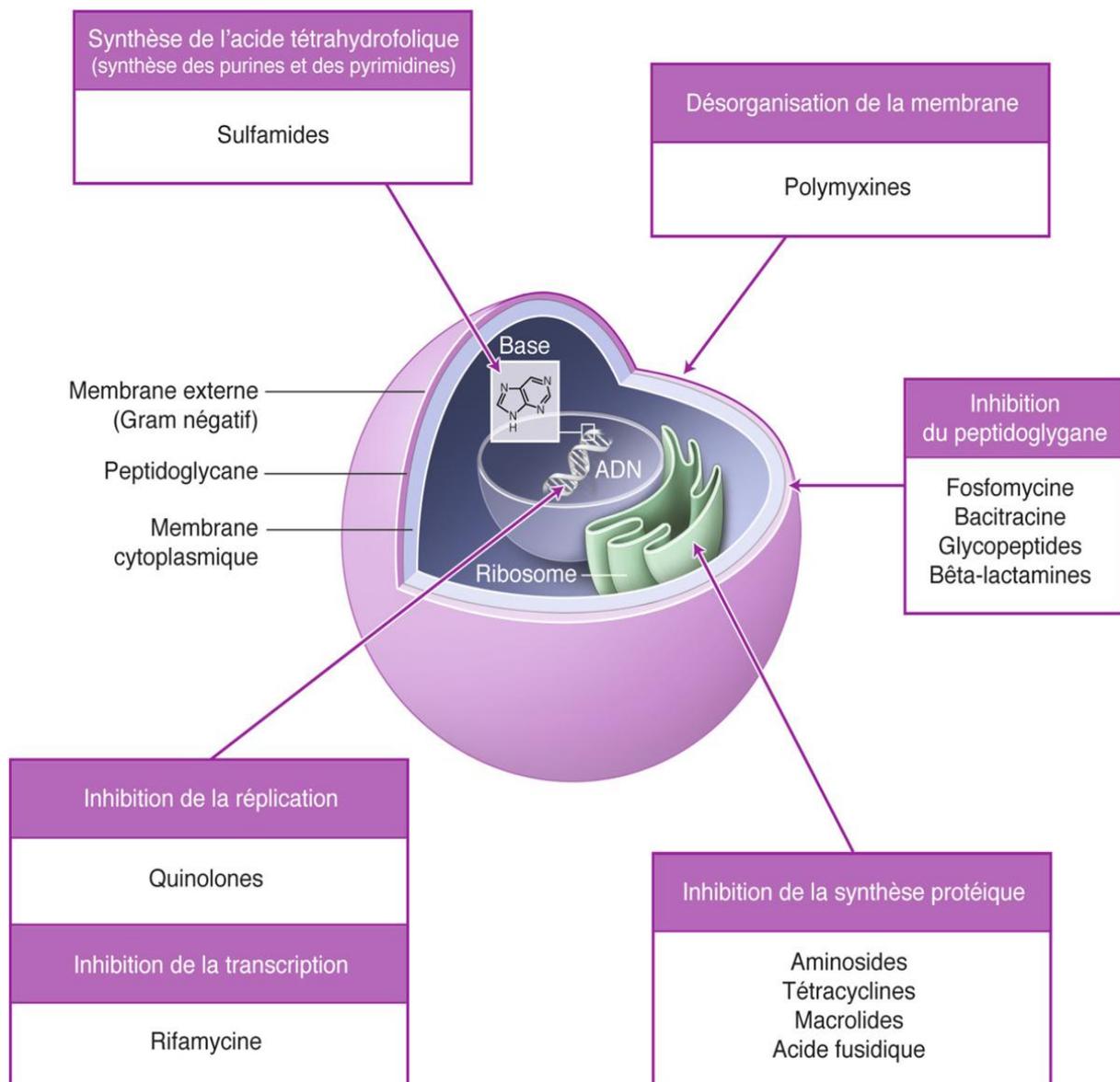


Figure I.2. Mécanismes d'action des antibiotiques (Debellemanière et Saleh, 2015).

IV. La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est la capacité pour une souche bactérienne de se multiplier dans une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe la majorité des souches appartenant à la même espèce. Elle est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multirésistantes. Il existe deux types de résistance : la résistance naturelle et la résistance acquise.

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné. La résistance est donc liée aux propriétés naturelles des bactéries, elle fait partie du patrimoine génétique normal du germe. D'ailleurs, cette résistance définit le spectre d'activité des antibiotiques. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* n'est jamais sensible à l'ampicilline. Les bactéries peuvent également acquérir des résistances via des mutations génétiques ou par l'insertion d'éléments génétiques mobiles (par exemple des intégrons portés par des plasmides), on parle alors de résistance acquise (Vittecoq et *al.*, 2016 ; Obolski et *al.*, 2016).

Les mécanismes de résistance peuvent concerner une ou plusieurs de ces conditions (Nauciel et Vilde, 2005) :

- Absence de pénétration de l'antibiotique par diminution ou suppression de la perméabilité membranaire ou pariétale, interférence avec le transport de l'antibiotique.
- Altération de la cible moléculaire par modification du site de fixation ou dégradation enzymatique de la cible.
- Une sortie excessive de l'antibiotique hors de la bactérie ou efflux, ce qui entraîne une concentration insuffisante pour exercer une action sur la cible.
- Modifications et inactivations enzymatiques de l'antibiotique par des enzymes bactériennes.

V. Liste des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques

Fin février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié la liste « *des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques* ». Celle-ci énumère les douze familles de bactéries les plus **résistantes** et *les plus menaçantes pour la santé humaine* (OMS, 2017). Cette liste a été établie pour essayer d'orienter et de promouvoir la recherche-développement de nouveaux antibiotiques, dans le cadre des efforts de l'OMS pour lutter contre la résistance croissante aux antimicrobiens dans le monde. La liste de l'OMS comprend trois catégories, classées en fonction du degré de priorité: critique, élevée et moyenne.

Le groupe le plus critique comporte des bactéries multirésistantes (c'est-à-dire qu'elles ont développé des résistances vis-à-vis de plusieurs familles d'antibiotiques). Cette catégorie représente une réelle **menace**, notamment en milieu **hospitalier**, puisqu'à l'origine

d'infections souvent mortelles. Les organismes impliqués sont l'*Acinetobacter baumannii*, le *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactéries (dont *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, et *Proteus*).

Six familles de bactéries sont placées en « *priorité élevée* » : l'*Enterococcus faecium*, le *Staphylococcus aureus*, l'*Helicobacter pylori* (souvent impliquée dans les ulcères de l'estomac), le *Campylobacter spp.*, les salmonelles (responsables d'intoxications alimentaires) et *Neisseria gonorrhoeae* (à l'origine de la gonorrhée, une infection sexuellement transmissible).

Enfin, l'OMS regroupe en « *priorité moyenne* » trois familles. Il s'agit de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* (qui cause des otites) et *Shigella spp.* (responsable d'infections intestinales).

VI. La découverte des nouveaux agents antimicrobiens

Au cours des dernières décennies, l'émergence d'agents pathogènes résistants aux antibiotiques s'est accélérée, entraînant des infections potentiellement mortelles qui ne répondent pas au traitement antibiotique disponible. Inévitablement, plus les antibiotiques sont utilisés, plus les bactéries développent de résistance, ce qui rend les médicaments moins efficaces et amène les autorités de santé publique du monde à signaler la résistance aux antibiotiques comme une menace urgente et croissante pour la santé publique (Coukell et *al.*, 2016).

La résistance aux antimicrobiens (RAM) est actuellement responsable de plus de 700 000 décès par an dans le monde. La mortalité due à la RAM devrait augmenter de façon exponentielle pour dépasser 10 millions de décès par an d'ici 2050 (figure I.3). Le coût économique mondial d'une telle augmentation de la mortalité et de la morbidité est estimé à 100 000 milliards de dollars (Renwick et *al.*, 2016).

Depuis 2000, seules cinq nouvelles classes d'antibiotiques ont été commercialisées, mais aucune d'entre elles ne cible les bactéries gram-négatives mortelles et très résistantes. Le nombre total de brevets antibiotiques déposés a diminué de 34,8% entre 2007 et 2012 (Renwick et *al.*, 2016 ; Coukell et *al.*, 2016).

La meilleure démarche pour lutter contre cette résistance est la découverte et le développement de nouvelles classes chimiques d'agents antibactériens. De ce fait, plusieurs scientifiques à la recherche des agents antimicrobiens commencent à porter une attention particulière à la méthionine aminopeptidase bactérienne (Lu et *al.*, 2011; Altmeyer et *al.*, 2014; Helgren et *al.*, 2017), cible enzymatique utilisée dans notre travail de recherche.

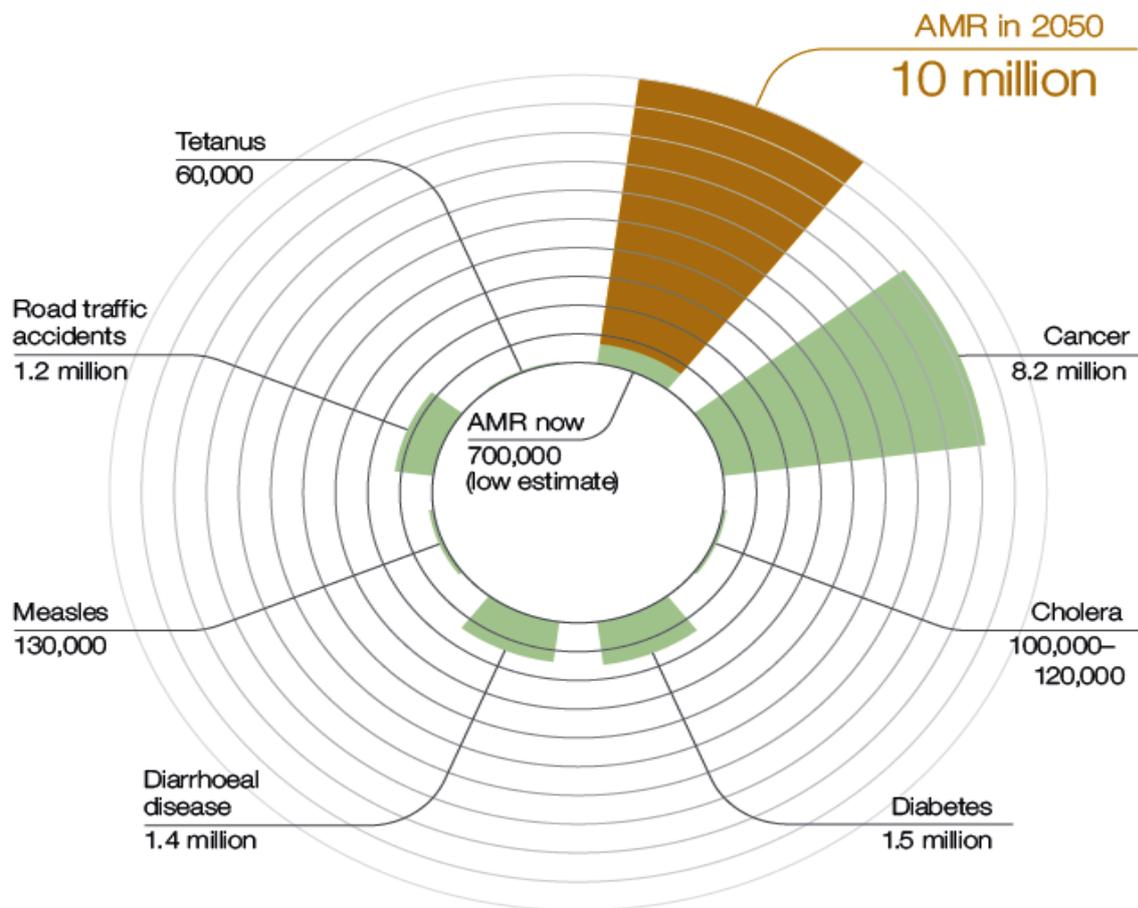


Figure I.3. Les décès attribuables à la RAM chaque année par rapport aux autres principales causes de décès (Renwick et *al.*, 2016).

CHAPITRE II. LA METHIONINE AMINOPEPTIDASE

Le mécanisme universel de synthèse des protéines impose que toutes les protéines débutent par une méthionine. Pourtant cette première méthionine sera le plus souvent clivée alors que la protéine est encore en cours de synthèse. Le mécanisme responsable de cette modification co-translationnelle est celui de la NME (Excision de la Méthionine N-terminale). Elle a lieu dans tous les compartiments cellulaires où il y a une synthèse protéique. Deux classes de protéases composent la NME : la méthionine aminopeptidase (MetAP) et la peptide déformylase (PDF) (figure II.1). Aujourd'hui un nombre croissant d'études rapportent que les enzymes de la NME sont la cible de composés ayant des effets antibiotiques, antiparasitaires, antifongiques et anticancéreux (Olaleye et al., 2009; Kanudia et al., 2011). Malgré les efforts réalisés pour caractériser les voies de signalisation qui lui sont associées, peu d'inhibiteurs efficaces de la NME ont été découverts principalement à cause de notre connaissance limitée de sa fonction physiologique.

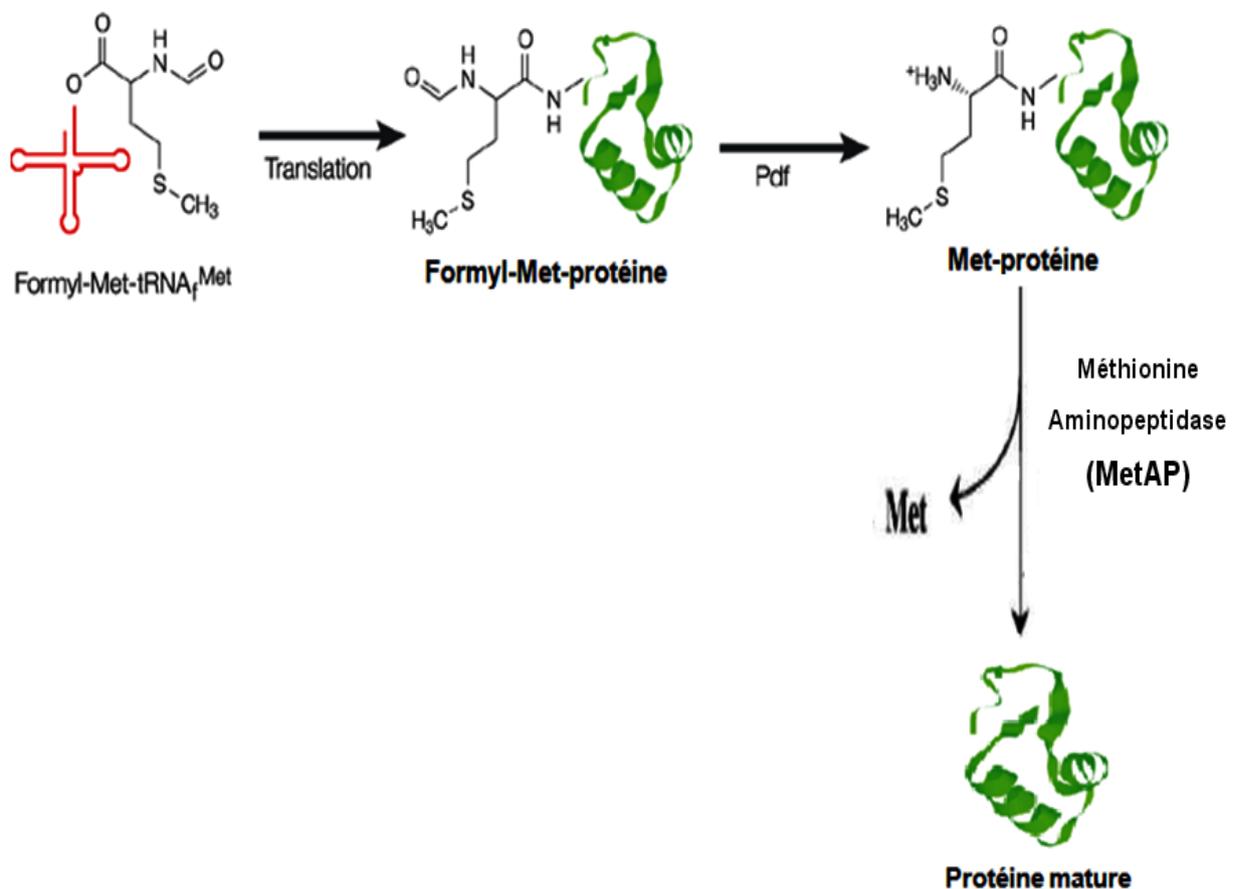


Figure II.1. Synthèse protéique chez les bactéries (Lynn et al., 2003).

I. L'excision de la méthionine N-terminale

I.1. Définition

L'excision de la méthionine N-terminale (NME) est un processus ubiquitaire, elle est retrouvée dans tous les organismes vivants. Elle est présente dans tous les compartiments cellulaires où il y a une néo-synthèse de protéines : le cytoplasme, les mitochondries ainsi que les plastes. La NME est un processus de maturation irréversible co-traductionnelle, qui a lieu avant que la chaîne polypeptidique soit complètement synthétisée. Elle débute très tôt durant la traduction, dès que les premiers résidus émergent du tunnel de sortie du ribosome, avant l'initiation du repliement de la protéine (Frottin, 2011).

I.2. L'excision de la méthionine N-terminale une cible thérapeutique attractive

La connaissance des voies physiologiques et leurs régulations est un prérequis pour combattre efficacement les pathologies impliquant ces voies. La NME est une de ces voies physiologiques jouant un rôle important dans beaucoup de pathologies. Par conséquent, la NME est la cible de nombreux inhibiteurs naturels et synthétiques. Ces inhibiteurs ont un potentiel considérable pour l'utilisation dans le traitement de diverses maladies humaines, comme le cancer ainsi qu'un grand nombre d'infections bactériennes et parasitaires (Giglione et al., 2004 ; Frottin, 2011).

Les PDFs constituent également une cible attractive pour la conception de nouveaux antibactériens car ces enzymes ne sont pas retrouvées dans le cytoplasme eucaryotique et sont essentielles à la survie des bactéries. Les MetAPs sont des enzymes ubiquitaires et leur activité est essentielle à la survie cellulaire. La délétion génique ou l'inhibition de leur activité par des molécules inhibitrices est létale chez tous les organismes vivants. Les bactéries ont un seul gène codant une MetAP, par conséquent c'est une cible prometteuse pour développer des antibiotiques ayant un mécanisme d'action nouveau ainsi qu'un spectre antibactérien large.

Parmi les deux protéases composant la NME, nous nous intéresserons plus particulièrement à la méthionine aminopeptidase ; en considérant cette dernière comme cible prometteuse pour développer de nouveaux antibiotiques.

II. La méthionine aminopeptidase

II.1. Définition

La méthionine aminopeptidase (MetAP) est une métalloprotéase qui assure l'hydrolyse de résidu méthionine en position N-terminale au cours de la synthèse protéique, il s'agit de l'une des étapes critiques dans la maturation des protéines (Olaleye *et al.*, 2010). La MetAP se trouve dans les cellules procaryotes et eucaryotes. Elle joue un rôle beaucoup plus important que d'autres exopeptidases non spécifiques et est responsable de la plus grande partie de l'élimination de la méthionine N-terminale. Les eucaryotes inférieurs et supérieurs ainsi que les bactéries semblent partager un même mécanisme pour le traitement des protéines, indiquant l'universalité de ce système (Giglione *et al.*, 2000 ; Nonato *et al.*, 2006).

La MetAP (EC 3.4.11.18) catalyse le clivage irréversible de la méthionine N-terminale à partir de polypeptides naissants (figure II.2).

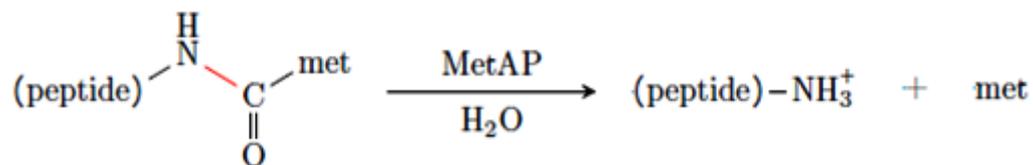


Figure II.2. Réaction catalysée par la méthionine aminopeptidase.

II.2. Classification des MetAP

La MetAP est conservée dans toutes les formes de vie de la bactérie à l'homme (Kanudia *et al.*, 2011). A ce jour, deux types de MetAPs ont été définis à partir de données structurales et d'alignements de séquences, les MetAP de type I et celles de type II (figure II.3), qui se distinguent facilement grâce à la présence d'une insertion de polypeptide à l'extrémité C-terminal dans le domaine catalytique de la MetAP2 (Arfin *et al.*, 1995). Contrairement aux formes procaryotiques, les MetAPs eucaryotiques possèdent un domaine N-terminal supplémentaire. Les eubactéries présentent seulement le type-I et les archaebactéries uniquement le type-II alors que les eucaryotes possèdent les deux types (Giglione *et al.*, 2000; Boufous et Vadeboncoeur, 2003 ; Nonato *et al.*, 2006).

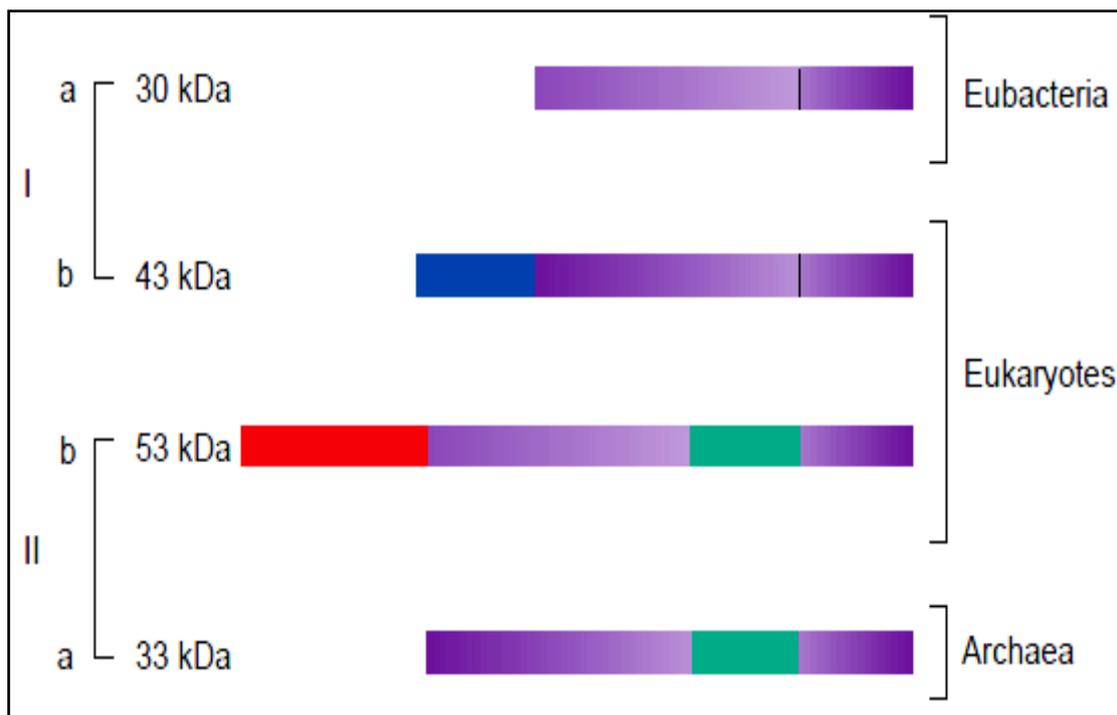


Figure II.3. Classification des MetAP (Bradshaw et *al.*, 1998).

II.3. Rôle physiologique de la MetAP

L'action de la MetAP pour l'excision de la méthionine N-terminale est obligée dans environ 50 à 70% des protéines naissantes (Boufous et Vadeboncoeur, 2003). Ceci est essentiel pour la poursuite de traitement tel que l'acétylation ou la myristoylation. Donc les MetAPs jouent un rôle clé dans la régulation fonctionnelle des protéines (Schiffmann, 2006).

L'importance physiologique de l'activité de MetAP est soulignée par la létalité des organismes lorsque tous les gènes de MetAP ont été supprimés ou tous les produits du gène MetAP sont inhibés. Cela a été montré pour *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Saccharomyces cerevisiae* (Schiffmann, 2006). Dans la levure, la suppression d'un des deux MetAP1 ou MetAP2 provoque un phénotype à croissance lente, tandis que la perturbation des deux gènes est létale (Olaleyed et *al.*, 2009). La MetAPII de *Caenorhabditis elegans*, est essentiel pour le développement des cellules germinales (Boxem et *al.*, 2004 ; Olaley et *al.*, 2010). Dans les cellules de mammifères, les deux HsMetAPs (1 et 2) sont nécessaires pour la prolifération cellulaire (Bernier et *al.*, 2005 ; Olaley et *al.*, 2010). Le rôle essentiel des MetAPs chez les procaryotes rend cette enzyme une cible attractive pour le développement de nouveaux antibiotiques (Olaleyed et *al.*, 2009).

II.4. Mécanisme de catalyse

Le mécanisme par lequel MetAP semble affecter l'hydrolyse de la liaison peptidique entre la méthionine N-terminale et l'avant-dernier résidu est résumé dans la figure II.4. La liaison du substrat, qui comprend des interactions directes avec les deux métaux, conduit à une expansion de la sphère de coordination de Co1 de cinq à six. Cette alternance dans le caractère électronique du centre binucléaire peut activer le μ -hydroxyde pour l'attaque nucléophile et faciliter le transfert de protons vers Glu204. L'intermédiaire tétraédrique résultant est stabilisé par chélation avec Co1 et par des interactions de liaison hydrogène avec His178 et His79. Le transfert de protons de Glu204 à l'atome d'azote de la liaison scissile peut faciliter la rupture de l'intermédiaire en produits. La régénération du site actif pour un autre cycle de la catalyse se produit avec la libération de la méthionine et de la déprotonation des molécules de solvant (Lowther et *al.*, 1999).

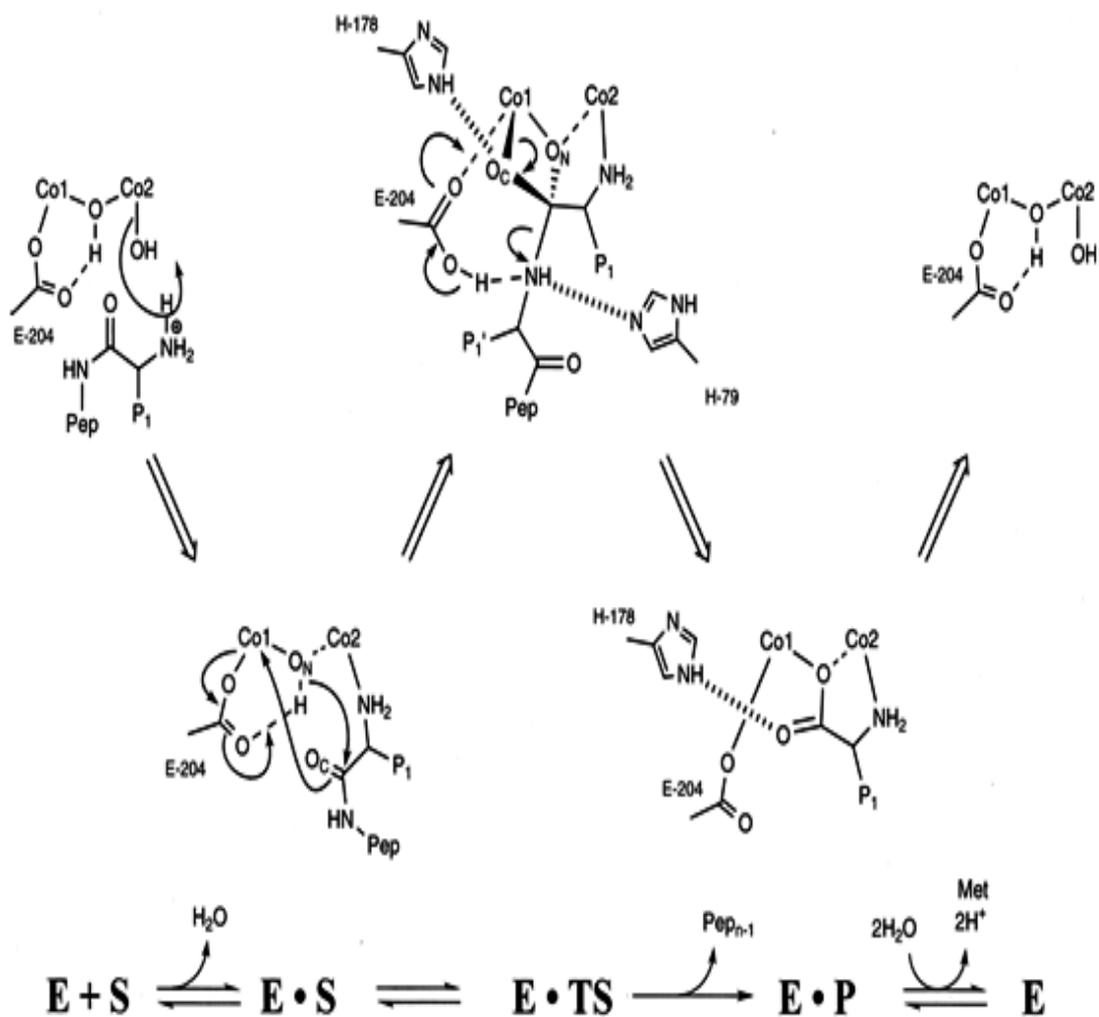


Figure II.4. Mécanisme réactionnel proposé (Lowther et *al.*, 1999).

II.5. Propriétés de la MetAP

II.5.1. La dépendance au métal

Les MetAPs peuvent être activées *in vitro* par différents cations métalliques divalents tels que Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} (Leopoldini et al., 2007). Initialement, la MetAP a été considérée comme une enzyme di-nucléaire utilisant le cobalt, parce que le cobalt est parmi les meilleurs activateurs, et toutes les premières structures déterminées par rayons X de la MetAP contiennent deux Co(II) dans le site actif (Lu et al., 2010).

II.5.2. La spécificité de substrats des MetAPs

L'activité de la méthionine aminopeptidase est strictement spécifique, elle dépend du rayon de giration de résidu adjacent (figure II.5). La méthionine est généralement retirée de protéines, où l'acide aminé adjacent est faible et non chargé (glycine, l'alanine, la sérine, la thréonine, la cystéine, la proline et la valine). Cela a été montré *in vitro* en utilisant des substrats différents, mais aussi *in vivo* (Hirel et al., 1989; Chiu et al., 1999). Dans la plupart des cas, un résidu adjacent à une taille de la chaîne latérale (rayon de giration) plus petit que 0,129 nm est préféré. Pour la taille des chaînes latérales qui sont supérieures à 0,143 nm, la MetAP est incapable de retirer la méthionine (Zuo et al., 1995; Lu et al., 2010).

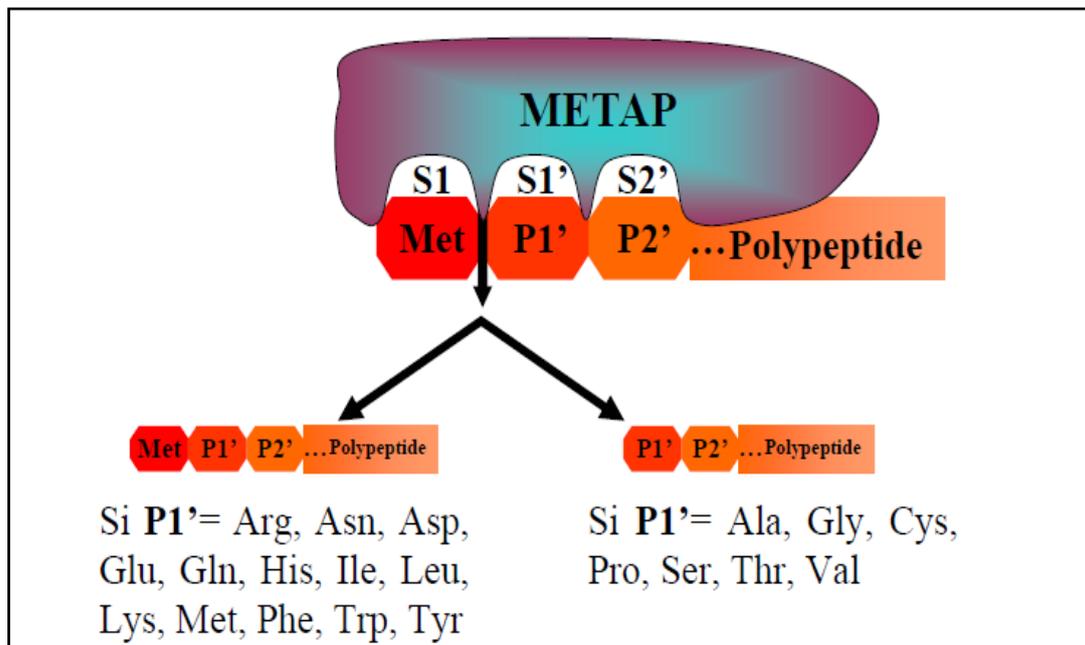


Figure II.5. La spécificité de substrats des MetAPs (Zuo et al., 1995).

III. Structure générale de la MetAP

III.1. Structure tridimensionnelle

La première méthionine aminopeptidase purifiée a été isolée à partir de l'*E.coli*. La structure et les séquences de différents MetAPs sont ensuite étudiées. Toutes les MetAPs étudiées étaient des enzymes monomères composées de 260 à 500 acides aminés (Wai Yun Ng, 2006).

La MetAP de l'*E.coli* (*EcMetAP*) est une protéine globulaire soluble. Structurellement, les deux moitiés de la chaîne polypeptidique sont disposées autour d'une paire d'ions cobalt (représentées en magenta). Une feuille β (représentée en verte) antiparallèle centrale est recouverte d'un côté par deux paires d'hélices α (représentée en rouge) et par une boucle C-terminale et de l'autre côté forme le site actif avec quelques boucles irrégulières et deux ions métalliques. Une vue générale de la structure tridimensionnelle de l'*EcMetAP* est présentée dans la figure II.6.



Figure II.6. Structure tertiaire de l'*EcMetAP*. Le logiciel Marvin est utilisé pour visualiser la structure tridimensionnelle de la protéine. Les régions de l'hélice α sont montrées en rouge, les feuilletts- β en vert, l'ion métallique en mauve et le reste en gris.

III.2. Le site actif de la MetAP

Le site actif est une poche peu profonde et principalement hydrophobe pour accueillir le résidu méthionine terminal avec deux ions métalliques situés au fond, comme indiqué dans plusieurs structures de rayons X (Lu *et al.*, 2011). Le site actif de la EcMetAP est situé à environ dans le centre du domaine catalytique. Les ions métalliques sont liés à la molécule par l'intermédiaire des chaînes latérales des cinq résidus Asp97, Asp108, Glu204, Glu235 et His171. Tous les acides aminés qui sont en contact avec les ions métalliques sont strictement conservés dans toutes les MetAPs connues jusqu'ici. Les autres acides aminés invariants dans le site actif sont His79 et His178, situés sur les côtés opposés de la cavité et légèrement au-dessus du centre métallique comme on peut le voir sur la figure II.7. La mutation de ces deux histidines entraîne une perte d'activité spectaculaire (Schiffmann, 2006).

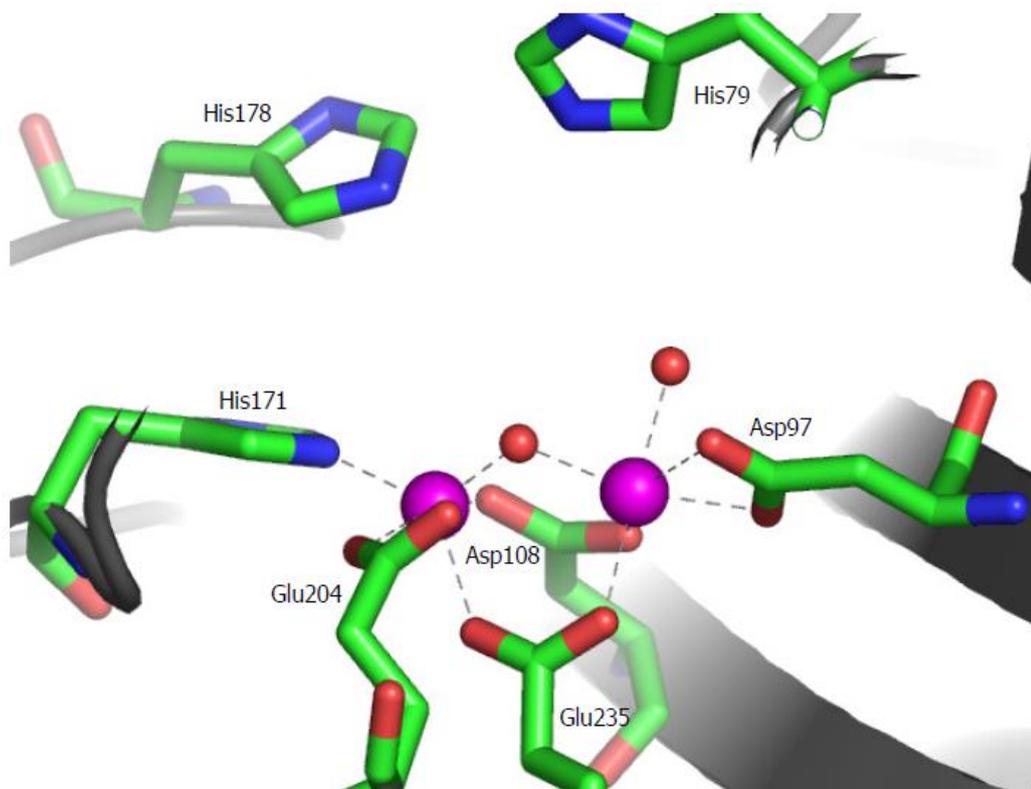


Figure II.7. Le site actif de l'EcMetAP (Schiffmann, 2006).

En plus des ions cobalt, on peut voir un ion sodium dans 90% des structures cristallines publiées. Ce Na^+ est positionné à proximité de Val76 et à environ 15 Å du site de liaison du métal et peut servir de médiateur à une interaction entre les sous-domaines de la protéine repliée, stabilisant ainsi le centre métallique et / ou positionnant la boucle accessible au solvant qui contient His79 (Lowther *et al.*, 1999).

Considérant que les résidus du site actif sont strictement conservés, les variations se produisent parmi les résidus présumés de fixation du substrat. Les deux types I et II de la MetAP emploient différents ensembles de résidus d'acide aminé (tableau II.1). Ceci explique les différences dans le site d'attachement du substrat et l'activité enzymatique de différents types de MetAP.

Tableau II.1 : Comparaison entre les sites de fixation de métal et de substrat pour la MetAP type I et type II (Lowther et Matthews, 2000).

MetAP	S1-subsite (reconnaît Met)	Site de liaison du métal	S1'-subsite
Type-I EcMetAP	Cys59, Tyr62, Tyr65, Cys70, His79, Phe177, Trp221	Asp97, Asp108, His171, Glu204, Glu235	Tyr168, Cys169, Gly170, His185, Glu204, Pro205, Met206, Gln233
Type-II MetAP	Pro220, Gly222, Ile338, His382, Met384, Tyr444	Asp, Asp, His, Glu, Glu	Leu328, Glu364, Phe366, Leu447 Gln457

IV. Les inhibiteurs de la méthionine aminopeptidase

La méthionine aminopeptidase a fait l'objet d'études approfondies pendant des années en raison de son caractère essentiel pour la survie des micro-organismes et de son rôle dans l'angiogenèse dans la croissance tumorale. De nombreux efforts ont été consacrés à la recherche d'inhibiteurs de la MetAP en tant que candidats médicaments pour le traitement antimicrobien ou anticancéreux.

A ce jour, de nombreux composés synthétiques ont été proposés pour agir en tant qu'inhibiteurs de MetAP et démontrer une valeur thérapeutique possible.

IV.1. Les inhibiteurs covalents

La fumagilline et ses dérivés ont font partie des inhibiteurs les plus efficaces de l'angiogenèse (figure II.8). La fumagilline est un composé naturel qui a été isolé à partir du

champignon *Aspergillus fumigatus* (Didier, 2005). Elle inhibe l'activité enzymatique des MetAP2s (inhibition irréversible), spécifiquement en alkylant un résidu histidine du site actif impliqué dans la liaison avec le métal (His231 pour la MetAP2 humaine) (Brdlik et Crews, 2004 ; Klein et Folkers, 2003 ; Liu et *al.*, 1998). Parmi les dérivés synthétiques, le TNP-470 a une activité antiangiogénique plus forte et moins d'effets secondaires que la fumagilline. De plus, ce composé représente l'une des premières molécules antiangiogéniques à avoir effectué un essai clinique (Kruger et Figg, 2000). La fumagilline et le TNP-470 ont un effet antiprolifératif directement sur différentes lignées de cellules tumorales (Wang et *al.*, 2003 ; Tucker et *al.*, 2008). Ces composés sont également efficaces contre les parasites et pourraient être utiles pour le traitement de la malaria ou la leishmaniose (Zhang et *al.*, 2002).

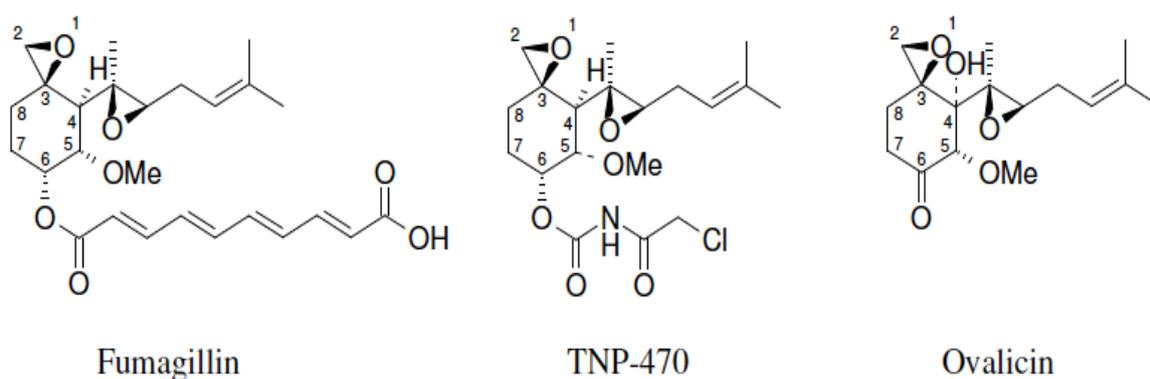


Figure II.8. Inhibiteurs de MetAP2s, la fumagilline et ses dérivés (Schiffmann, 2006).

IV.2. Les inhibiteurs compétitifs

La méthionine aminopeptidase représente une cible prometteuse pour le développement de nouveaux antibactériens, antifongiques et anticancéreux. Néanmoins, l'intérêt des inhibiteurs des MetAPs est principalement focalisé sur la fumagilline et les inhibiteurs covalents de la MetAP-II en raison de son rôle dans l'angiogenèse. Il existe peu d'inhibiteurs rapportés pour la MetAP-I (figure II.9). Ces MetAPs sont également moins étudiées alors que leur activité est essentielle à la survie des bactéries (Schiffmann, 2006).

Parmi ces inhibiteurs on peut citer par exemple :

Les bengamides, une classe de produits naturels marins qui produisent des effets inhibiteurs sur la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. L'analyse détaillée a montré que les bengamides et ces analogues synthétiques inhibent directement ou indirectement les deux

MetAPs (Towbin et al., 2003). Une autre classe contient une triazole ou un groupe pyrazole représente une classe originale des inhibiteurs non-peptidiques efficaces contre les MetAPs (Oefner et al., 2003).

Des dérivés d'acides pyridines carboxyliques ont été synthétisés selon les liaisons du criblage et décrits comme inhibant la MetAP1 de l'*E. Coli* et de *S. cerevisiae* efficacement (Luo et al., 2003). De plus, les dérivés catéchols couplés avec un thiazole ou un thiophène montrent une forte efficacité et sont sélectifs pour la MetAP1 de l'*E. coli* ayant un centre dinucléaire ferreux. Une activité antibactérienne a également été observée (Wang et al., 2008 ; Wang et al., 2009). Une autre classe d'inhibiteurs des MetAP1s a été découverte. Il s'agit des dérivés catéchols inhibent *in vitro* la MetAP1C de *M. tuberculosis* (Lu et Ye, 2010).

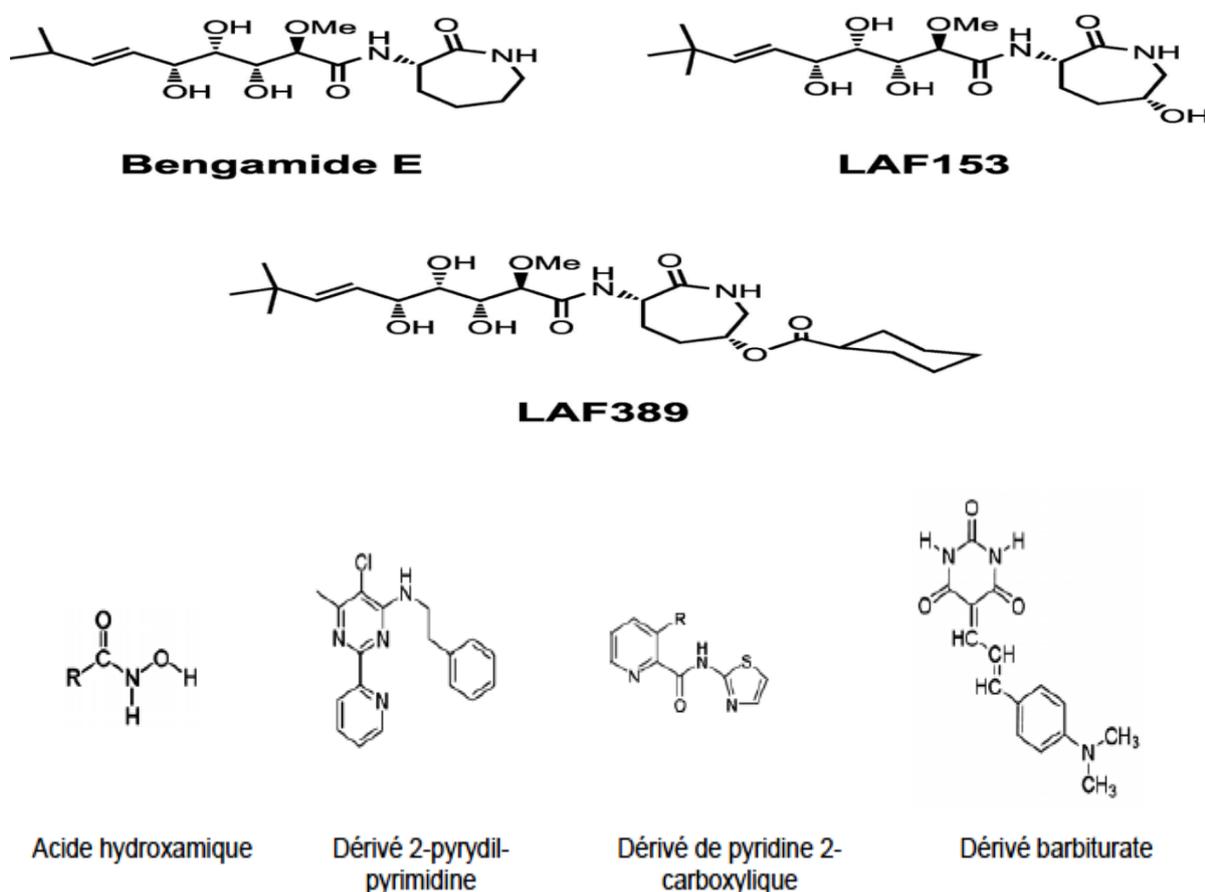


Figure II. 9. Inhibiteurs des MetAPs.

Une fois la cible enzymatique est identifiée et validée, l'étape suivante est l'application de criblage virtuel sur ordinateur. Il permet d'identifier de nouveaux composés inhibiteurs de notre cible thérapeutique.

CHAPITRE III. LE CRIBLAGE VIRTUEL

VII. La recherche de nouveaux médicaments

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 préclinique (tableau III.1). On trouve dans la littérature des estimations assez divergentes concernant son coût global, évalué entre 300 millions et plus de 1,7 milliard de dollars et peut prendre une quinzaine d'années (Adams et Brantner, 2006).

L'identification et la mise au point d'une molécule possédant l'activité biologique recherchée se fait lors du développement préclinique. Elles nécessitent, entre autres, l'investigation de ses propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, et se basent de plus en plus sur des approches informatisées (*in silico*), dont les résultats se retrouvent *in vitro* et *in vivo*, dans des cellules voire des organismes modèles (Grosdidier, 2007). Ainsi, l'approche *in silico* permet un gain en temps et en argent quand elle est utilisée en amont du processus de recherche et développement de nouveaux médicaments.

Tableau III.1. Le processus de découverte de nouveaux médicaments (Grosdidier, 2007)

	Développement préclinique	Essais cliniques			pharmacovigilance
		Phase I	Phase II	Phase III	Phase IV
Durée (an)	3.5	1	2	3	Surveillance après la mise sur le marché
Population test	Laboratoire et études animales	20 à 80 volontaires sains	100 à 300 patients volontaires	1000 à 3000 patients volontaires	
Objectif	Sécurité et activité biologique	Sécurité et dosage	Efficacité, effets indésirables	Efficacité, effets indésirables à long terme	
Succès	5,000 molécules évaluées	5 entrent en clinique			

VIII. La place de l'ordinateur dans le processus de découverte de médicaments

Les méthodes informatiques sont des disciplines devenues indispensables à la découverte de médicaments car elles permettent souvent une réduction des coûts et de temps, en complément des approches expérimentales. De nos jours, les industries pharmaceutiques consacrent près de 10% de leur budget de recherche et développement, à la recherche de médicaments assisté par ordinateur (Kapetanovic, 2008). Une telle approche est considérée comme cruciale dès les premières étapes du processus, car celles-ci conditionnent directement les étapes ultérieures dont le coût est de plus en plus important.

En effet, la conception de médicaments assistée par ordinateur a considérablement élargi son éventail applications, couvrant presque toutes les étapes du processus de découverte de médicaments, de l'identification de la cible à la découverte des têtes de série "lead", de l'optimisation du "lead" par rapport aux propriétés pharmacologiques recherchées aux essais précliniques et permettent l'élimination de molécules susceptibles d'être rejetées en phase clinique à cause de leur toxicité ou de leur non spécificité (Kore et *al.*, 2012). Toutes ces étapes d'intervention de l'outil informatique sont présentées dans le schéma récapitulatif suivant (figure III.1).

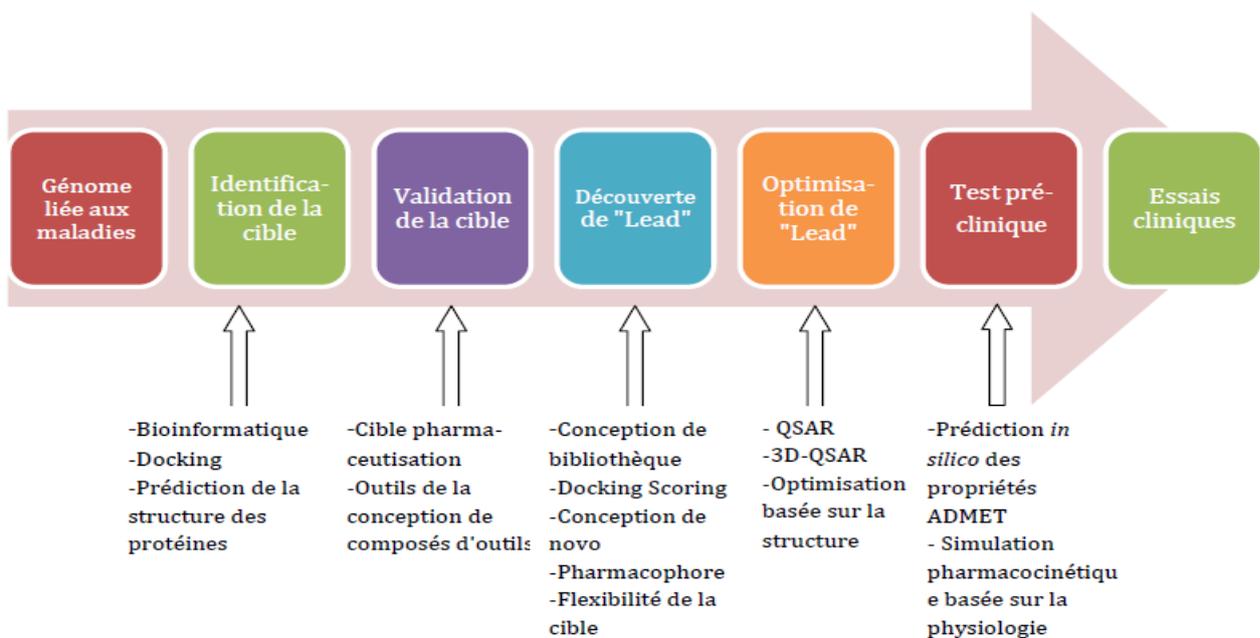


Figure III.1. Applications de l'approche *in silico* aux différentes étapes du développement d'un médicament (Kore et *al.*, 2012).

IX. Importance des chimiothèques dans la recherche de nouveaux candidats médicaments

Le criblage virtuel est une technique puissante pour identifier des molécules dite "hits" en tant que points de départ pour la chimie médicinale. Pour garantir la réussite d'un criblage virtuel, une attention très précise doit être apportée à la chimiothèque utilisée, sa taille, composition, diversité, les caractéristiques des molécules qu'elle regroupe et de nombreux autres facteurs.

Le fait que le nombre de bases de données de petites molécules commerciales et publiques, ont considérablement augmenté ces dernières années témoigne de la pertinence élevé de ces types de collections de données pour la découverte et le développement de médicaments. Ces bases de données peuvent être uniquement des collections de structures, telles que des échantillons de criblage disponibles dans le commerce, ou fournir des données supplémentaires telles que la bioactivité mesurée des composés et de leurs cibles protéiques, ainsi que des maladies ciblées. Un bon nombre de ces bases de données (par exemple, ChEMBL) tentent de relier des données de petites molécules avec des informations sur leurs cibles biologiques ainsi que les données de test disponibles (Liao et *al.*, 2011).

Ces chimiothèques contiennent des molécules directement achetables auprès de différents fournisseurs. La quantité, la qualité, la disponibilité et le prix de chaque produit sont disponibles, permettant une commande groupée des différents produits souhaités. A cela s'ajoutent généralement des fichiers informatiques regroupant les structures des différents composés et facilitant leur utilisation par les bioinformaticiens. Il existe plusieurs formats électroniques pour représenter les petites molécules. Les plus utilisés pour les chimiothèques sont SMILES, SDF, MOL2 ou PDB (Sotriffer et *al.*, 2011).

Le tableau III.2 suivant présente une sélection de certaines chimiothèques les plus connues pour la découverte de médicaments. Il se concentre sur les bases de données accessibles au public, mais fait également référence à certaines bases de données commerciales.

Tableau III.2. Bases de données de petites molécules les plus connues d'après Lavecchia et Di Giovanni, 2013.

Chimiothèque	Type de licence	Données Biologiques	Site Web
ZINC	Public	Oui	http://zinc.docking.org
ChemDB	Public	Non	http://cdb.ics.uci.edu
eMolecules	Commercial	Non	http://www.emolecules.com
ChemSpider	Public	Oui	http://www.chemspider.com
Pubchem	Public	Oui	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
ChemBank	Public	Oui	http://chembank.broadinstitute.org
DrugBank	Public	Oui	http://www.drugbank.ca
NCI Open Database	Public	Non	http://cactus.nci.nih.gov/ncidb2.2/
Chimiothèque Nationale	Commercial	Non	http://chimiotheque-nationale.enscm.fr/?lang=fr
Drug Discovery Center Collection	Commercial	Non	http://www.drugdiscovery.uc.edu/
ChEMBL	Public	Oui	http://www.ebi.ac.uk/chembl/db/index.php
WOMBAT	Commercial	Oui	http://www.sunsetmolecular.com
ChemBridge	Commercial	Non	http://www.chembridge.com
Specs	Commercial		http://www.specs.net
CoCoCo	Public	Non	http://cococo.unimore.it/tiki-index.php
Enamine	Commercial	Non	http://www.enamine.net
Maybridge	Commercial	Non	http://www.maybridge.com
ChemDiv	Commercial	Non	http://www.chemdiv.com
ACD	Commercial	Non	http://accelrys.com/products/databases/sourcing/available-chemicalsdirectory.html
MDDR	Commercial	Oui	http://accelrys.com/products/databases/bioactivity/mddr.html

X. Le criblage virtuel *in silico*

Le terme criblage virtuel (CV) ou "*virtual screening*" regroupe un ensemble de techniques computationnelles ayant pour objectif l'analyse de grandes bases de données de composés chimiques afin d'identifier des candidats médicaments, ce qui est considéré comme une étape complémentaire des approches expérimentales (Walters et *al.*, 1998 ; Hou et Xu, 2004). Aujourd'hui, le criblage virtuel est largement utilisé pour identifier de nouvelles substances bioactives et pour prédire la liaison d'une grande base de données de ligands à une cible particulière, dans le but d'identifier les composés les plus prometteurs. De plus, la mise à disposition des techniques de criblage et l'usage des chimiothèques ont permis d'accélérer les recherches et de proposer des candidats médicaments pour différentes pathologies (Shoichet, 2004; Kar et Roy, 2013).

Généralement, le criblage virtuel comporte trois phases :

- La phase de préparation de la chimiothèque ;
- La phase de criblage *in silico* proprement dit qui varie en fonction de la taille de la chimiothèque et de la connaissance de la structure 3D d'une protéine cible ;
- La phase d'analyse des résultats conduisant à la définition de touches pour les tests expérimentaux.

IV.1. L'intérêt du criblage virtuel

L'utilisation des approches expérimentales et de criblage virtuel augmente les chances de succès à de nombreuses étapes du processus de découverte de nouveaux médicaments. Le CV a émergé comme une technique fiable, rentable et rapide pour la découverte de molécules bioactives ces dernières années. Les principaux avantages de cette méthode sont indiqués ci-dessous (Kar et Roy, 2013 ; Lionta et *al.*, 2014).

- **Rentable**

Comme aucun composé ne doit être acheté à l'extérieur ou synthétisé par un chimiste, le dépistage virtuel est l'une des méthodes les plus rentables au stade préliminaire des processus de découverte de médicaments.

- **Temps effectif**

Le temps requis pour la synthèse peut être extrêmement lourd, en particulier dans le cas d'une base de données volumineuse contenant des millions de composés chimiques. Mais à l'aide des outils de calculs informatiques, l'approche de criblage virtuel est toujours un outil efficace pour accélérer la recherche et la découverte de molécules bioactives

- **Travail efficace**

Il n'y a pas de limite en termes de nombre de molécules pouvant être criblées. On peut en cribler informatiquement 10 millions en deux jours. Contrairement au criblage expérimental robotisé, qui suppose d'archiver et de stocker les molécules, de les conditionner sous forme de microplaques. C'est plus rapide et le taux de réussite est 100 fois supérieur.

- **Alternative raisonnable**

Il est possible d'étudier des composés qui n'ont pas encore été synthétisés. Les expériences de criblage à haut débit (HTS) sont coûteuses, prennent du temps et sont laborieuses pour un grand nombre de produits chimiques. Par conséquent, le criblage virtuel est toujours une option judicieuse pour réduire le nombre initial de composés avant d'utiliser les méthodes HTS.

La réduction significative du temps et des coûts par rapport au processus de criblage à haut débit, les efforts continus pour améliorer l'efficacité des programmes de docking ainsi que les fonctions de score, et les nombreuses études de cas réussies qui ont conduit à l'obtention des têtes de série ne sont que quelques exemples représentatifs montrant que le criblage virtuel est là pour rester.

IV.2. Les stratégies du criblage virtuel

Les méthodes de criblage sont séparées en deux grandes familles (figure III.2). La première se base sur la structure 3D de la protéine ciblée et connue sous le nom de « *structure-based virtual screening* » (SBVS). Les méthodes « structure-based » permettent d'évaluer la capacité des ligands à établir des interactions avec le site de liaison étudié pour sélectionner les molécules capables de se lier à la cible (Ghosh et *al.*, 2006; Clark, 2008). La seconde, reposant sur la connaissance d'un nombre d'informations concernant une ou

plusieurs molécules actives (ligands) de référence, est appelée « *ligand-based virtual screening* » (LBVS) (Tuccinardi, 2009).

Lorsque ces deux types de données sont disponibles simultanément, la combinaison de ces deux approches lors d'un criblage virtuel permet de maximiser les chances de succès pour identifier de nouvelles touches (Muegge et Oloff, 2006).

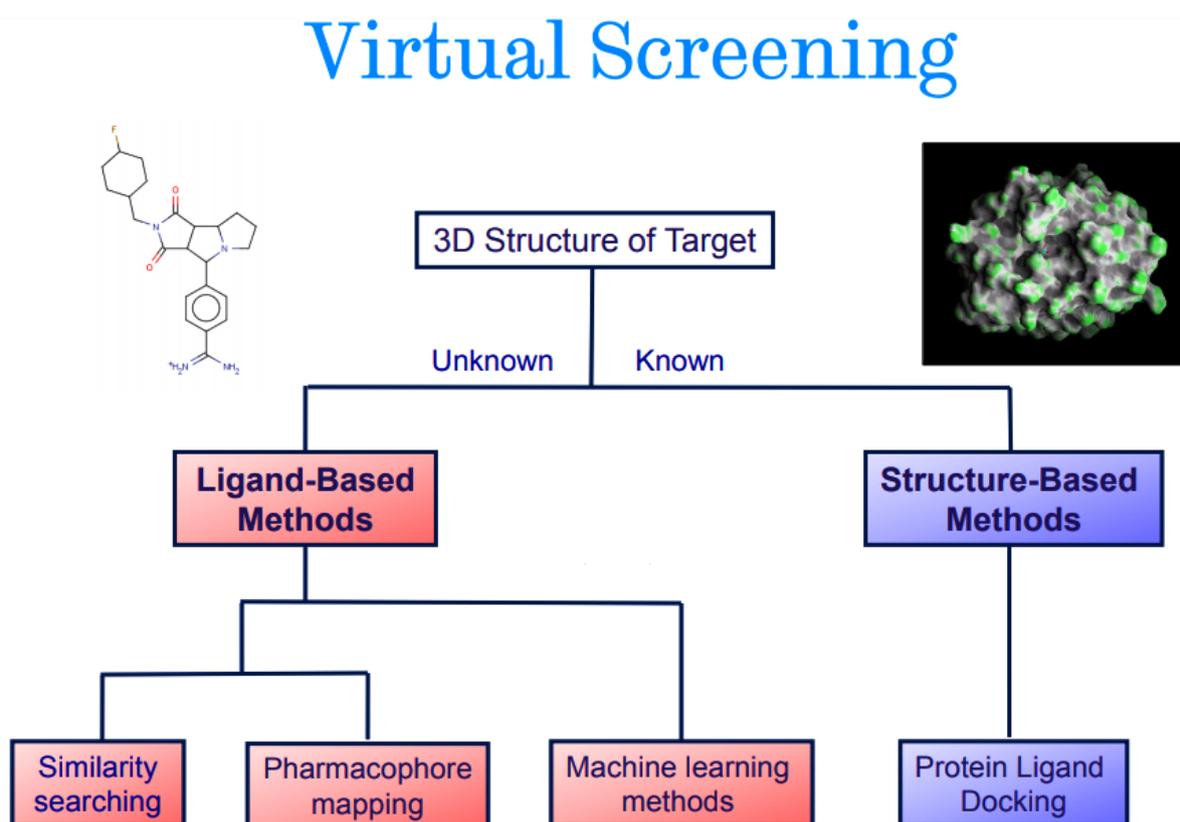


Figure III.2. Représentation schématique des stratégies du criblage virtuel, d'après Gillet, 2013.

IV.2.1. Criblage virtuel « ligand-based »

Les méthodes de criblage « ligand-based » reposent sur la connaissance préalable de ligands ayant une activité sur la cible thérapeutique. Il sera ainsi possible d'utiliser ces ligands comme une première base de « hits » afin d'identifier d'autres composés similaires, présentant des caractéristiques d'activité communs aux ligands connus de la cible. Les approches « ligand-based » peuvent être : la recherche de similarité, le criblage de pharmacophores et les approches QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship ou modèle de relations quantitatives structure-activité) (Reddy et *al.*, 2007 ; Ferreira et *al.*, 2015).

IV.2.2. Criblage virtuel « structure-based »

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement aux techniques de criblage virtuel « structure-based ». L'approche « structure-based » repose sur la connaissance de la structure de la cible thérapeutique pour l'identification de composés actifs. Il existe deux types de méthodes expérimentales pour obtenir la structure 3D d'une cible : la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Lorsque la structure de la cible étudiée n'est pas disponible, des méthodes de prédiction de la structure 3D par homologie de séquence peuvent être mises en œuvre (Reddy *et al.*, 2007 ; Ferreira *et al.*, 2015).

Après avoir obtenu une structure de la cible, plusieurs approches « structure-based » peuvent être employées pour l'identification de composés actifs (Lyne, 2002): la construction de modèles pharmacophoriques basés sur la structure, l'établissement de modèles RD-QSAR (Receptor Dependent-Quantitative Structure Activity Relationship ou modèle de relations quantitatives structure-activité dépendant du récepteur), la conception de ligands *de novo* et les méthodes de docking qui sont les plus populaires (figure III.3).

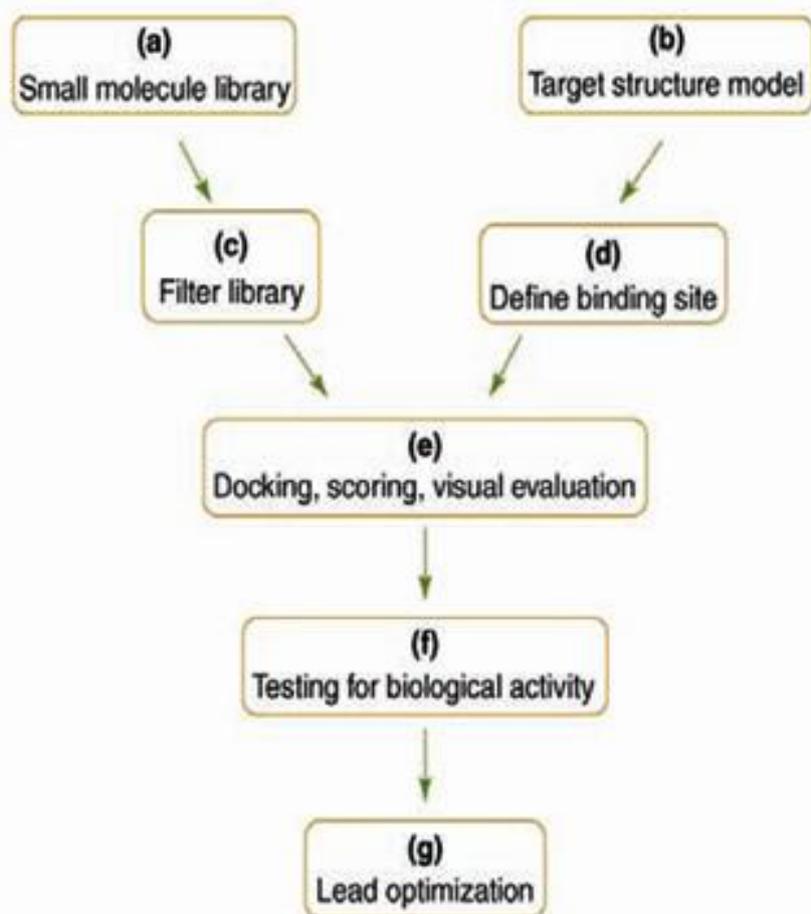


Figure III.3. Criblage virtuel par docking moléculaire (Beautrait, 2008).

La figure III.3 présente le flux de travail typique d'un criblage virtuel par docking moléculaire. Dans un premier temps, le choix d'une chimiothèque (a), puis pré-filtrée (c). Concernant la cible, il faut disposer d'une structure tridimensionnelle fiable de la protéine ciblée (en particulier au niveau de son site actif) (b). Une fois la cible est sélectionnée et préparée, le site actif de celle-ci est défini ; cela consiste à déterminer les résidus clés du site de liaison qui forment le lieu de reconnaissance moléculaire avec les ligands (d). Quand les petites molécules et la cible sont prêtes, un algorithme de docking, associé à sa fonction de score, est employé afin d'identifier les composés de la chimiothèque ayant les meilleures affinités avec la cible thérapeutique (e). Une inspection visuelle des solutions de docking des ligands les mieux classés par la fonction de score peut avoir lieu, afin de vérifier leurs modes d'interaction avec les résidus clés du site actif (e). Les molécules candidates obtenant les meilleures prédictions d'affinité constituent enfin des touches potentielles qu'il faut valider en les soumettant aux tests expérimentaux (f). A l'issue de ces essais, les composés démontrant une activité biologique peuvent passer en phase d'optimisation en vue de déterminer des têtes de série (g) (Beautrait, 2008).

XI. Docking moléculaire

V.1. Définition

Le docking moléculaire (figure III.4) est une technique informatique qui prédit la conformation (position et orientation relatives) la plus favorable de deux molécules en interaction et formant un complexe stable. La connaissance de cette conformation préférentielle permet par la suite l'estimation de la force d'association (affinité de liaison) entre ces deux molécules (Kitchen et *al.*, 2004).

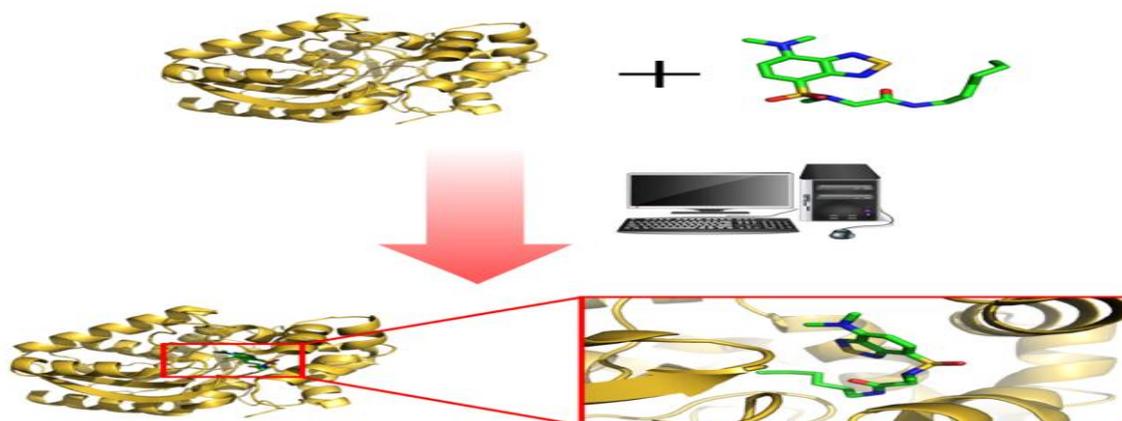


Figure III.4. Docking protéine-ligand.

V.2. Principe du docking

En principe, un programme de docking doit être capable de générer les modes de liaison attendus pour des ligands dont la position adoptée au sein du site actif est connue dans un temps raisonnable (figure III.5). Pour cela, leur protocole est composé de deux étapes distinctes:

- La première (le docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables (Kramer et *al.*, 1999 ; Halperin et *al.*, 2002).
- La deuxième (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées (Kramer et *al.*, 1999 ; Halperin et *al.*, 2002).

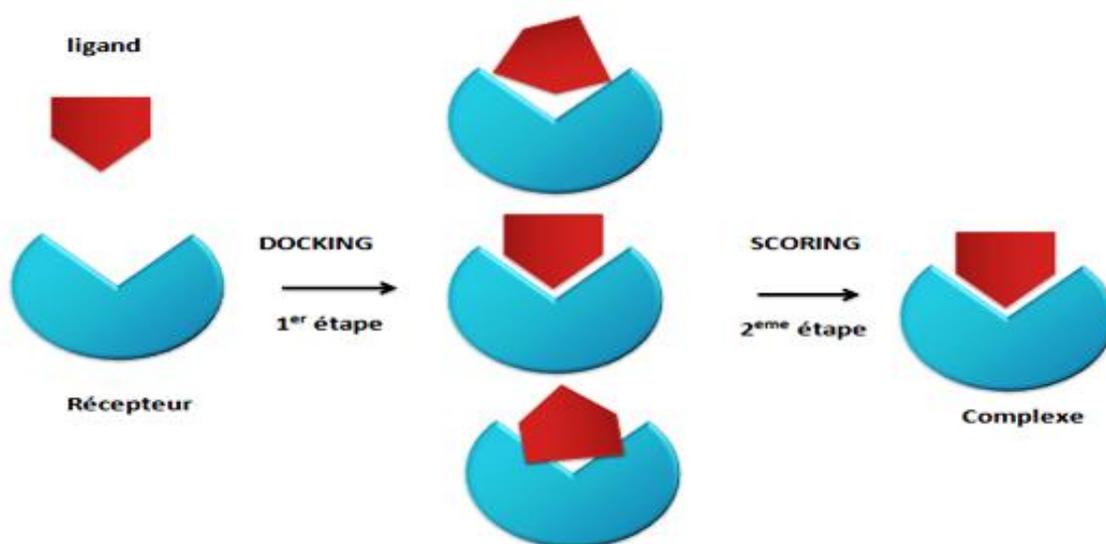


Figure III.5. Principales étapes de docking.

V.3. Le programme de docking moléculaire FlexX

V.3.1. Définition

FlexX (<http://www.biosolveit.de/>) est le programme informatique que nous avons utilisé pour prédire les interactions protéine-ligand. Il est actuellement une partie de LeadIT et est développé en trois endroits, à BioSolveIT GmbH (Sankt Augustin), à la ZBH de l'Université

de Hambourg (Hambourg) et à l'Institut Max-Planck for Computer Science (Sarrebuck). Pour une protéine donnée et un ligand, FlexX prédit la géométrie du complexe ainsi qu'une estimation de la force de liaison, la protéine est supposée être rigide (Rarey et *al.*, 1996). Ce programme utilise une approche incrémentale pour chercher les conformations les plus stables d'un complexe protéine-ligand.

V.3.2. Approche incrémentale

L'approche incrémentale est appelée aussi, fragmentation / reconstruction, car le principe général consiste à couper le ligand en plusieurs fragments (figure III.6). Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs ancres sont définies. Dans un premier lieu, un ou plusieurs fragments qui doivent être rigides sont placés au sein du site actif et donc mis en interaction avec la cible, puis le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de torsion (Corbeil, 2008).

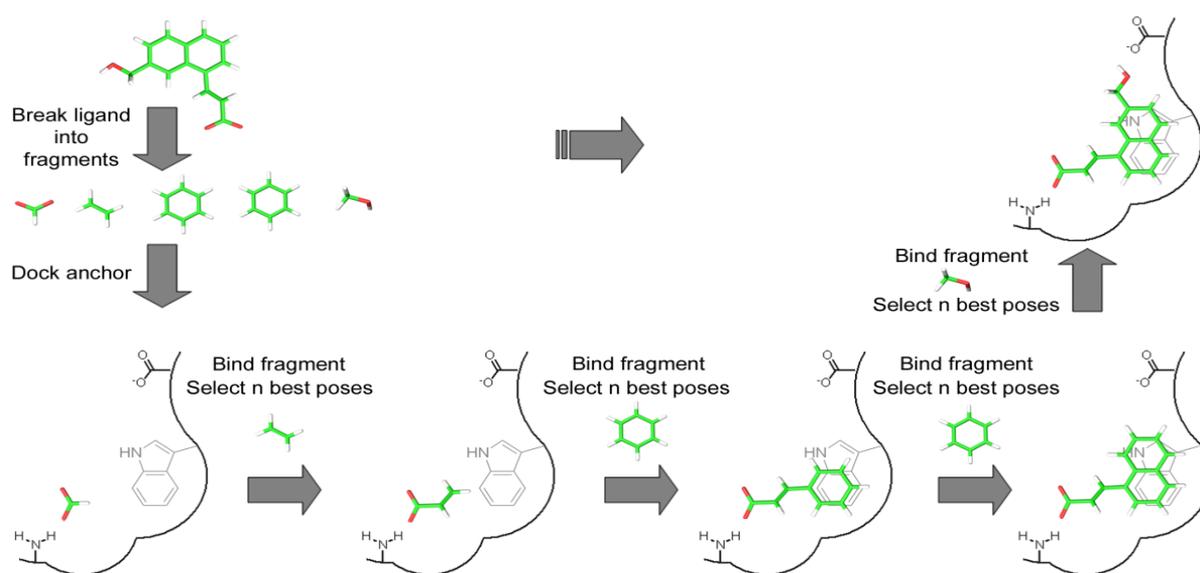


Figure III.6. Construction incrémentale d'un ligand au sein du site actif (Corbeil, 2008).

Lors du docking moléculaire, le programme FlexX tient compte de trois paramètres importants : la flexibilité conformationnelle du ligand, le niveau ou le type d'interaction entre la protéine et son ligand et enfin le classement des solutions de docking (la fonction de score) par évaluation de leur énergie d'interaction (Rarey et *al.*, 1996).

V.3.3. Flexibilité conformationnelle du ligand

Le modèle qui décrit la flexibilité du ligand a été développé en 1994 par Klebe et Metzner (Klebe et Mietzner, 1994) pour la génération de conformation dans MIMUMBA. Le programme informatique MIMUMBA a pour objectif d'énumérer un grand nombre de conformations à faible énergie d'une petite molécule organique. Il utilise les valeurs à partir des données de la structure en ce qui concerne la longueur et l'angle de la liaison. (Rarey et *al.*, 1996). Le logiciel FlexX arrime des ligands flexibles aux récepteurs rigides par l'utilisation d'une approche incrémentale décrite précédemment. Elle est divisée en trois phases: la sélection du fragment de base, le placement du fragment de base, et la construction du ligand progressivement à partir du fragment de base.

- **Sélection du fragment de base**

La première étape du *docking* par FlexX est de découper le ligand en plusieurs composants par l'ouverture de toutes les liaisons simples acycliques. Ensuite, le choix d'un fragment rigide qui va interagir en premier avec la protéine, cette partie est appelée «le fragment de base». Ce dernier est capable de répondre simultanément à un nombre d'interactions suffisant avec l'environnement de la protéine (Rarey et *al.*, 1996 ; Kramer et *al.*, 1999).

- **Placement du fragment de base dans le site actif**

L'idée de base d'un placement du fragment par FlexX est de générer un tableau de tous les sites d'interaction possibles avec le fragment, puis de rechercher dans le tableau les points d'interaction correspondants à l'aide de triangles de points de requête générés à partir d'atomes de ligand (figure III.7). Une conformation de ligand (ou «pose») est stockée et notée lorsqu'un triangle de requête est associé avec succès à un site d'interaction triangle de récepteur (Schneider et Böhm, 2002).

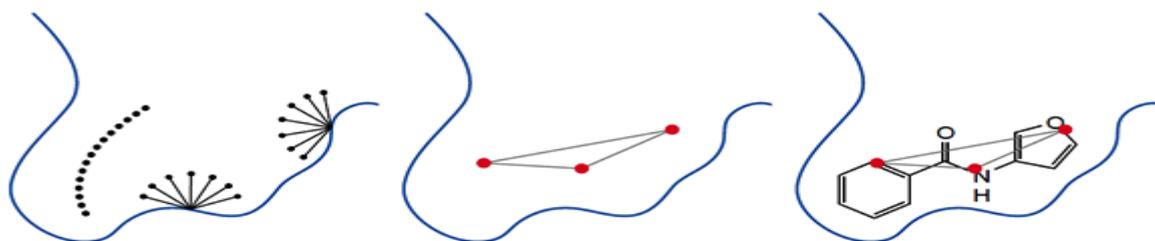


Figure III.7. Technique utilisée pour placer le fragment de ligand dans le site actif, d'après Schneider et Böhm, 2002.

- **Reconstruction du ligand**

Cette dernière étape consiste à rajouter progressivement au fragment de base, toutes les parties flexibles préalablement découpées pour reconstruire le ligand (figure III.8).

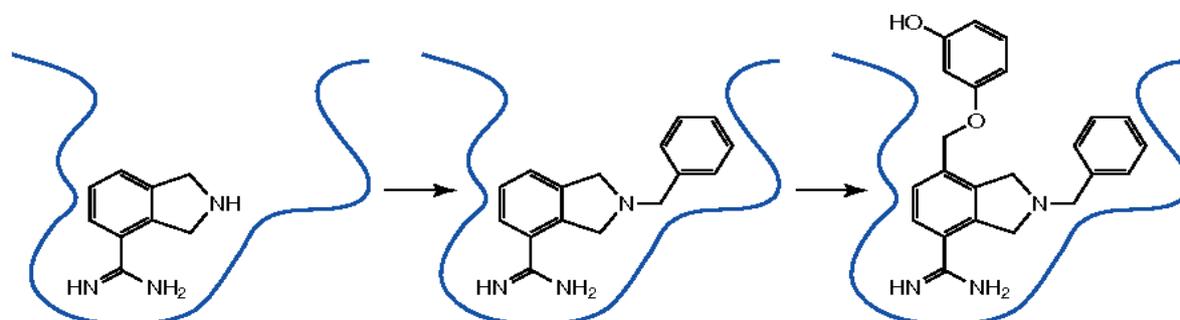


Figure III.8. Reconstruction du ligand dans le site actif (Schneider et Böhm, 2002).

V.3.4. Interaction protéine-ligand

Dans cette partie, nous avons présenté le modèle d'interaction protéine-ligand utilisé dans FlexX. Ce modèle est dérivé des travaux de Böhm (1992) et de Klebe (1994). Il est basé sur les surfaces sphériques, pour chaque groupe ou atome il y a un type d'interaction et une géométrie correspondante. Le tableau III.3 présente les différents types d'interactions rencontrées lors de la formation d'un complexe protéine-ligand. Ces types d'interaction sont divisés en groupes et contre groupes. Si le contre groupe n'est pas défini le groupe et le contre groupe sont identiques (Rarey et *al.*, 1996).

Tableau III.3. Types d'interactions rencontrés dans le complexe protéine-ligand (Rarey et *al.*, 1996).

Groupe	Contre-groupe	Niveau
Carbone aliphatique Carbone aromatique Sulfure	-	1
Atome d'un cycle aromatique Méthyle Amide	Centre d'un cycle aromatique	2
H-accepteur Métal accepteur	H-donneur Métal	3

V.3.5. La fonction de score

Le programme FlexX utilise les fonctions empiriques de score, qui estiment l'affinité des complexes protéine-ligand en additionnant des termes d'interaction (liaison hydrogène, interaction hydrophobe, interaction ionique...etc.) (voir tableau III.4). Cette fonction de score est dérivée de l'équation de Hans Joachim Böhm (Böhm, 1992 ; Rarey et *al.*, 1996 ; Kramer et *al.*, 1999 ; Claussen et *al.*, 2001) avec quelques modifications mineures (équation1) :

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} \times N_{\text{rot}} \\ &+ \Delta G_{\text{hb}} \sum_{\text{neutral H-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ &+ \Delta G_{\text{io}} \sum_{\text{ionic int.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ &+ \Delta G_{\text{aro}} \sum_{\text{aro.int.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ &+ \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{\text{lipo.cont}} f * (\Delta R) \end{aligned}$$

ΔG_0 : Terme constant, perte entropie,

ΔG_{hb} : Contribution d'une liaison H idéale,

$f(\Delta R, \Delta \alpha)$: Pénalité pour déviation de la géométrie idéale,

ΔG_{io} : Contribution ionique idéale,

ΔG_{aro} : Contribution des interactions aromatiques idéale,

ΔG_{lipo} : Contribution lipophile,

ΔG_{rot} : Perte d'énergie libre liée a perte de rotation interne,

N_{rot} : Nombre de liaison libres.

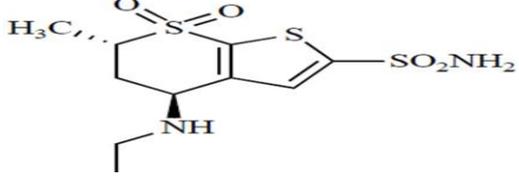
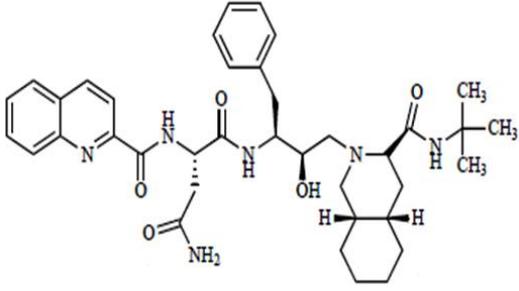
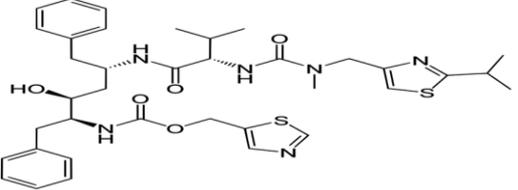
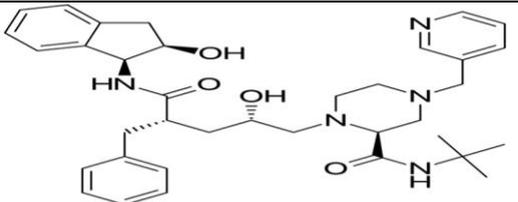
Tableau III.4. Types d'interactions de programme FlexX (Kramer et *al.*, 1999).

Types d'interaction compatibles	Distance d' interaction (Å)	$\Delta G_{\text{neutral}}$ (kJ/mole)	ΔG_{ionic} (kJ/mole)
H-accepteur/ H-donneur	1.9	-4.7	-8.3
Metal accepteur/ metal	2.0	-4.7	-8.3
Atome de cycle aromatique, méthyle, amide / centre de cycle aromatique	4.5	-0.7	/
Atomes de carbone aliphatiques et aromatiques, soufre	4.5	/	/

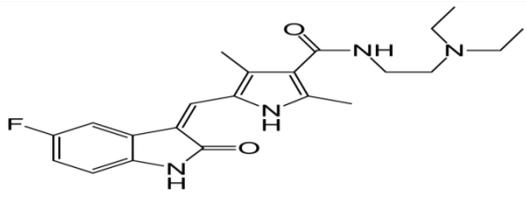
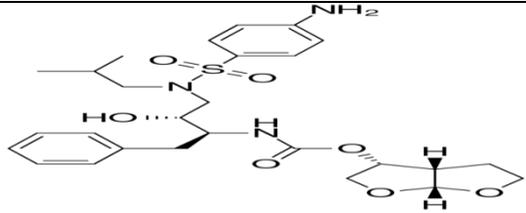
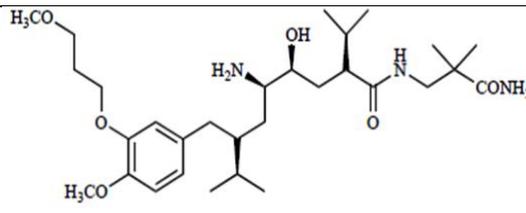
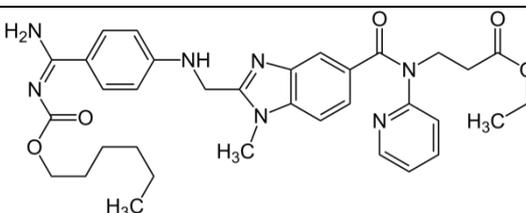
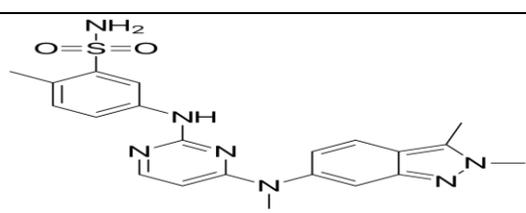
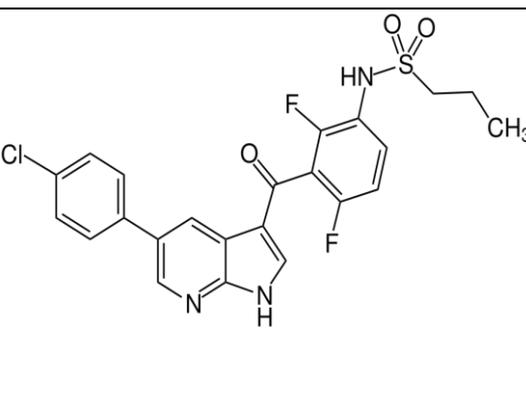
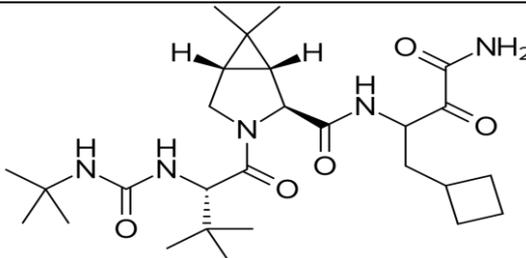
XII. Exemples de réussites de criblage virtuel

Un certain nombre de médicaments mis sur le marché pour lesquels il est prouvé dans la littérature que les approches basées sur les stratégies de criblage virtuel apportent une contribution significative à leur conception et à leur découverte (tableau III.5).

Tableau III.5. Quelques exemples de médicaments commercialisés d'après Herbst et *al.*, 2004 ; Tsai et *al.*, 2008 ; Alex et Millan 2009 ; Talele et *al.*, 2010 ; Ascione, 2012 ; Swaika et *al.*, 2014.

Médicament et Nom Commercial	Structure	Année	Cible	Indication
Dorzolamide Trusopt®		1995	Anhydrase Carbonique	Traitement de la maladie oculaire, le glaucome
Saquinavir Invirase®		1995	La protéase du virus de l'immunodéfi- -cience humaine-1 (HIV-1)	SIDA
Ritonavir Norvir®		1996	HIV protéase	SIDA
Indinavir Crixivan®		1996	HIV protéase	SIDA

Brinzolamide Azopt®		1999	Anhydrase Carbonique	Glaucome
Nelfinavir Viracept®		1999	HIV protéase	SIDA
Zanamivir Relenza®		1999	Neuraminida se	Médicaments antigrippaux
Fosamprenavir Telzir®		2003	HIV protéase	SIDA
Ximelagatran Exanta®		2004	Thrombine	Embolie veineuse
Gefitinib Iressa®		2004	Inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR	Cancer
Tipranavir Aptivus®		2005	HIV protéase	SIDA

Sunitinib Sutent®		2006	Kinase	Cancer
Darunavir Prezista®		2006	HIV protéase	SIDA
Aliskiren Tekturna®		2007	Rénine	Traitement de l'hypertension
Dabigatran Pradaxa®		2008	Thrombine	Embolie veineuse
Pazopanib Votrient®		2009	Kinase	Cancer de l'ovaire
Vemurafenib Zelboraf®		2011	Enzyme B-Raf (B-Raf proto-oncogène, sérine/thréonine kinase) mutée	Un médicament anticancéreux
Boceprevir Victrelis®		2011	Inhibiteur de la protéase	Virus de l'hépatite C

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et méthodes d'étude *in silico*

A fin de réaliser notre étude concernant le criblage virtuel d'une chimiothèque, nous avons utilisé des microordinateurs HP et Acer avec une mémoire vive de 2 Go pour chacun, et un processeur 2.20 et 2.16 GHz Intel Core i3 respectivement. Les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 2013 ; 64bits version 2015.

II. Evaluation du programme de criblage FlexX

Dans le cas des criblages virtuels, différentes métriques sont utilisées pour comparer l'efficacité des logiciels utilisés. Puisque les résultats obtenus par criblage virtuel restent des prédictions et que leur fiabilité peut parfois être mise en doute, il est crucial de s'assurer les performances des différentes méthodes afin d'obtenir de meilleurs résultats dans les recherches de nouveaux composés.

Quatre critères sont utilisés pour évaluer la performance d'un processus de criblage virtuel: le premier critère est la précision du positionnement des composés (RMSD). Le deuxième critère est l'analyse visuelle des résultats. Le troisième critère est le coefficient de corrélation. Enfin, le dernier critère d'évaluation est la capacité du logiciel de docking à discriminer les actifs des inactifs.

I.1. Le RMSD

La déviation quadratique moyenne (RMSD) est la mesure quantitative la plus couramment utilisée de la similarité entre deux coordonnées atomiques superposées. Les valeurs de RMSD sont présentées en Å (Kramer et *al.*, 1999 ; Kellenberger et *al.*, 2004 ; Kufareva et Abagyan, 2012).

D'après la littérature, deux structures peuvent être considérées comme similaires lorsque la valeur du RMSD, calculée via la superposition de leurs atomes, est inférieure à 2 Å. Plus cette valeur est élevée plus la différence structurale est importante. En plus, le RMSD entre deux poses est une mesure géométrique de la distance entre les positions atomiques de la structure expérimentale et celles de la structure prédite du complexe ligand-site de liaison (Vieth et *al.*, 1998; Cole et *al.*, 2005).

La norme actuelle pour évaluer les performances d'un programme de docking est de faire un test à partir de plusieurs centaines de complexes protéines-ligands cristallisés. Plus la valeur de RMSD se rapproche de 0, plus la pose prédite se superpose avec la référence co-cristallisée (Kramer et *al.*, 1999; Kellenberger et *al.*, 2004).

Dans cette étude, la performance du programme FlexX a été évaluée sur 200 complexes protéines-ligands tirés de façon aléatoire de la PDB. Le docking de ces complexes par le logiciel FlexX donne les différentes valeurs de RMSD entre le mode d'interaction prédit ou amarré et celui obtenu expérimentalement.

I.2. Analyse visuelle

L'analyse visuelle faisant suite au test RMSD est aussi une étape essentielle pour vérifier d'avantage la performance du programme FlexX. Elle permet de visualiser les résultats décrits par la valeur numérique RMSD.

I.3. Le coefficient de corrélation (r)

Le coefficient de corrélation de *Pearson* constitue une mesure de l'intensité et de liaison linéaire entre deux variables. Le coefficient de corrélation mesure le degré d'association linéaire entre les deux séries de données, et il prend des valeurs situées entre -1 et 1. S'il n'y a pas de relation linéaire entre les deux séries de données, le coefficient de corrélation est très proche de zéro, et on dira que les deux variables ne sont pas corrélées alors que 1 signifie une corrélation parfaite (Fox, 1999).

Le signe du coefficient indique la direction de la relation. Si les deux variables ont tendance à augmenter ou à diminuer ensemble, le coefficient est positif, et la ligne qui représente la corrélation s'incline vers le haut. Si une variable a tendance à augmenter lorsque l'autre diminue, le coefficient est négatif, et la ligne représentant la corrélation s'incline vers le bas.

Pour étudier la corrélation entre l'énergie d'interaction estimée par la méthode de docking à l'aide de FlexX et l'activité biologique (IC₅₀) déterminée expérimentalement, nous avons utilisé des différents complexes protéine-inhibiteur proviennent de la PDB. Au total, 92 complexes ont été testés. La disponibilité des valeurs de leur IC₅₀ est parmi les critères de choix de ces molécules utilisées pour tester la fiabilité de programme FlexX à l'aide du

coefficient de corrélation. Les structures des inhibiteurs et leurs IC₅₀ sont représentées dans l'annexe 3.

I.4. La capacité de FlexX à discriminer les actifs des inactifs

I.4.1. Définition

Cette évaluation consiste à tester la capacité d'une fonction de score à discriminer les composés capables de se lier à la cible thérapeutique, dits « actifs », du reste des composés de la chimiothèque utilisée, dits « inactifs ». C'est essentiel car le criblage *in silico* doit permettre de tester expérimentalement certaines molécules (parmi celles ayant les meilleurs scores) et d'en laisser d'autres de côté (les moins bien classées) (Chen et *al.*, 2006 ; Guillemain, 2012). De ce fait, un programme de criblage virtuel est efficace si la fraction d'actifs retrouvée grâce aux méthodes de docking est largement supérieure à celle retrouvée en sélectionnant des composés au hasard dans la chimiothèque (Lagarde, 2014).

Plusieurs banques d'évaluation ont été mises en place pour évaluer la capacité d'une méthode de docking à enrichir une chimiothèque en actifs (Bissantz et *al.*, 2000; McGovern et Shoichet, 2003 ; Pham et Jain, 2006 ; Huang et *al.*, 2006). Celle la plus utilisée est connue sous le nom DUD-E (Directory of Useful Decoys Enchanced) (Mysinger et *al.*, 2012). La DUD-E est disponible gratuitement sur le serveur Web : <http://dude.docking.org>, qui comprend maintenant 102 cibles thérapeutiques, avec une moyenne de 224 ligands par cible tirés de ChEMBL et 50 decoys par ligand tirés de ZINC. Les 102 cibles couvrent diverses catégories de protéines, dont 26 kinases, 15 protéases, 11 récepteurs nucléaires, cinq GPCR, deux canaux ioniques, deux cytochromes P450, 36 autres enzymes et cinq protéines diverses. Après un criblage virtuel d'une chimiothèque d'évaluation, il est possible de classer les composés selon leurs scores. À partir de ces données, des courbes d'enrichissement sont déduites.

I.4.2. Courbes d'enrichissement

Les courbes d'enrichissement représentent le pourcentage de molécules biologiquement actives récupérées durant le criblage en fonction de leur classement sur l'ensemble total des molécules criblées (Arrault, 2007).

Dans notre évaluation, nous avons utilisé une des protéases (la tryptase beta-1 ou TRYB1 comme cible thérapeutique) provenant de la DUD-E. Au total, 7884 composés

appartenant à la chimiothèque DUD-E (dont 171 composés actifs sur la TRYB1) doivent être évalués par leur score vis-à-vis de la TRYB1. La courbe obtenue a été tracée à l'aide du programme Gnuplot 5.0.3 (<http://www.gnuplot.info>).

III. Les outils du criblage virtuel

II.1. Le logiciel de criblage virtuel Flex X

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le programme FlexX dans sa version 2.2.0, 2016 a été utilisé pour réaliser les travaux de docking. Il fait actuellement partie de la plateforme LeadIT (figure IV.1). Tout d'abord, Les fichiers du récepteur (enzyme) et des ligands (inhibiteurs) utilisés par FlexX doivent être téléchargés sous format *.pdb* pour le premier et sous format *.sdf* pour le second. La procédure de docking avec FlexX se décompose en trois grandes étapes :



Figure IV.1. Page d'accueil de logiciel FlexX.

II.1.1. Préparation du récepteur

Après l'ouverture de la fenêtre de FlexX, le choix de l'option « *Prepare receptor* » permet le téléchargement du complexe *enzyme-ligand.pdb* (figure IV.2). Ensuite il faut :

- a. Sélectionner la chaîne respective de récepteur, les ions, et les cofacteurs ou les coenzymes.
- b. Déterminer l'emplacement du site actif de la cible thérapeutique : L'identification du site de liaison est cruciale pour pouvoir réaliser un criblage virtuel basé sur la structure de la cible enzymatique.
- c. Sélectionner les molécules d'eau : FlexX laisse l'opportunité de simuler l'existence de molécules d'eau dans l'environnement du site actif. La présence d'eau est parfois primordiale pour assurer un relai entre le ligand et le site actif.
- d. Enregistrer le récepteur préparé.

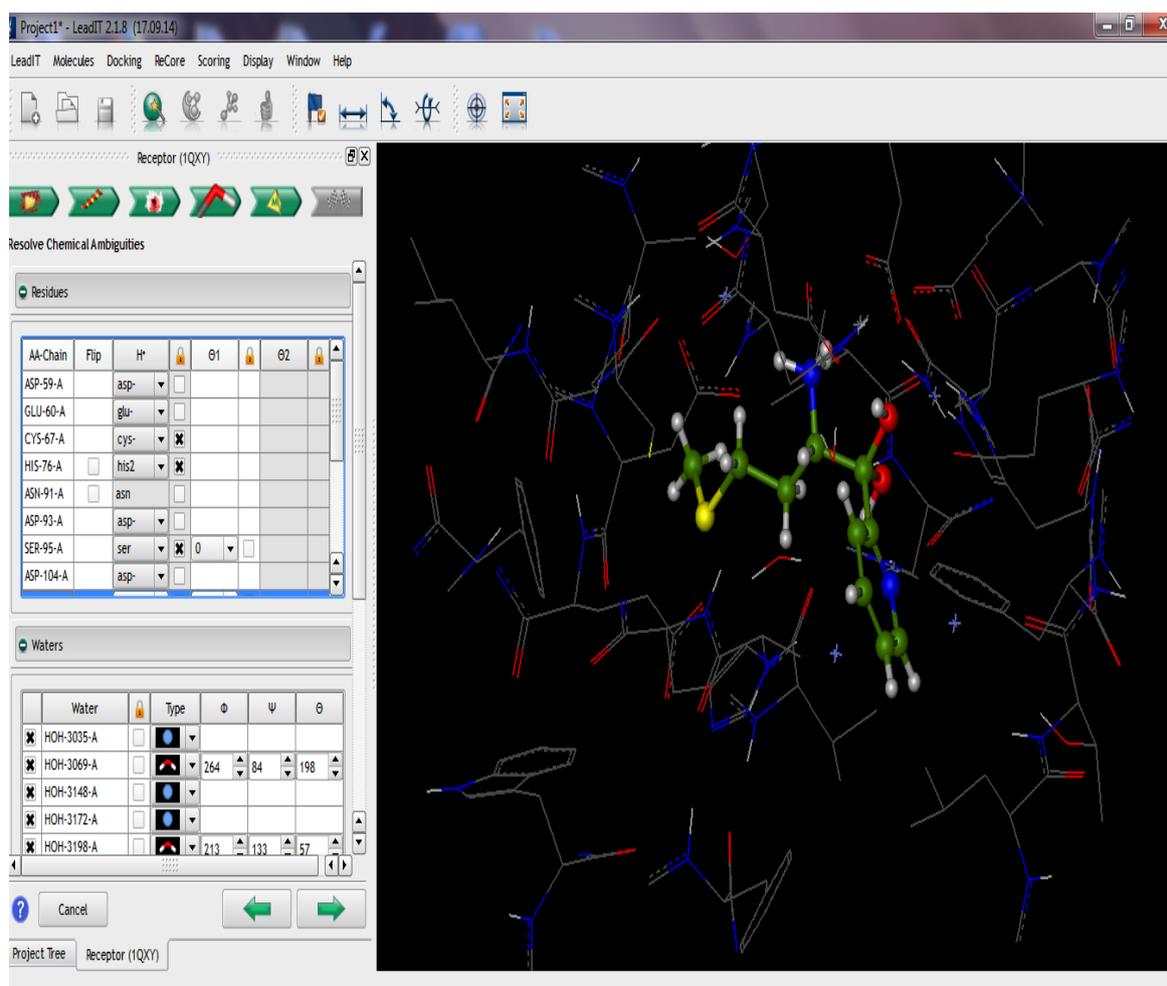


Figure IV.2. Préparation de l'enzyme MetAP par FlexX.

II.1.2. Arrimage d'un ligand dans le site catalytique

Le choix de l'option « docking » dans le menu permet de sélectionner l'inhibiteur et de lancer le docking.

II.1.3. Analyse des résultats

La dernière étape sera consacrée à l'analyse des résultats de docking (figure IV.3). Après quelques secondes à quelques minutes, selon la taille du ligand, nous pouvons observer sur l'écran :

- En haut, des images présentant en 2D et 3D l'inhibiteur placé dans le site actif de l'enzyme pour chaque solution possible. Ainsi, une telle image permet d'observer le mode d'interaction lors de la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme durant la formation du complexe MetAP-inhibiteur.
- Un tableau de solutions en bas contenant tous les résultats obtenus (RMSD, Score, ...).

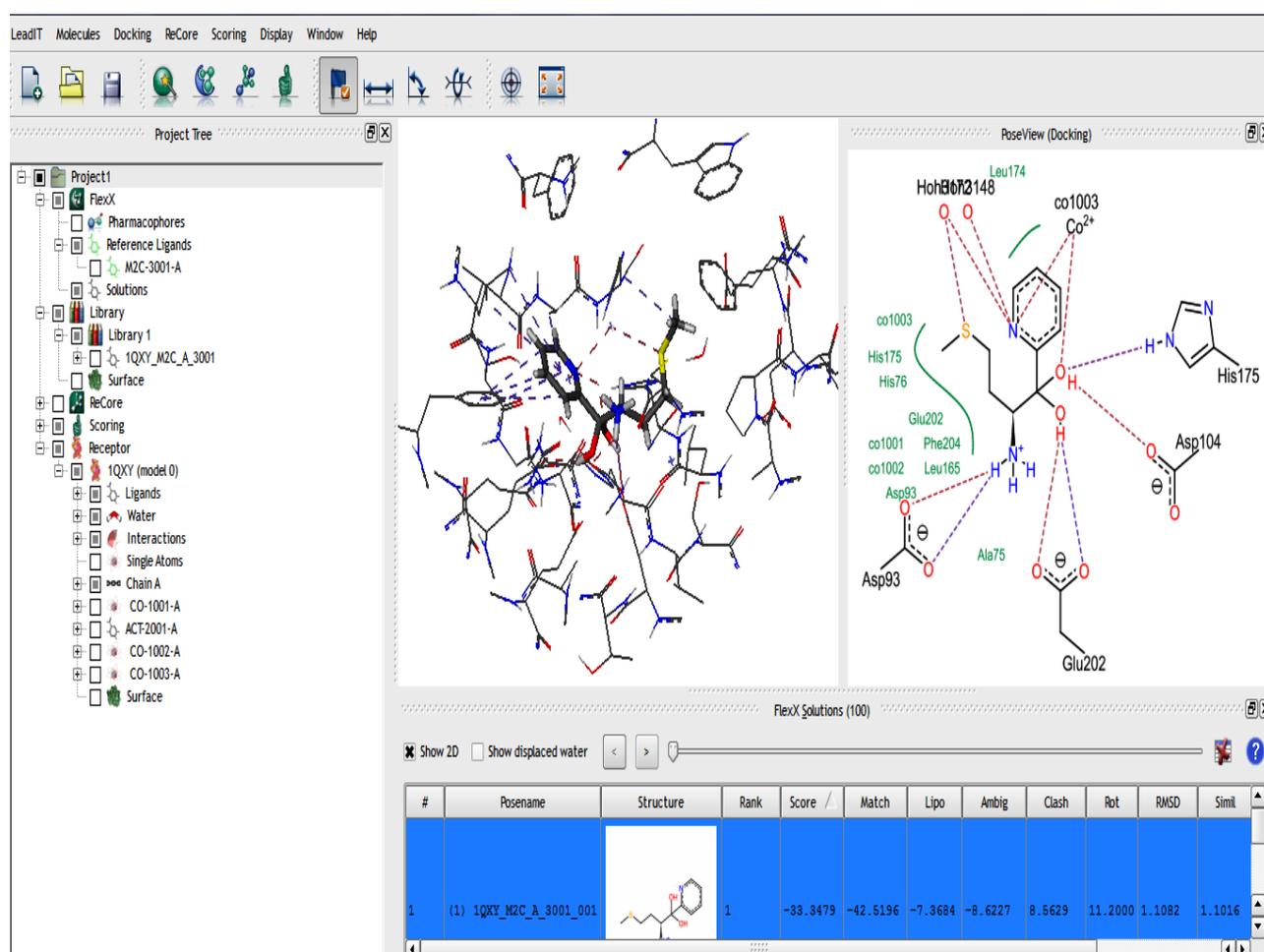
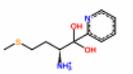
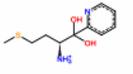
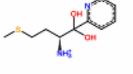
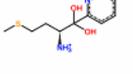
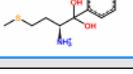


Figure IV.3. Résultat de l'inhibiteur docké par FlexX.

- Les Résultats de docking effectués par le programme FlexX sont générés dans un fichier texte (FlexX Suite Project) avec l'extension *.fxx*. Ce fichier fournit les meilleures positions de ligand (Top1 à Top200) dans le site actif de l'enzyme étudié, leur énergie d'interaction est donnée en KJ/mole. Les meilleurs résultats sont les conformations qui possèdent une basse énergie. Chaque pose possède six scores représentés dans le tableau IV.1 suivant.

Tableau IV.1. Résultats du docking de meilleures positions de ligand.

#	PoseName	Structure	Rank	Score	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	RMSD	Simil	#Match
1	(1) 1QXY_M2C_A_3001_001		1	-33.3479	-42.5196	-7.3684	-8.6227	8.5629	11.2000	1.1082	1.1016	21
2	(1) 1QXY_M2C_A_3001_002		2	-32.6187	-41.7594	-8.1126	-8.0596	8.7129	11.2000	1.1617	1.0541	19
3	(1) 1QXY_M2C_A_3001_003		3	-31.7581	-42.3424	-7.9838	-7.3663	9.3345	11.2000	1.0381	1.0270	19
4	(1) 1QXY_M2C_A_3001_004		4	-31.5914	-40.6633	-7.4026	-7.9406	7.8152	11.2000	5.2203	4.0387	16
5	(1) 1QXY_M2C_A_3001_005		5	-31.1397	-44.7914	-7.1275	-8.0716	12.2508	11.2000	2.1055	1.4298	20

- Total-score = Match-score + Lipo-score + Ambig-score + Clash-score + Rot-Score + ΔG_0 .
- Match-score = énergie des interactions de niveau 3 et de niveau 2 entre le ligand et les résidus du site actif
- Lipo-score = énergie des contacts lipophiliques.
- Ambig-score = énergie des contacts lipo-hydrophiliques.
- Clash-score = énergie d'encombrement stérique.
- Rot-score = énergie d'immobilisation des liaisons rotables du ligand.

II.2. Choix de la cible enzymatique

La connaissance de la structure tridimensionnelle des protéines est un élément déterminant pour la compréhension fine de leur mécanisme d'action dans un contexte biologique.

Les structures tridimensionnelles (3D) des MetAPs bactériennes, faisant l'objet de notre étude, sont disponibles sous format *.pdb* via la Protein Data Bank (PDB, <http://www.pdb.org>). C'est la plus grande base de données de structures protéiques. Elle compte à ce jour 73503 Structures, 6000 à 7000 structures sont ajoutées chaque année. Chaque modèle est référencé dans la banque par un identifiant unique à 4 caractères, le premier étant toujours un caractère numérique, les trois suivants étant des caractères alphanumériques. Cet identifiant est appelé « code pdb ou ID » (Berman, 2008).

Nous avons choisi quatre codes de bonne qualité de l'enzyme MetAP (1XNZ, 1QXY, 4FO8 et 3PKA respectivement). Ainsi, ces structures ont été choisies selon les critères suivants:

- Résolution cristallographique d'environ 2,0 Å ou moins ;
- Présence de l'ion métallique dans le site catalytique ;
- Liaison non covalente entre le ligand et la protéine ;
- Présence d'un inhibiteur de faible poids moléculaire ;
- Activités des ligands liés allant de la micromolaire au nanomolaire.

La combinaison des facteurs évoqués précédemment permet de réaliser un choix pertinent de structure cristallographique. Les caractéristiques de ces enzymes sont regroupées dans le tableau IV.2 ci-dessous.

Tableau IV.2. Principales caractéristiques des complexes utilisés.

Organisme	Code	Résolution (Å)	Nombre d'AA	Nombre d'atomes	Ion métallique	Référence
<i>E. coli</i>	1XNZ	1.52	264	2052	Mn	Ye <i>et al.</i> , 2004
<i>S. aureus</i>	1QXY	1.04	252	1931	Co	Douangamath <i>et al.</i> , 2004
<i>P. aeruginosa</i>	4FO8	1.9	280	1120	Mn	Lu et Ye, 2013
<i>M. tuberculosis</i>	3PKA	1.25	285	2204	Mn	Lu <i>et al.</i> , 2011

II.3. La collection de ligands

Une fois la cible thérapeutique identifiée, il faut tester un ensemble de molécules candidates sur cette cible.

II.3.1. La chimiothèque ZINC

La base de composés chimiques ZINC (<http://zinc.docking.org>) est une chimiothèque gratuite des composés disponibles dans le commerce pour le criblage virtuel. Elle est fournie par le département de chimie pharmaceutique de l'université de Californie, San Francisco, USA et contient plus de 35 millions de molécules achetables et prêtes pour l'amarrage. Chaque molécule de la bibliothèque est stockée dans plusieurs formats de fichiers courants, notamment SMILES, mol2, sdf, décrivant notamment les types d'atomes, leurs charges, leur connectivité, les types de liaisons et la stéréochimie. Dans la base de composés chimiques ZINC, chaque produit est associé aux informations concernant les fournisseurs auprès desquels on peut se le procurer. De plus, Ces molécules sont disponibles sous forme de poudre en quantité variable (1, 5, 10 mg voire plus) en l'espace de 2 à 4 semaines sur commande auprès du fournisseur (figure IV.4).

Les composés de la base de données ZINC sont organisés en plusieurs catégories, à savoir, Standard: pour livraison dans les 10 semaines, y compris les composés en stock et les composés à la demande, Propre: lorsque des règles de filtrage plus strictes ont été appliquées, en stock: pour livraison immédiate; et Boutique: sélection onéreuse de composés non inclus dans les catégories précédentes (Irwin et Shoichet, 2005 ; Irwin et al., 2012). Puisque nous essayons de trouver un composé actif contre la MetAP bactérienne qui puisse être directement achetable, nous avons choisi dans ce travail le sous-ensemble "lead like in stock" de la chimiothèque ZINC qui contient environ 3,7 millions de structures et a été utilisé pour le criblage *in silico* des composés basé sur la structure.

MCULE-5839072033

Compound [Show structures](#)

ADD TO COLLECTION

UET... LDZOS-UHFFFAOYSA-N

C1(=N... CC(=CC=2C(OC)=N1C)N/C(N... C)=O

Formula: C13H15... O2

Amount	Price	Purity (%)	Delivery time	
1 mg	141 USD	92	9 working days	GET QUOTE
5 mg	141 USD	92	9 working days	GET QUOTE
10 mg	141 USD	92	9 working days	GET QUOTE

New customers are eligible for 10% discount if indicated at the time of ordering.

GET QUOTE FOR MULTIPLE COMPOUNDS GET CUSTOM QUOTE

Actions Tautomers / Protomers Downloads Product availability **Basic properties**

Figure IV.4. Description d'une molécule disponible commercialement dans la base ZINC. Parmi les informations disponibles figurent la référence de la molécule (1), la structure (2), les quantités disponibles à la commande en mg (3), le prix de chaque quantité (4), la durée de livraison (5) et les propriétés physicochimiques (6).

Quand on a peu d'informations sur le site actif de la cible biologique MetAP, on doit tester un maximum de molécules chimiques pour tenter d'en trouver une active. Or comme il existe plusieurs millions de molécules différentes, il est impossible de les tester toutes pour des raisons de coût et de temps. Il faut donc sélectionner un sous ensemble de molécules à tester.

Afin de ne sélectionner que des molécules d'intérêt, il est commun de filtrer la chimiothèque par un certain nombre de descripteurs. En effet, Le point de départ de la sélection des composés destinés au criblage virtuel est l'utilisation de filtres pour réduire la taille de la base de données ZINC.

II.3.2. Filtrage de la base de données ZINC

a. *Screening Assistant*

Le logiciel *Screening Assistant* (<http://screenassistant.sourceforge.net/>), est un logiciel open-source disponible gratuitement sous licence GPL permettant l'analyse, la comparaison, la visualisation et la gestion complète et efficace de grands ensembles de molécules dédiées au criblage à l'aide de méthodes chémoinformatiques (figure IV.5). Il est programmé en Java et utilise une base MySQL (Monge, 2006 ; Le Guilloux et *al.*, 2012). Ce logiciel est donc utilisé en amont du criblage. Dans notre cas, nous avons utilisé *Screening Assistant* pour gérer les 3.7 millions des structures destinées au docking de la chimiothèque ZINC. Les fonctionnalités du logiciel sont les suivantes :

- Compilation des chimiothèques de différents fournisseurs avec prise en charge automatique des doublons ;
- Filtration des composés par leurs propriétés physicochimiques ;
- Filtration des composés en fonction de leurs propriétés « druglike » et « lead-like » ;
- Analyses graphiques des bases ;
- Suppression des composés pouvant générer des faux-positifs lors des tests biochimiques ;
- Suppression des composés potentiellement mutagènes ;
- Sélection de composés par diversité.

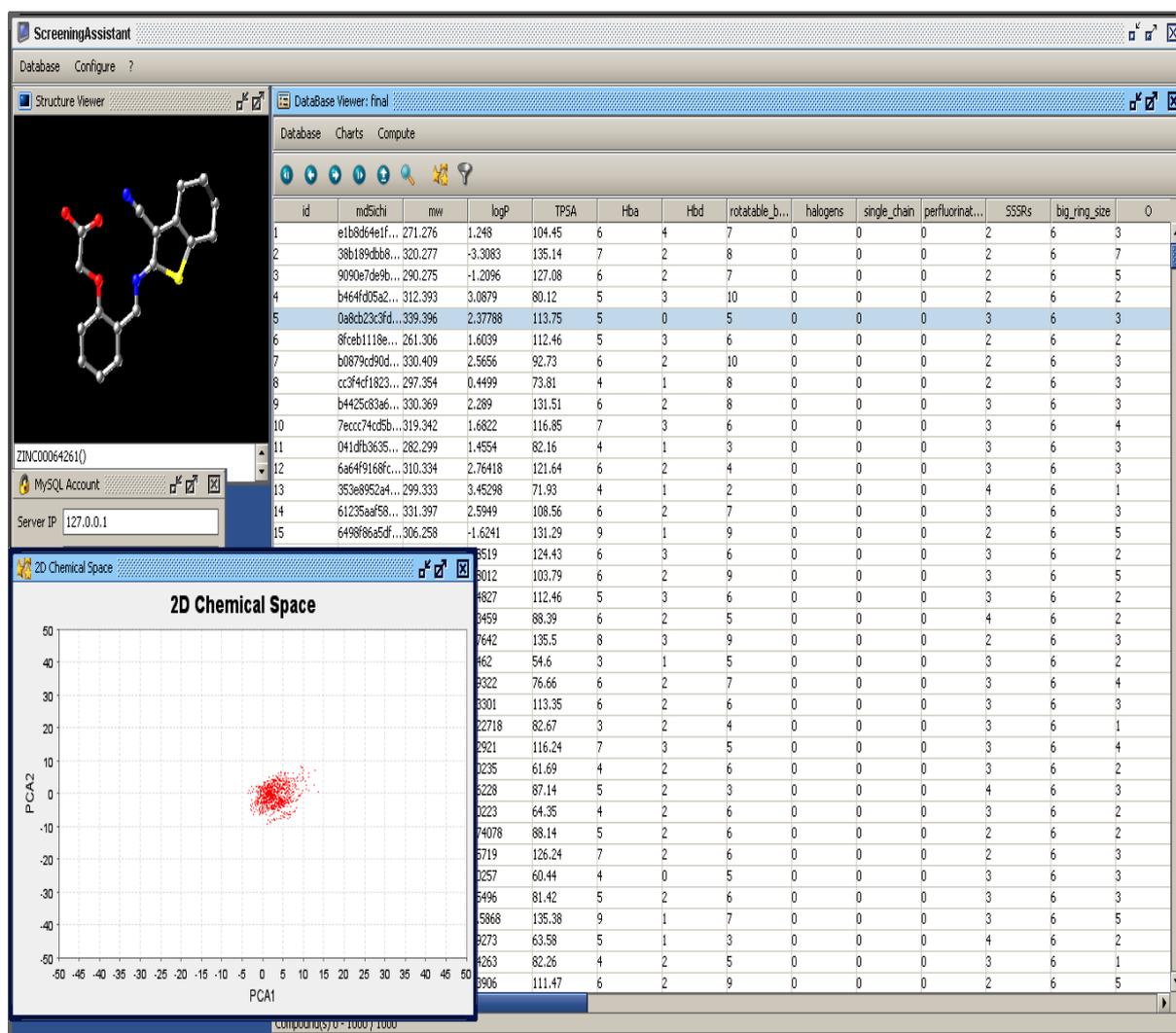


Figure IV.5. Capture d'écran du logiciel *Screening Assistant*.

b. Filtres physico-chimiques

Plusieurs filtrages physicochimiques sont appliqués. Les filtres sont destinés à éliminer les molécules chimiquement réactives, toxiques, présentant des propriétés inadéquates pour l'administration chez l'homme ou l'animal. De plus, les propriétés moléculaires telles que la masse moléculaire, le logP, la proportion d'atomes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène et le nombre de liaisons sujettes à la rotation sont les principaux critères de choix. Donc, ces filtres sont destinés à éliminer les composés dont les caractéristiques sont trop éloignées de celles d'un médicament. L'opération dure quelques heures avec le logiciel *Screening Assistant*.

Dans ce travail, nous avons appliqué les filtres suivants :

Règle de 5 de Lipinski (Lipinski et al., 2001) :

Cette règle contient 4 paramètres concernant les propriétés qu'un médicament doit avoir :

- Le poids moléculaire ne doit pas être supérieur à 500 g/mol ;
- Le coefficient de partition (logP) doit être ≤ 5 ;
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être ≤ 5 ;
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être ≤ 10 .

Veber et al., 2002 :

- La surface polaire du composé doit être inférieure à 140 Å² ;
- Le nombre de liaisons de rotation doit être inférieur à 15.

D'autres caractéristiques sont à prendre en compte pour sélectionner des composés destinés à être testés par criblage virtuel. Nous avons donc rajouté la possibilité de prendre en compte un certain nombre de critères (Rishton, 1997 ; Charifson et Walters, 2002 ; Monge, 2006) :

- Atomes d'halogènes ≤ 7 ;
- Chaînes alkyles $\leq -(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3 = 0$;
- Présence d'une chaîne perfluorée = 0 ;
- Nombre de cycles (Smallest Set of Smallest Rings) ≤ 6 ;
- O ≥ 1 ;
- N ≥ 1 ;
- Pas de NO₂ ;
- Pas de SO₂ ;
- Pas de CF₃ ;
- Présence d'atomes non organiques (autres que C, H, O, N, S, P, Br, F, Cl et I) = 0 ;
- Présence d'une fonction réactive = 0 ; (molécules contenant des groupements essentiellement électrophiles. Ils forment généralement des liaisons covalentes avec la cible biologique).
- présence d'un « warhead » = 0 ; (composés induisent des faux positifs en formant des liaisons non covalentes avec la cible biologique, du type agents chélatants, inhibiteurs suicides et composés polyanioniques).

- La molécule est un composé formant des agrégats « promiscuous aggregating inhibitor » = 0 ; (inhibiteurs agissant de manière non compétitive. Ils forment des agrégats de taille variable entre 50 et 400 nm qui se fixent en différents endroits de la protéine et inhibent certaines enzymes).
- PDL_score ou score Progressif interne « Drug-Like » ≤ 1 , signifie que les composés sont évalués comme Drug-like, plus de 2 signifie que les composés ne sont absolument pas comme Drug-like ;
- PLL_score ou score Progressif interne « Lead-Like » ≤ 1 , signifie que les composés sont évalués comme Lead-Like, plus de 2 signifie que les composés ne sont absolument pas comme Lead-Like ;
- Nettoyage pour mon criblage ou Cleaning For My Screening (CFMS ≤ 1). Les molécules ayant un CFMS ≤ 1 seront considérées comme acceptables. Celles avec un CFMS ≥ 2 ont de grandes chances d'avoir des problèmes, que ce soit en termes de solubilité, d'absorption, ou de faux positifs.

c. Sélection de composés par diversité

La sélection des composés se base sur le principe de similarité, selon lequel les molécules similaires doivent avoir des propriétés biologiques similaires (Spencer et *al.*, 1997 ; Le Guilloux, 2006). Donc, le test d'une seule molécule d'un groupe similaire donne une estimation raisonnable du potentiel d'activité des autres membres du même groupe. De ce fait, on favorisera le criblage de composés avec des structures suffisamment différentes. Ceci dans le but d'isoler plusieurs familles d'intérêts. La sélection par diversité est basée sur le regroupement des composés en clusters, qui doivent contenir des composés chimiquement similaires. La sélection consiste à choisir une molécule dans chaque cluster. *Screening Assistant* utilise l'algorithme Stochastic Clustering Analysis (SCA) pour identifier le nombre de clusters (Monge, 2006).

L'algorithme SCA procède de la manière suivante : La première molécule de la base est considérée comme étant un centre de cluster. Ensuite, pour chacune des molécules suivantes, la similarité avec chaque centre de cluster déjà identifié est évaluée. Si pour une molécule tous les scores de similarité sont inférieurs à une valeur de seuil fixée au préalable, cela signifie que les composés ne se trouvent dans aucun cluster existant. Un nouveau cluster est donc créé en ajoutant la molécule à la liste des centres de clusters.

Screening Assistant fixe la valeur du seuil de similarité à 0,8 après une série de tests. Elle permet de générer assez de clusters pour analyser des bases de très petites tailles (Monge, 2006). Un exemple fictif de mesure de l'espace chimique par l'intermédiaire de clusters est présenté dans la figure IV.6.

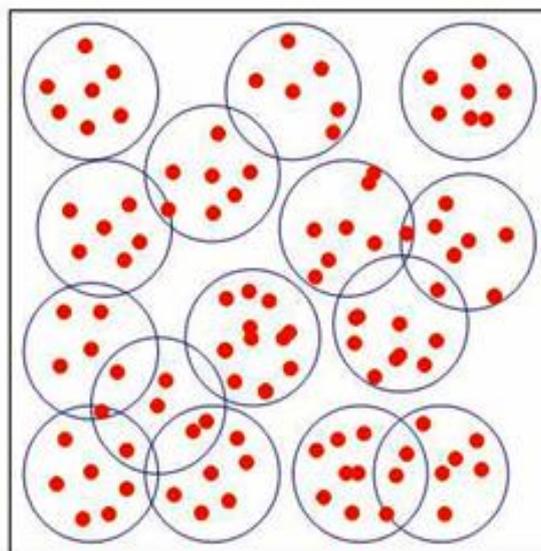


Figure IV.6. Exemple fictif de l'espace chimique projeté en deux dimensions. L'espace est analysé avec l'étape de diversité de l'algorithme SCA. Les points représentent les molécules, et les cercles les clusters. Le nombre de clusters donne une estimation de la diversité. Chaque cluster a au moins un composé : celui se trouvant en son centre (Monge, 2006).

II.4. Le criblage virtuel par docking moléculaire de la banque de données ZINC

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au criblage virtuel basé sur la structure de la protéine cible pour ses applications dans le cadre de la découverte de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la MetAP bactérienne. Notre but a été, à partir de bases de ligands commerciaux (la chimiothèque ZINC), d'aboutir à une sélection de molécules potentiellement actives. La première étape du criblage virtuel est l'utilisation des filtres décrits précédemment pour réduire la taille de la chimiothèque de 3,7 millions de composés. Un docking moléculaire avec FlexX est ensuite appliqué à l'ensemble pré-filtré. Les produits ayant le meilleur score seront retenus pour les tests biologiques. Ce processus peut être schématisé en cinq étapes, dont les enjeux sont décrits ci-dessous (figure IV.7).

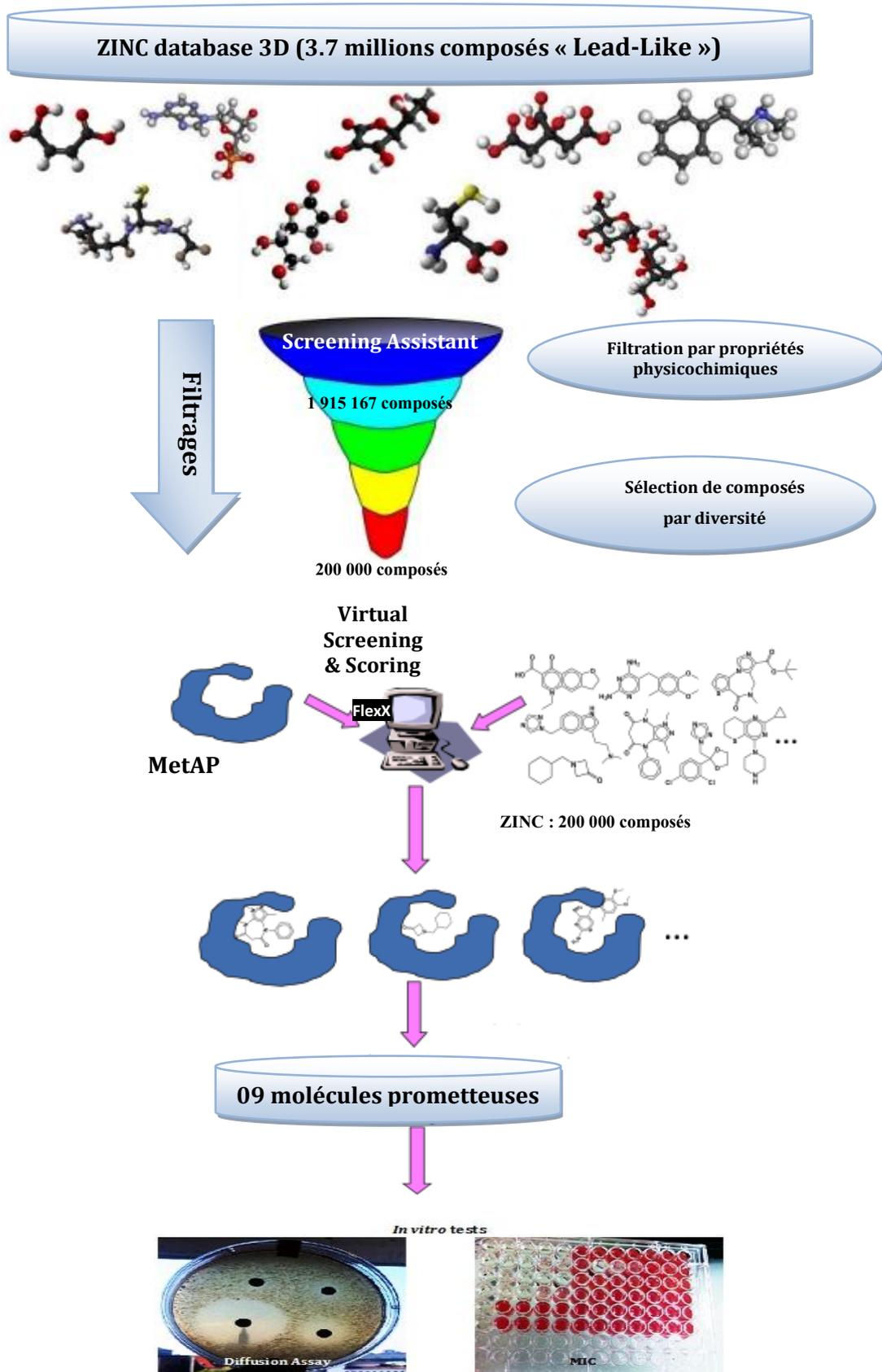


Figure IV.7. Représentation schématique des étapes de criblage de la chimiothèque ZINC pour la découverte d'inhibiteurs de la MetAP bactérienne.

II.5. Evaluation des propriétés ADME-Tox

Le développement d'un nouveau médicament doit tenir compte des propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité (ADME-Tox) (Ekins et *al.*, 2005), car il s'agit de la principale cause d'échec tardif et coûteux des molécules candidates dans la conception du médicament (figure IV.8). Par conséquent, l'évaluation précoce de ces propriétés lors de la découverte d'un médicament pourrait permettre d'économiser du temps et de l'argent (Wang et Skolnik, 2009).

Actuellement, l'évaluation assistée par ordinateur (prédiction *in silico*) d'ADME-Tox a gagné en popularité pour atténuer ces préoccupations. Il est important de noter que les modèles informatiques fournissent rapidement des données prévisionnelles et fiables et complètent ainsi les approches expérimentales. Ces modèles informatiques prédisent les propriétés pharmacocinétiques, physico-chimiques et médicinales de petites molécules et facilitent la sélection de médicaments candidats par les sociétés pharmaceutiques avant des essais cliniques coûteux (Van de Waterbeemd et Gifford, 2003 ; De la Nuez et Rodríguez, 2008).

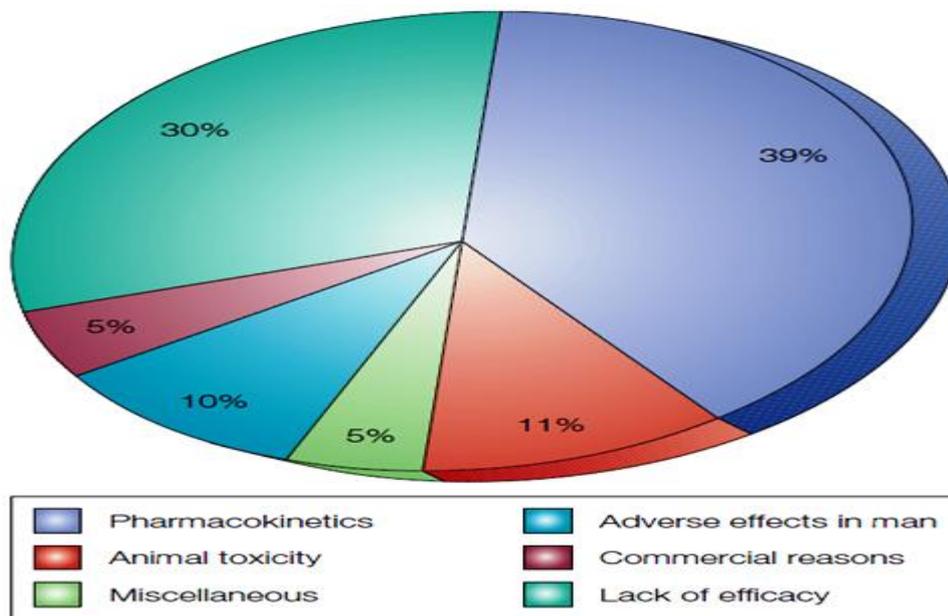


Figure IV.8. Les principales raisons de l'échec dans le développement de médicaments. La moitié de tous les échecs étaient attribués à une pharmacocinétique médiocre (39%) et à une toxicité animale (11%). De telles analyses indiquent clairement que ces deux domaines doivent être ciblés le plus tôt possible dans le processus de découverte de médicaments (Van de Waterbeemd et Gifford, 2003).

Il existe maintenant des outils Web disponibles gratuits donnant accès à ces modèles prédictifs, parmi eux :

- **SwissADME** (<http://www.swissadme.ch>): est un serveur en ligne géré par l'Institut suisse de bioinformatique (SIB), qui fournit des services et des ressources en bioinformatique aux scientifiques. SwissADME fournit notamment une plate-forme pour évaluer la règle de cinq de *Lipinski* sur la biodisponibilité orale des médicaments. Ainsi que de prédire les propriétés pharmacocinétiques et les propriétés druglike des candidats-médicaments et des petites molécules (Daina et *al.*, 2017).
- **PreADMET** (<https://preadmet.bmdrc.kr/>): est une application Web permettant de prédire les données ADME-Tox et de créer une bibliothèque de type médicament à l'aide de la méthode *in silico*. PreADMET permet un accès à plusieurs modèles pour prédire:
 - Les propriétés physicochimiques (Druglikeness),
 - Quelques comportements pharmacocinétiques,
 - La toxicité des composés.

II.5.1. Propriétés pharmacocinétiques

- **Absorption**

L'absorption est le processus par lequel le médicament passe de son site d'administration à la circulation générale. Un médicament doit traverser plusieurs membranes cellulaires avant d'atteindre la circulation sanguine. Les membranes cellulaires sont des barrières biologiques qui interdisent sélectivement le passage des molécules. Les médicaments peuvent traverser les membranes cellulaires par:

- Diffusion passive,
- Transport actif,
- Endocytose.

L'absorption gastro-intestinale (GI) est un modèle pour prédire *in silico* l'absorption des candidats-médicaments.

- **Distribution**

La pénétration de la barrière hémato-encéphalique est utilisée pour prédire la distribution des candidats-médicaments. Les composés actifs du système nerveux central (SNC) sont les seules substances qui doivent traverser cette barrière. Il est donc crucial de prévoir si les composés traversent la barrière hémato-encéphalique dans le domaine pharmaceutique afin d'éviter les effets secondaires du SNC sur le cerveau (Van de Waterbeemd et Gifford, 2003).

- **Métabolisme**

Une voie typique du métabolisme du médicament est l'oxydation du médicament (oxydation de phase I). Les enzymes clés pour l'oxydation de phase I sont les isoformes de la famille du cytochrome P450 (CYP). Les principaux isoformes du CYP humain impliqués dans le métabolisme du médicament sont le CYP1A2, le CYP2A6, le CYP2C9, le CYP2C19, le CYP2D6, le CYP2E1 et le CYP3A4 (figure IV.9), responsables à environ 80% des réactions connues du métabolisme des médicaments (De la Nuez et Rodríguez, 2008).

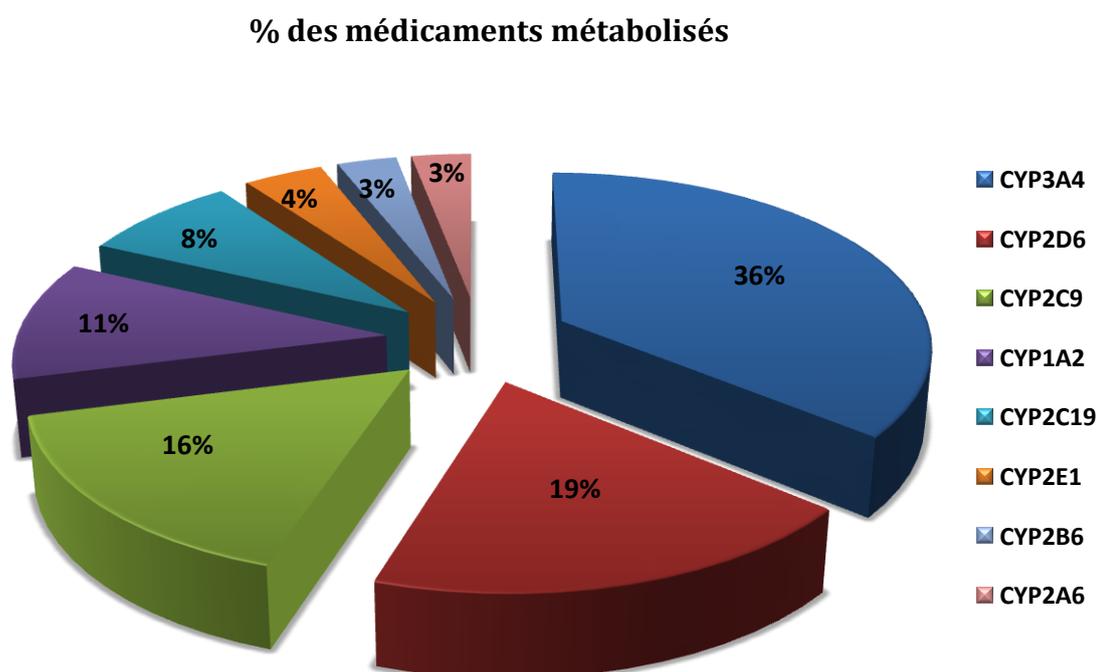


Figure IV.9. Répartition des médicaments métabolisés par les différentes isoenzymes de CYP450 (Loichot et Grima, 2004).

- **Excrétion**

Le fonctionnement normal du foie et des reins est responsable de l'élimination complète d'un médicament de l'organisme.

II.5.2. Évaluation toxicologique par approche *in silico*

La toxicité d'un candidat-médicament est l'un des paramètres les plus redoutés par les développeurs dans le domaine pharmaceutique, surtout lorsqu'il entre en phases cliniques. En effet, un candidat-médicament présentant des effets secondaires graves lors des phases cliniques est immédiatement abandonné. Il est donc très important de tenter de prédire la toxicité d'un composé à partir de sa structure lors des phases précoces de développement de médicaments. La toxicité peut être classifiée selon l'organe affecté (hépatotoxicité, néphrotoxicité, cardiotoxicité,...etc.) ou selon le mécanisme de toxicité (généotoxicité, mutagénicité, carcinogénicité,...etc.). De nombreuses méthodes *in silico* ont donc été mises en place pour tenter de prédire la toxicité des composés, c'est ce qu'on appelle la toxicologie *in silico* ou toxicologie computationnelle (Lagarde, 2014). L'outil PreADMET prédit la mutagénicité et la cancérogénicité des composés. Il effectue plusieurs tests qui sont :

- **Mutagénicité par le test d'Ames**

Le test d'Ames est un test mené en laboratoire visant à déterminer le pouvoir mutagène d'une substance, c'est-à-dire sa capacité à modifier l'ADN des êtres vivants. Un test positif indique que le produit chimique est un agent potentiellement cancérogène. Ce test est rapide, pratique et peu coûteux (Goujon, 2015). Pour ce faire, on utilise des souches bactériennes (*Salmonella typhimurium*) possédant au préalable des mutations ne leur permettant plus de synthétiser un certain acide aminé, l'histidine, essentiel à leur multiplication (auxotrophique pour l'histidine). Il suffit de mettre la substance que l'on souhaite tester en contact avec les différentes souches bactériennes. De nouvelles mutations peuvent alors intervenir et restaurer la fonction du gène préalablement muté. Ainsi la bactérie peut à nouveau synthétiser l'histidine. Ces bactéries sont alors capables de se développer dans un milieu dépourvu d'histidine suite aux mutations perpétrées par la substance testée. Dans ce cas la bactérie redevient prototrophe et la molécule testée est alors considérée comme mutagène (figure IV.10).

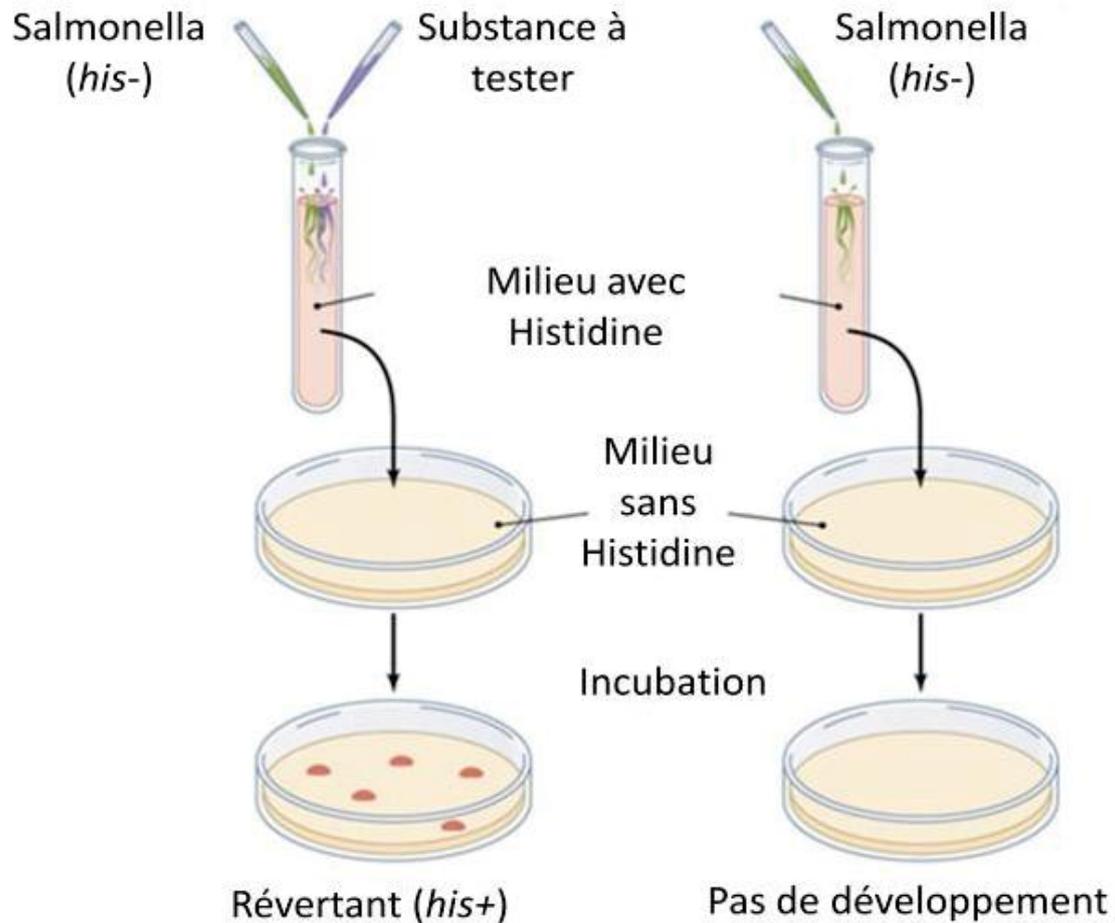


Figure IV.10. Déroulement d'un test d'Ames (Goujon, 2015).

- **Étude du pouvoir cancérogène**

La cancérogénicité est une toxicité qui cause le cancer dans le corps. En règle générale, les tests de cancérogénicité nécessitent une longue période de temps (généralement 2 ans); actuellement, seules les méthodes de test *in vivo* sont établies. Habituellement, le test utilise des souris ou des rats, en les exposants à un composé. Et la variable à observer est l'existence d'un cancer. PreADMET prédit le résultat de son modèle, construit à partir des données du NTP (National Toxicology Program) et de l'US FDA (U.S. Food and Drug Administration), qui sont les résultats des tests de cancérogénicité *in vivo* menés sur des souris et des rats pendant 2 ans.

- **Inhibition de hERG**

hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene) est un canal potassique voltage-dépendant, c'est-à-dire une protéine jouant le rôle de canal ionique. Le blocage des canaux potassiques

chez le gène humain lié à l'éther-a-go-go (hERG) est devenu une préoccupation croissante pour les organismes de réglementation et les industries pharmaceutiques qui investissent des efforts considérables dans l'évaluation de la toxicité cardiaque des médicaments. Les outils *in silico* permettant de filtrer les inhibiteurs potentiels du canal hERG aux premiers stades du processus de découverte de médicaments ont un potentiel considérable en termes d'économie de temps et de l'argent (De la Nuez et Rodríguez, 2008).

- **Toxicité aigue**

Ce test est fait sur différents organismes aquatiques tels que les algues, les crustacés (daphnia) et les poissons (medaka et minnow).

Matériel et méthodes d'étude *in vitro*

Nous avons sélectionné les neuf composés ayant les meilleurs scores pour les tests *in vitro*. Cet ensemble final a été acheté sous forme d'une poudre auprès de mcule.com Kft. (Budapest, Hungary), 10 mg pour chacune et ensuite dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Il se présente comme un liquide incolore, qui dissout à la fois des composés polaires et non-polaires, et qui est miscible dans une large gamme de solvants organiques, ainsi que dans l'eau. La toxicité générale du DMSO est négligeable, les effets décrits ont toujours été obtenus lors d'administrations de quantités importantes de cette substance (Novak, 2002).

Les codes des composés achetés étaient les suivants: ZINC31308822, ZINC15880082, ZINC04139358, ZINC01396580, ZINC05515132, ZINC04785369, ZINC72280453, ZINC03307916, ZINC15085593 et ZINC00443079.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles substances antibactériennes, nous avons testé ces molécules contre quatre souches bactériennes pathogènes: deux à Gram-positif (*Mycobacterium smegmatis* et *Staphylococcus aureus*) et deux à Gram-négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). L'activité antibactérienne a été évaluée, *in vitro*, par deux méthodes: la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier wattman pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition et la méthode des microdilutions qui a pour objectif la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

III. Les souches microbiennes testées

Les souches utilisées dans notre étude pour déceler l'activité antimicrobienne des inhibiteurs de la MetAP font partie de deux groupes des microorganismes, qui sont des bactéries à Gram⁻ et Gram⁺ (tableau IV.3).

Tableau IV.3. Souches bactériennes étudiées.

Bactérie	Gram	Type	Laboratoire
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	DSMZ30083	Laboratoire UMR-MD1 Transporteurs membranaires, chimiorésistance et drug-design, université de Marseille-France.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC27853	Laboratoire de Microbiologie, centre universitaire Abdehafid Boussouf-Mila.
<i>Staphylococcus aureus</i>	positif	DSMZ20231	Laboratoire UMR-MD1 Transporteurs membranaires, chimiorésistance et drug-design, université de Marseille-France.
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	positif	ATCC25923	Laboratoire de Chimie et Biochimie de Molécules Bioactives, université de Strasbourg-France.

IV. Tests d'activité antimicrobienne

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de tester la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (Genné et Siegrist, 2003 ; Burnichon et Texier, 2003).

II.1. Méthode de diffusion à partir d'un disque sur milieu solide

Ces méthodes sont considérées comme les plus simples d'utilisation (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie : CA-SFM, 2017). Elles reposent sur la diffusion d'un antibiotique à la surface d'un milieu de culture gélosé. La gélose appropriée est coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre et inoculée avec une suspension bactérienne pure fraîchement préparée. Cette méthode consiste à ensemercer uniformément et complètement la surface de gélose par la souche à étudier. La suspension bactérienne, doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625nm (CA-SFM, 2017). Des disques pré-imprégnés d'une dose connue des composés testés sont déposés à la surface de la gélose ; en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. On a utilisé un antibiotique comme témoin positif. Quatre boîtes sont utilisées pour chaque souche bactérienne. L'ensemble est incubé pendant 24 à 48 heures à 30-37°C ; en position inversée (couvercle en bas) pour empêcher l'eau de condensation du couvercle de couler sur le milieu gélosé. Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont présentés dans l'annexe 1.

II.1.1. Préparation des disques

Le disque ne doit modifier ni la croissance bactérienne, ni l'action de l'antibiotique. Son épaisseur doit être suffisante pour assurer une rigidité et permettre l'absorption d'un volume suffisant de solution d'antibiotique. De ce fait, les disques sont préparés à partir de papier wattman N3 de 6 mm de diamètre, ensuite ils sont mis dans un tube à essai et stérilisés à l'autoclave 10 minutes à 120°C.

II.1.2. Préparation de pré cultures

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive et incubées dans une étuve pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir une culture bactérienne et des colonies isolées.

II.1.3. Préparation des suspensions bactériennes

A l'aide d'une pipette pasteur, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et ont été prélevées et mises dans 3 ml de bouillon nutritif. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et laissée sur la paillasse pendant 30 minutes. Chaque jour on fait le repiquage

de la bactérie avec incubation de 6 heures dans l'étuve à 30°C pour favoriser l'oxygénation du milieu.

II.1.4. Lecture

Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (passant par le milieu du disque) à l'aide d'une règle en mm. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible.

II.2. Réalisation de l'antibiogramme

II.2.1. *E. coli*

Les boîtes de pétri ont étéensemencées à partir de 150 µL d'une suspension bactérienne en phase logarithmique de croissance (0.5 Mac Farland correspondant à 10⁶ UFC/mL) conformément aux recommandations de la CA-SFM pour obtenir un tapis bactérien. Sur chaque disque sont appliqués 8 µL de solution des composés à tester. Nous avons utilisé le ciprofloxacine 5µg/disque (lot 0000281253) comme témoin positif. Les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C jusqu'au lendemain. Enfin, elles seront examinées à l'œil nu pour la détermination avec précision des diamètres des zones d'inhibition et photographiées.

II.2.2. *Mycobacterium smegmatis*

Les tests sont réalisés comme pour *E. coli*. Pour les molécules à tester, un volume de 8 µl est déposé sur chaque disque. L'isoniazide (6 µl d'une solution à 5mM) agent antibactérien a été utilisé comme composé de référence pour un test positif d'inhibition de la croissance de *M. smegmatis* (Ponaire et al., 2012). Après une période d'incubation de 48 heures à 30°C. A l'aide d'une règle, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques sont mesurés deux fois.

II.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

20 ml du milieu Mueller Hinton (MH) et Agar est coulé dans des boîtes de Pétri. Après le refroidissement et solidification du milieu de culture sur la paillasse, 150µl de suspension bactérienne à tester sont étalés en surface de gélose pour chaque boîte. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques de papier wattman imprégnés avec 5µl

de composé à tester sont déposés sur la gélose. On utilisera 4 boîtes de pétri pour les 9 composés plus le témoin positif (Ciprofloxacine 5µg/disque ; lot 0000281253). Les boîtes sont ensuite fermées et incubées à température de 37°C pendant 24 heures.

II.2.4. *Staphylococcus aureus*

L'antibiogramme est réalisé comme pour *Pseudomonas aeruginosa* le témoin positif est le ciprofloxacine (lot 0000281253) (5µg/disque). Pour les composés à tester, un volume de 5 µl est déposé sur chaque disque. La lecture était alors possible après une incubation de 24 heures à 37 °C.

II.2.5. Molécule de référence : Antibiotique

Les antibiotiques utilisés comme témoin positif se retrouvent dans le tableau IV.4 suivant :

Tableau IV.4. Les antibiotiques de référence.

Antibiotique	Fonction	Référence
Ciprofloxacine	Inhibition de l'ADN gyrase bactérienne, une enzyme de la famille des topoisomérases, nécessaire à la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN bactérien	Yves et <i>al.</i> , 2010
Isoniazide	Inhibant la biosynthèse des acides mycoliques, qui sont un composant essentiel de la paroi cellulaire mycobactérienne	Tripathi et <i>al.</i> , 2005; Palomino et <i>al.</i> , 2007;

II.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de micro dilution en milieu liquide

La CMI est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotiques de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible (CA-SFM, 2017).

II.3.1. Décongélation des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont conservées à une température de -80°C . Elles ont été récupérées dans un bloc froid pour limiter la décongélation. Ensuite, elles ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 heures.

II.3.2. Préparation du pré inoculum (milieu liquide)

Après ce temps d'incubation, une colonie bactérienne bien isolée et parfaitement identique est prélevée à l'aide d'une anse, puis émulsionnée dans un tube contenant 3mL de bouillon Mueller Hinton II Broth (MHII) pour *E. coli* et de bouillon Tryptic Soy Agar (TSA) pour *S. aureus*, puis agitée et incubée à 37°C pendant 18h à 24h sous agitation à 160 rotations par minute.

II.3.3. Préparation de l'inoculum

L'inoculum ainsi réalisé est dilué dans le bouillon MH II pour *E. coli* et dans le bouillon TSA pour *S. aureus* (dilution $1/100^{\text{ième}}$ c.-à-d $3\text{ mL} \rightarrow 3000\mu\text{L}/100 = 30\mu\text{L}$). En effet, $30\mu\text{L}$ de la suspension bactérienne sont versés dans un nouveau tube de 3 mL de bouillon nutritif. Une incubation de 2 à 4 heures à 37°C était nécessaire. De plus, la densité de l'inoculum a été ajustée à 0,5-0,7. Cette dilution nous a permis d'avoir une suspension bactérienne en bouillon ayant un $\text{DO}_{600\text{nm}}$ équivalente à 10^6 bactéries/ mL.

- Réalisation d'un dénombrement de la souche bactérienne pour connaître l'équivalence entre la concentration bactérienne et la mesure de $\text{DO}_{600\text{nm}}$
- Par défaut, $1\text{UDO}_{600\text{nm}}$ équivaut à 10^9 bactéries/mL.
- Pour une microplaque d'une même souche bactérienne, 15 mL de suspension à 10^6 bactéries/mL sont nécessaires.

II.3.4. Préparation des solutions d'antibiotique

Nous avons utilisé un antibiotique (ATB) sous forme de poudre injectable d'un flacon de 1g ou de 5g. Les concentrations des solutions d'ATB préparées sont indiquées dans le tableau IV.5 suivant. Ces solutions peuvent être conservées à -20°C pendant une semaine, au bout de laquelle elles doivent être renouvelées.

Tableau IV.5. L'antibiotique de référence.

Antibiotique	Fonction	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		Référence
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
Erythromycine (Macrolide)	Inhibant la synthèse des protéines bactériennes	512	64	Archambaud, 2009

II.3.5. Technique de micro dilution en milieu liquide

L'examen standard pour évaluer l'activité antibactérienne *in vitro* est donc de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Vogelman et Craig, 1986). La CMI est déterminée en utilisant la technique de micro dilution avec le bouillon nutritif. Le bouillon nutritif pour *E coli* est le bouillon Mueller Hinton II Broth (MHII) par contre pour *S. aureus* c'est le bouillon Tryptic Soy Agar (TSA).

a. Préparation des composés testés

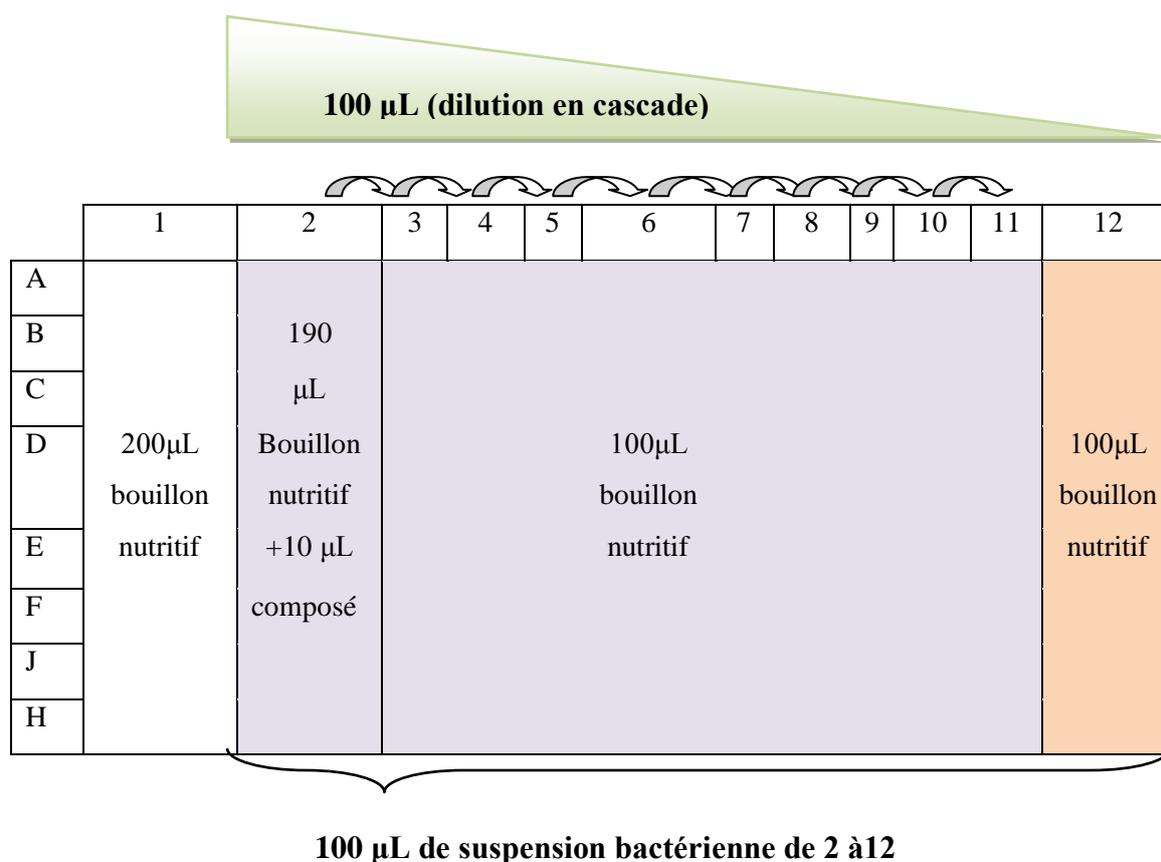
Les molécules achetées sont sous forme de poudre, donc il faut les solubiliser. D'après le fournisseur le meilleur solvant est le DMSO (Dimethyl sulfoxide). La gamme de concentration choisie est de 1024 à 4 $\mu\text{g/mL}$. La solution initiale est préparée à 40X dans le DMSO ; c.-à-d. $1024 \times 40 = 40960 \text{ mg/L} = 40960 \mu\text{g/mL} = 40.96 \text{ mg/mL}$

b. Préparation d'une microplaque

La microplaque à fond en U comporte 96 puits, repartis en 8 rangées de 12 colonnes (tableau IV.6). Dans la première colonne de chaque microplaque, nous avons déposé 200 μL de bouillon nutritif, elle a servi à contrôler une éventuelle contamination du milieu de culture (témoin négatif). La deuxième colonne comportant 190 μL de bouillon, elle a servi pour le dépôt de 10 μL de composé à tester à 40X. La dernière colonne est le témoin positif. Ensuite on a réalisé une gamme de dilution en cascade (dilutions sérielles au $\frac{1}{2}$) en prélevant cent microlitres (100 μL) dans la colonne 2 à l'aide d'une pipette automatique et en le déposant dans la colonne 3. Et ainsi de suite jusqu'à la colonne 11 ; puis à ce mélange, 100 μL de l'inoculum ou suspension bactérienne ajusté à 5.10^5 UFC/ml (concentration finale) ont été ajoutés de la colonne 2 à 12. Le volume final (milieu de culture, inoculum et composé testé) de tous les puits a été de 200 μL . Les concentrations finales de la gamme de dilution ainsi

généralisées sont comprises entre 1024 à 4 µg/mL. Un antibiotique approprié est utilisé comme témoin positif. La plaque est ensuite recouverte puis incubée à 37°C. La CMI du composé a été déterminée après 18 à 24h d'incubation dans une étuve à partir du premier puits dépourvu de croissance bactérienne. L'inhibition de croissance se traduit par un éclaircissement de la couleur du milieu. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes de trois déterminations indépendantes.

Tableau IV.6. Préparation d'une microplaque 96 puits.



	Témoin négatif (bouillon nutritif)
	Gradient d'antibiotique (composé testé)
	Témoin positif (bouillon nutritif + suspension bactérienne)

c. Lecture de la plaque

- **A l'œil nu** : On peut remarquer directement la formation ou non d'un trouble bactérien dans chaque puits de la plaque ;

- **Coloration de la plaque avec le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) :** Comme indicateur de la croissance des microorganismes, 50 μ L de chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT, 0,2 mg/mL) ont été ajoutés aux puits pour faciliter la lecture de la plaque, qui sont ensuite incubés à une température de laboratoire pendant 30 min jusqu'à une heure. L'INT permet de détecter les bactéries vivantes grâce à leur activité déshydrogénase. En effet, l'INT, incolore, est transformée en formazan d'INT de couleur rouge par les organismes vivants. L'inhibition de la croissance bactérienne est révélée par la présence de zones claires ou des puits incolores après incubation avec l'INT.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSION

V. Tests de fiabilité du programme de docking

Avant de cribler virtuellement la base de données chimiques Zinc, dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs de la méthionine aminopeptidase bactérienne par la méthode de docking, nous avons testé la capacité du logiciel FlexX à reproduire des complexes expérimentaux.

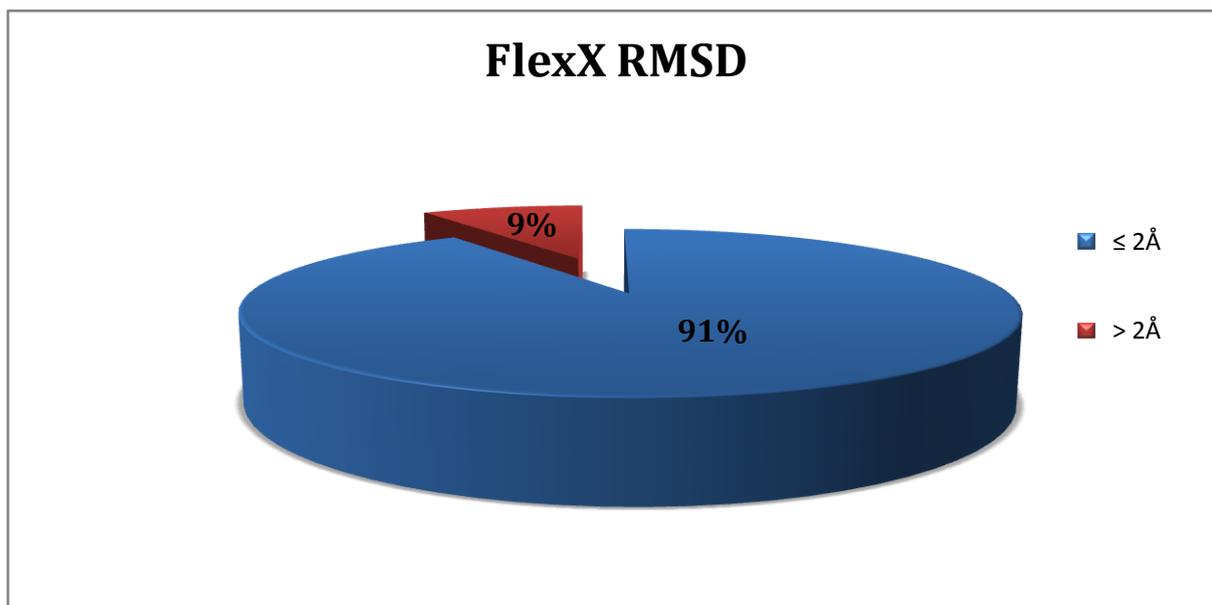
La performance de ce programme est jugée au moyen de quatre critères :

- Ecart quadratique moyen ou le RMSD,
- Analyse visuelle,
- Le coefficient de corrélation (r),
- Enrichissement d'une chimiothèque.

I.1. La précision du positionnement des composés (RMSD)

La manière dont les ligands sont arrimés dans le site actif peut être généralement décrite numériquement par le RMSD entre le ligand co-cristallisé et la molécule dockée. Le test de fiabilité du programme FlexX par le RMSD a été réalisé sur 200 complexes protéine-ligand tirés de façon aléatoire de la PDB. Une prédiction d'un mode de liaison est considérée réussie si le RMSD est au dessous d'une certaine valeur (généralement 2,0 Å) (Verdonk *et al.*, 2003). Les codes PDB des complexes et de leurs inhibiteurs ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenus avec FlexX sont mentionnés dans l'annexe 2.

Le graphe V.1 montre les résultats obtenus lors l'évaluation de FlexX pour sa capacité de prédire le mode d'interaction d'un ligand dans le site actif de l'enzyme. Les résultats sont donnés en pourcent (%), à deux intervalles de RMSD représentés par deux couleurs.



Graphe V.1. Résultats en pourcentage du test RMSD à deux intervalles.

Il apparaît clairement sur ce graphique que le programme FlexX est suffisamment performant puisqu'il reproduit bien les résultats expérimentaux. Effectivement, 91% des valeurs de la déviation quadratique moyenne ou RMSD du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal sont inférieures ou égales à 2 Å et que seulement 09 % des résultats sont supérieurs à 2 Å.

Notre résultat confirme ceux obtenus par Chikhi A, (2007) où le programme FlexX a été testé avec deux autres programmes surflex-dock et ArgusLab, il a montré une capacité élevée à reproduire les tests expérimentaux avec 80,6 % de valeurs de RMSD inférieures ou égales à 2 Å. Ce résultat est comparable aussi à ceux rapportés par Hioual et *al.*, (2014) et Merzoug, (2018) ; où la fiabilité de logiciel FlexX a été examinée ; il a montré une performance pour reproduire les tests expérimentaux, avec 60.78% des valeurs de RMSD inférieures ou égales à 2Å pour le premier et 91% pour le second.

Pour confirmer les résultats de ce test, une analyse visuelle de la superposition des géométries des ligands a été réalisée.

I.2. La superposition des géométries du ligand

L'analyse visuelle faisant suite au test RMSD est aussi une étape utile pour juger la performance du logiciel FlexX. Elle permet de visualiser les résultats décrits par la valeur numérique RMSD.

Pour les quatre complexes MetAP-inhibiteur choisis, l'analyse visuelle par FlexX montre que les modèles des inhibiteurs simulés par le logiciel sont correctement placés dans le site actif de la méthionine aminopeptidase. Ils présentent des conformations spatiales assez proches voir même superposables à celles déterminées expérimentalement qu'on retrouve dans la PDB (colorés en vert) en concordance avec les valeurs de RMSD. Ce qui indique que les poses calculées par FlexX sont reproductibles. Les résultats sont présentés dans le tableau V.1 et les figures V.1, V.2 et V.3.

Tableau V.1. Valeurs de RMSD des quatre complexes de la MetAP étudiés.

Code PDB	Code de ligands	nRotB	RMSD (Å)
1XNZ	FCD	2	0.90
1QXY	M2C	5	1.28
3PKA	Y02	11	3.52
4FO8	MET	4	1.98

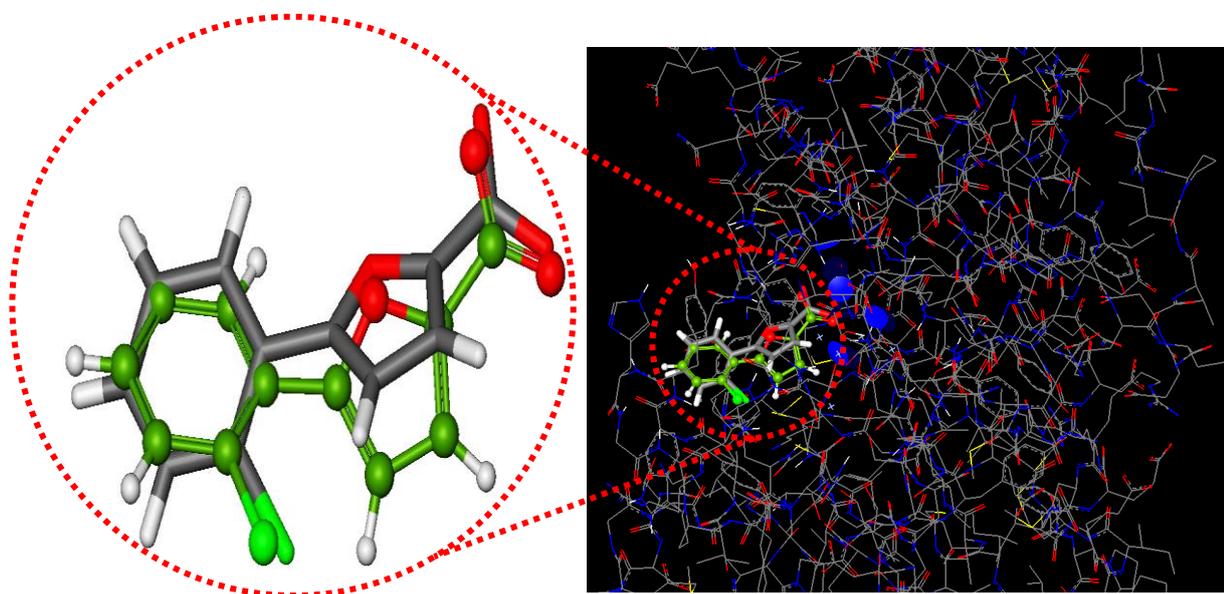


Figure V.1. Superposition spatiale entre la pose du ligand FCD donné par rayon-X (coloré en vert) et celle calculée par FlexX.

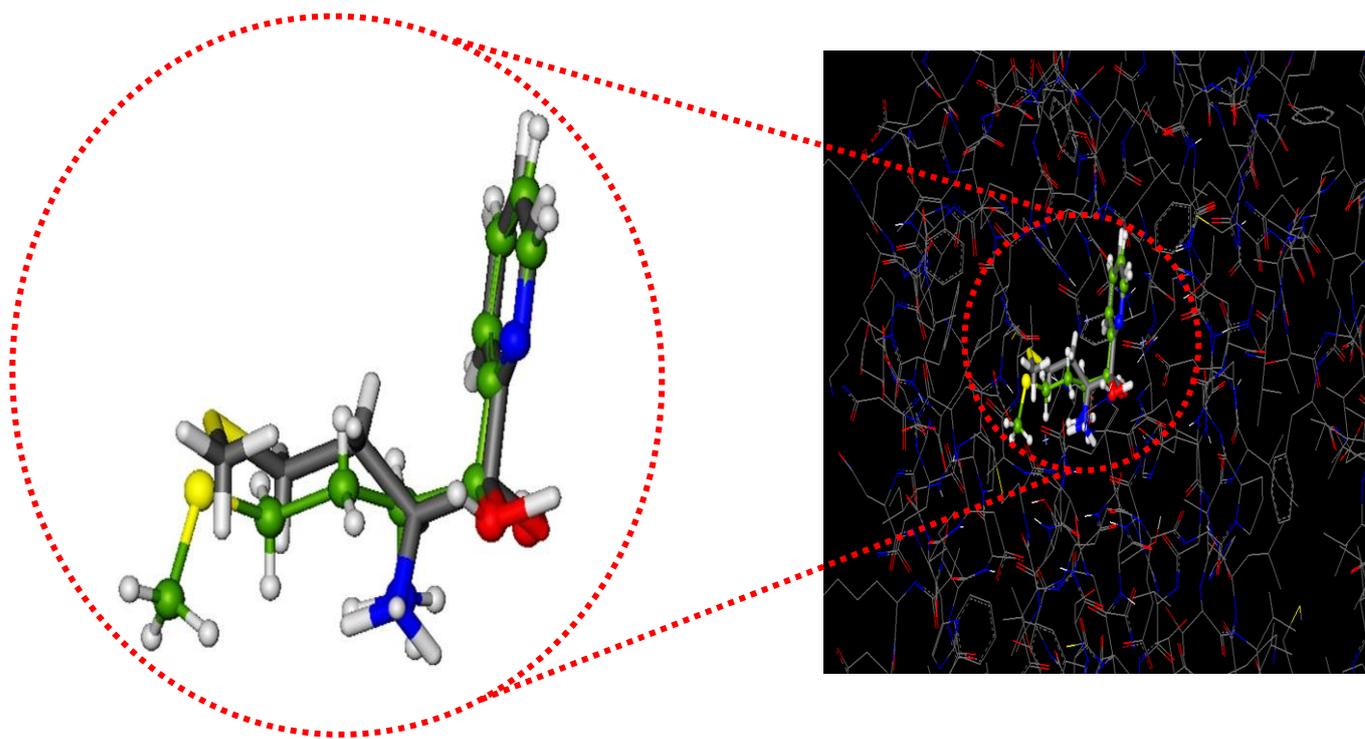


Figure V.2. Superposition du ligand M2C donné par rayon-X (coloré en vert) et celle dockée par FlexX.

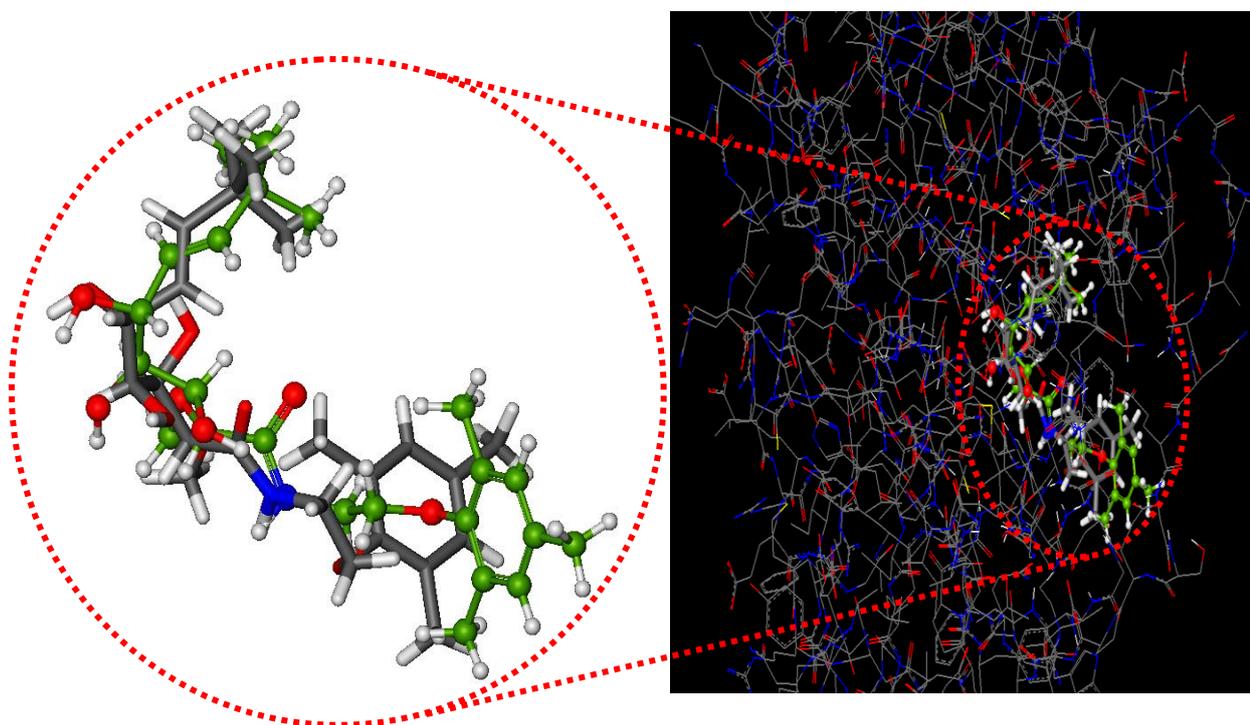


Figure V.3. Superposition du ligand Y02 donné par rayon-X (coloré en vert) et celle dockée par FlexX.

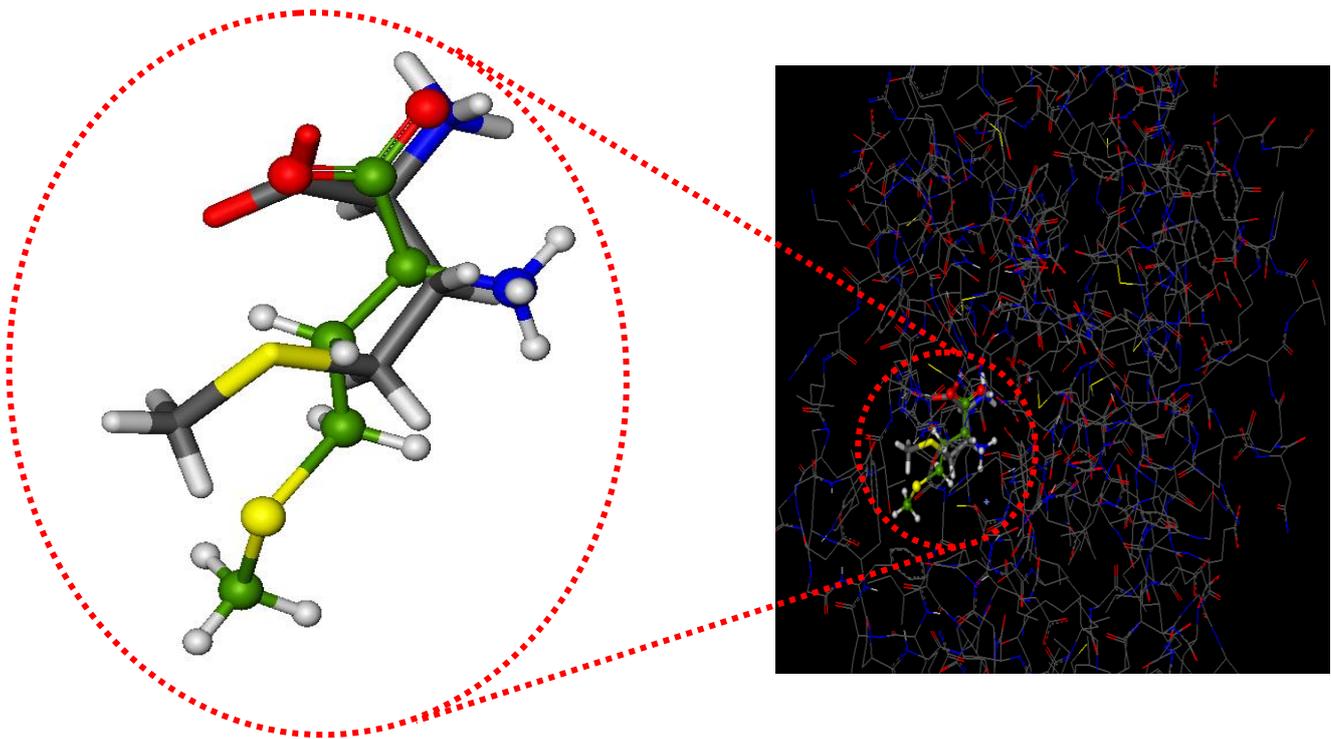


Figure V.4. Comparaison de la conformation expérimentale du ligand Met (coloré en vert) et sa conformation optimale simulée par FlexX.

Afin d'expliquer cette différence de résultats, nous avons tenté de prendre en compte un facteur pouvant être potentiellement influant sur les valeurs de RMSD. Il s'agit du nombre de liaisons rotatives (nRotB) du ligand (tableau V.1).

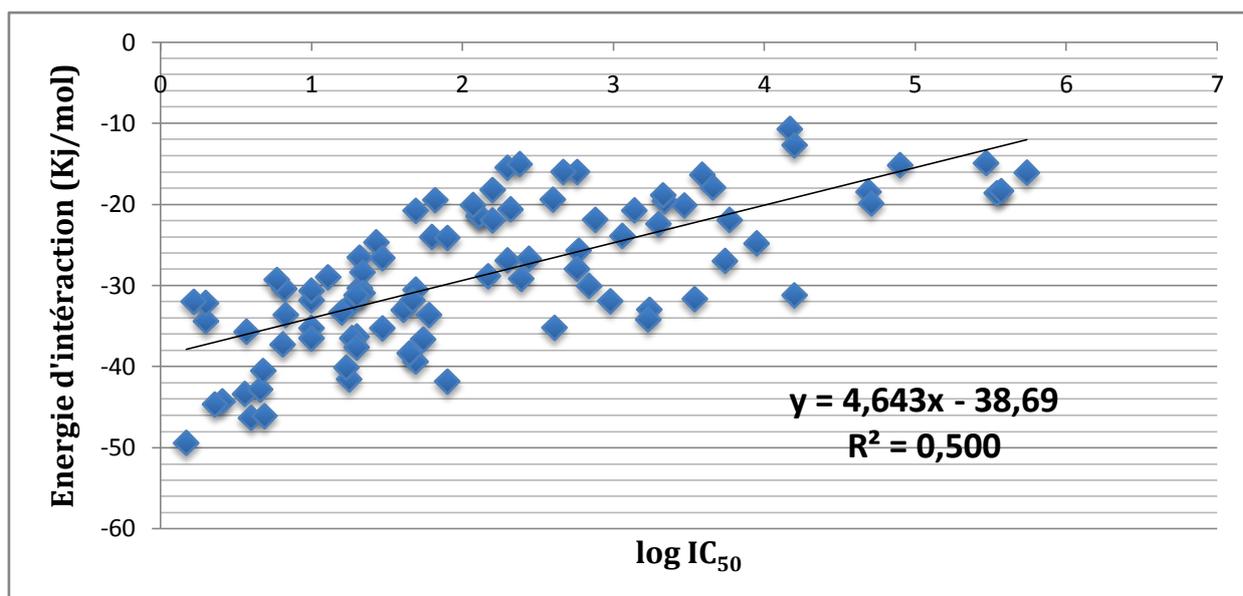
Le nombre élevé des liaisons rotatives présentes dans le ligand est probablement la raison pour laquelle il donne un mauvais RMSD (Jocley et *al.*, 2011). En effet, un nombre élevé de liaisons simples ou liaisons sigma pouvant tourner librement est défavorable à l'interaction avec l'enzyme car il génère un très grand nombre de conformations. Lorsque le nombre de liaisons simples croît, le nombre théoriquement envisageable de conformations pour une molécule augmente. Une recherche conformationnelle exhaustive est donc impossible (Boucherit, 2012).

I.3. Coefficient de corrélation linéaire (r)

Afin de tester une nouvelle fois la performance du programme FlexX nous avons essayé d'étudier la corrélation qui peut exister entre le score du docking (ΔG) et l'activité biologique (IC_{50}) de divers complexes, en calculant le coefficient de corrélation linéaire, et en traçant la droite de régression linéaire entre les deux paramètres.

Dans cette étude, différents complexes protéine-inhibiteur proviennent de la PDB ont été examinés. Au total, 92 complexes ont été testés par FlexX. Le score de docking des inhibiteurs étudiés ainsi que leur IC₅₀ sont représentés dans l'annexe 3.

L'analyse par régression linéaire a permis d'obtenir la courbe de corrélation suivante (graphe V.2).



Graphe V. 2. Corrélation entre les énergies d'interaction des différents inhibiteurs données par FlexX et leur activité biologique (log IC₅₀).

Le graphe V.2 montre que le programme FlexX établit une relation linéaire positive avec $r = 0,70$ entre le score de docking (ΔG) et l'activité biologique représentée ici par log IC₅₀. Il y a donc corrélation significative entre les deux paramètres analysés. Ceci est également cohérent avec les résultats obtenus par Chikhi et Bensegueni, (2010). En effet, de bonnes corrélations entre les valeurs IC₅₀ et deltaG de PDFs bactériennes (PDF1B et PDF2) et la PDF des plantes (AtPDF1B) ont été observées, avec $r = 0,83$, $r = 0,90$ et $r = 0,84$ respectivement.

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Merzoug, (2018) où la corrélation entre l'activité expérimentale (log IC₅₀) et les valeurs d'énergies d'interaction de divers inhibiteurs du peptide déformylase (PDF) estimées par FlexX était égale à 0,81.

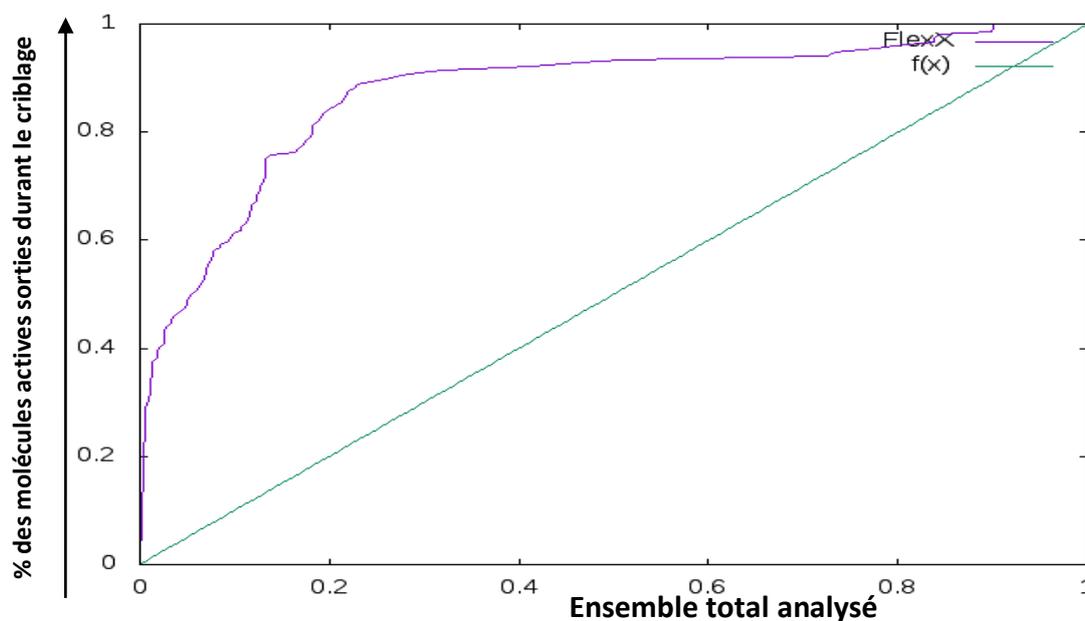
Notre résultat confirme aussi les résultats obtenus par Chakraborti et Ramasamy, (2003) qui utilisent le logiciel FlexX pour faire le docking moléculaire d'un ensemble de quatre-

vingt-deux inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (COX-2). Cette étude montre une bonne corrélation entre le score de FlexX (F-score) et l'activité inhibitrice de la COX-2 (pIC_{50}). L'analyse par régression linéaire a fourni les valeurs de coefficient de corrélation de 0,731 et 0,670 pour deux classes d'inhibiteurs de la COX-2. Ceci est également cohérent avec les résultats obtenus par Xu et al, (2015) où huit programmes de docking ont été étudiés (Autodock Vina, Fitted, FlexX, Fred, Glide, GOLD, LibDock et MolDock), pour une évaluation comparative. FlexX a produit une bonne corrélation ($r = 0,75$) entre le score de docking et l'activité biologique déterminée expérimentalement.

I.4. Evaluation de la capacité de FlexX à discriminer les actifs des inactifs

Cette évaluation consiste à tester la capacité d'un programme de criblage *in silico* à discriminer, pour une cible particulière, les composés actifs des composés inactifs.

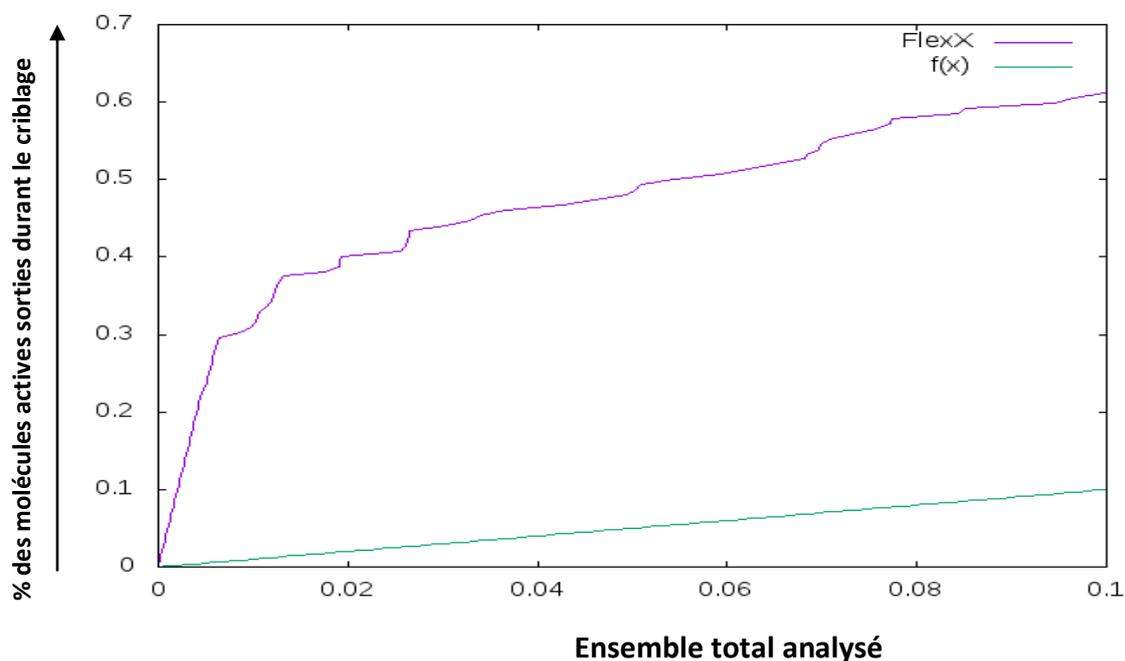
Après avoir criblé virtuellement 7884 composés provenant de la base de données DUD-E envers la cible thérapeutique TRYB1 ; il est possible de préparer un fichier texte contenant le classement des molécules en fonction de leur score (annexe 4). Grâce à ce fichier, nous pouvons tester la fiabilité du programme FlexX via la courbe d'enrichissement (graphe V.3).



Graphe V.3. Courbe d'enrichissement représentant 7884 molécules pour la cible thérapeutique TRYB1

Visuellement, l'allure de la courbe obtenue suite au criblage virtuel (colorée en violet) est hyperbolique au dessus du *random* ($f(x)=x$) (coloré en vert). Ce signifie que le programme FlexX est capable de distinguer les molécules actives vis-à-vis des autres molécules de la chimiothèques en les sortant dans les premières portions du classement. Ce résultat est comparable à celui rapporté par Arrault, (2007) qui utilise la fonction de scoring FlexXscore pour prédire l'affinité de molécules pour la cible cyclooxygenase-2 (code : 1CX2). Cette étude montre que l'allure de la courbe d'accumulation présente un bon classement des composés actifs dans les premiers pourcentages de l'ensemble total analysés. Malgré tout, l'aire entre le cas idéal et le modèle 1CX2 reste assez importante. De plus, une inflexion de la courbe d'enrichissement s'étendant de 75 à 100% laisse imaginer qu'une ou plusieurs famille(s) de molécules actives sont prédites de manière incorrecte par le modèle.

Le graphe suivant montre que parmi les 10 % premières molécules sorties du criblage total envers la cible thérapeutique TRYB1, le programme FlexX est capable de sortir environ 62 % des molécules actives.



Graph V.4. Courbe d'enrichissement représentant 10% de la chimiothèque totale

Cette étude confirme une fois de plus que le logiciel de docking FlexX fonctionne correctement. Donc, nous pouvons l'utiliser pour cribler virtuellement la chimiothèque ZINC dans le but d'identifier des nouveaux inhibiteurs de la cible enzymatique méthionine aminopeptidase (MetAP) bactérienne.

VI. Etude des interactions intervenant dans l'inhibition de la MetAP bactérienne par diverses molécules provenant de la PDB

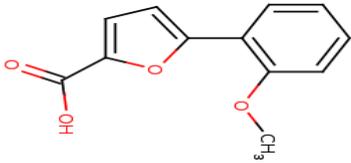
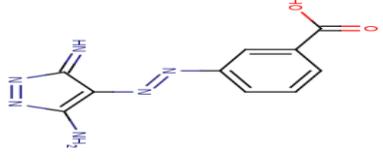
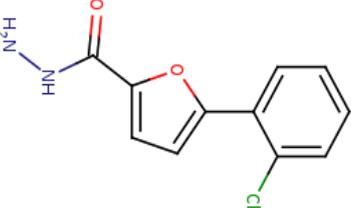
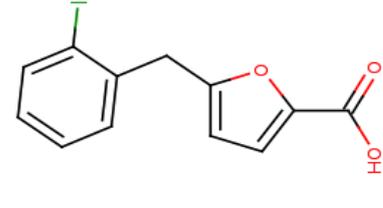
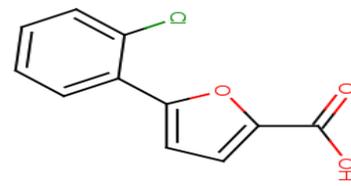
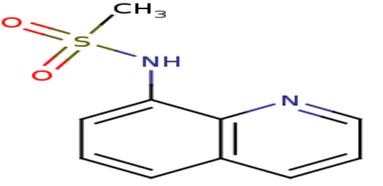
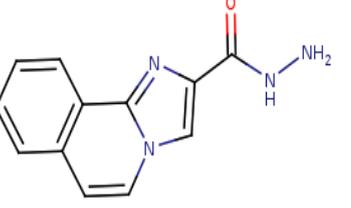
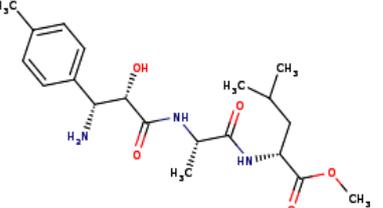
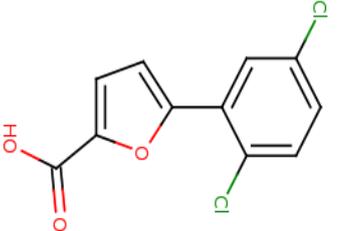
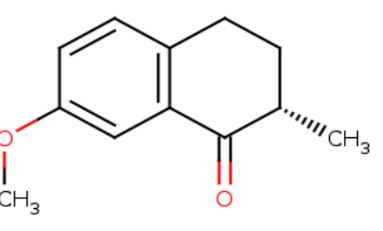
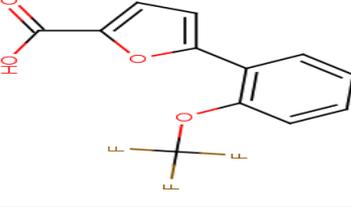
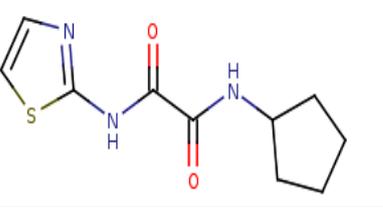
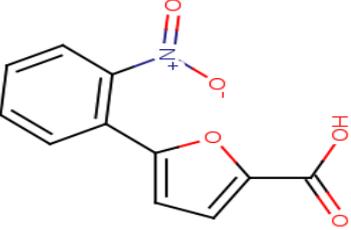
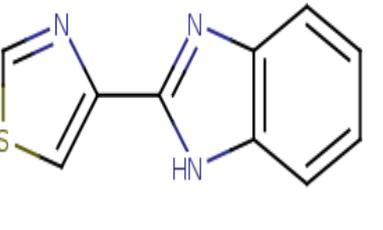
La première tâche pour développer de petits candidats médicaments contre une maladie donnée consiste à évaluer les différentes voies métaboliques et à sélectionner la cible biologique potentielle. Par conséquent, la méthionine aminopeptidase (MetAP) est une cible enzymatique attrayante car impliquée dans la maturation des protéines. Le but de ce travail est d'identifier par la méthode de criblage virtuel de nouveaux candidats médicaments pour la cible enzymatique MetAP afin de combattre les bactéries responsables d'infections.

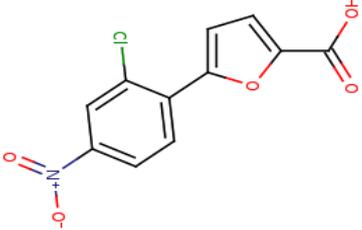
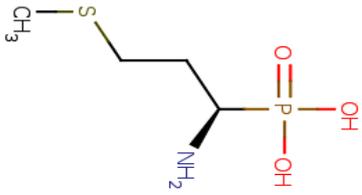
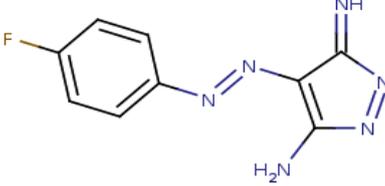
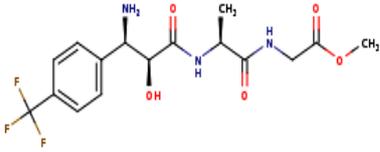
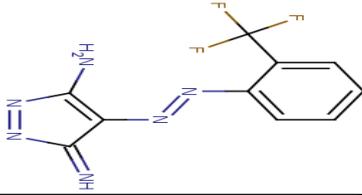
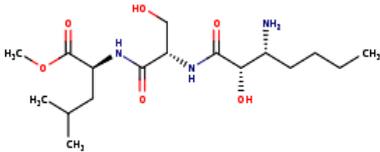
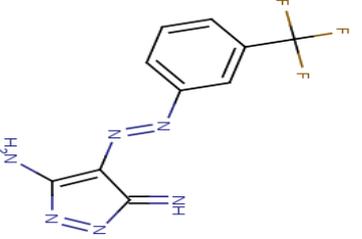
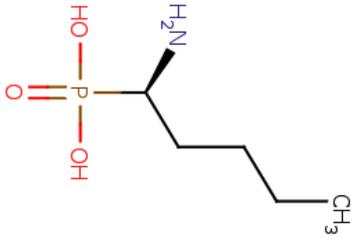
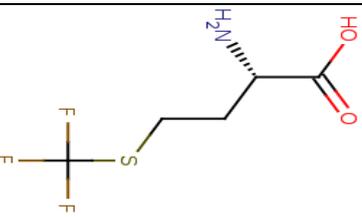
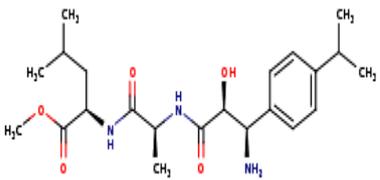
Comme nous l'avons évoqué précédemment, le programme FlexX dans sa version 2.2.0, 2016 a été utilisé pour réaliser ces travaux de docking. Les paramètres standards de FlexX ont été utilisés par défaut dans cette étude pour traiter le mode d'interaction de différents inhibiteurs provenant de la PDB avec le site actif de l'enzyme MetAP bactérienne.

II.1. Interaction MetAP-inhibiteurs

Notre démarche consiste d'abord à étudier, en premier lieu, le mécanisme d'inhibition mis en place par des inhibiteurs qu'on retrouve au niveau de la PDB contre notre cible MetAP de l'*E.coli* (EcMetAP) extraite du complexe 1XNZ. Les structures et les résultats de la simulation par FlexX de ces inhibiteurs sont représentés dans le tableau V.2 ci-dessous.

Tableau V.2. Résultats de docking pour EcMetAP

Ligand Ref.	Structure	Score (kJ/mole)	Ligand Ref.	Structure	Score (kJ/mole)
B21 (Ma et al., 2007)		- 35.318	U14 (Evdokimov et al., 2007)		- 27.810
YE6 (Huang et al., 2007)		- 34.970	A18 (Ma et al., 2007)		- 21.804
FCD (Ye et al., 2004)		- 34.548	QMS (Lowther et al., 1999)		- 20.589
YE7 (Huang et al., 2007)		- 34.547	U15 (Evdokimov et al., 2007)		- 20.426
FC2 (Xie et al., 2006)		- 33.366	7NP (Altmeyer et al., 2014)		- 17.893
A04 (Ma et al., 2007)		- 31.414	CT0 (Xie et al., 2006)		- 16.711
B23 (Ma et al., 2007)		- 31.407	TMG (Schiffmann et al., 2005)		- 16.242

A05 (Ma et al., 2007)		- 30.219	MPH (Lowther et al., 1999)		- 13.739
U13 (Evdokimov et al., 2007)		- 29.839	U11 (Evdokimov et al., 2007)		- 13.335
U19 (Evdokimov et al., 2007)		- 28.522	U17 (Evdokimov et al., 2007)		- 12.194
U12 (Evdokimov et al., 2007)		- 28.307	NLP (Lowther et al., 1999)		- 10.339
MF3 (Lowther et al., 1999)		- 27.971	U16 (Evdokimov et al., 2007)		- 6.400

Le tableau V.2 montre que parmi les 24 inhibiteurs dockés, le composé B21 avec un ΔG égale -35.318 KJ/mole se présente comme l'inhibiteur le plus puissant de la MetAP de *E.coli*.

II.2. Analyse visuelle des interactions « EcMetAP - B21 »

La figure V.5 montre le site actif de l'EcMetAP complexée avec l'inhibiteur B21. Le ligand et les acides aminés du site actif de l'enzyme sont représentés en « lines ».

L'analyse visuelle montre que l'inhibiteur B21 est bien placé dans le site actif de l'enzyme EcMetAP. Conformément aux travaux de Schiffmann, (2006) et Ma et al., (2007). Ce complexe est stabilisé par la formation de plusieurs liaisons:

-Une liaison hydrogène est observée entre le carbonyle de l'inhibiteur B21 et une molécule d'eau présente dans le site actif (O₁₆.....H-O-H291) ;

-Une liaison hydrogène est observée entre l'inhibiteur B21 et une molécule d'eau présentes dans le site actif (O₁₀.....H-O-H283) ;

-Deux ponts hydrogènes sont observés d'une part entre le carbonyle de B21 et le groupement NH du résidu His171 et d'autre part avec le groupement NH du résidu His178 (O₁₅.....H-N His171) et (O₁₅.....H-N His178);

-Un pont hydrogène est observé entre le composé B21 et l'un des atomes d'azote du cycle du résidu His178 (O₁₀.....N His178) ;

-Deux ponts métal sont formés entre l'ion métallique Mn et les deux oxygènes du carboxyle de l'inhibiteur B21 (O₁₅.....Mn-266) et (O₁₆.....Mn-266).

Dans le tableau V.3 ci-dessous nous avons résumé ces différentes liaisons.

Tableau V.3. Les différentes interactions formées par le composé B21.

Liaisons	Atomes du ligand	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
1	O ₁₆	H-O-H291	2.75
2	O ₁₀	H-O-H283	2.95
3	O ₁₅	H-N His171	1.86
4	O ₁₅	H-N His178	2.37
5	O ₁₀	N His178	2.42
6	O ₁₅	Mn-266	1.83
7	O ₁₆	Mn-266	2.23

Plusieurs interactions hydrophobiques stabilisent l'inhibiteur B21. Elles sont réalisées avec les résidus Cys70, Phe177, His79, Tyr62, Trp221, His63 et His178. La figure V.6 visualise ces interactions :

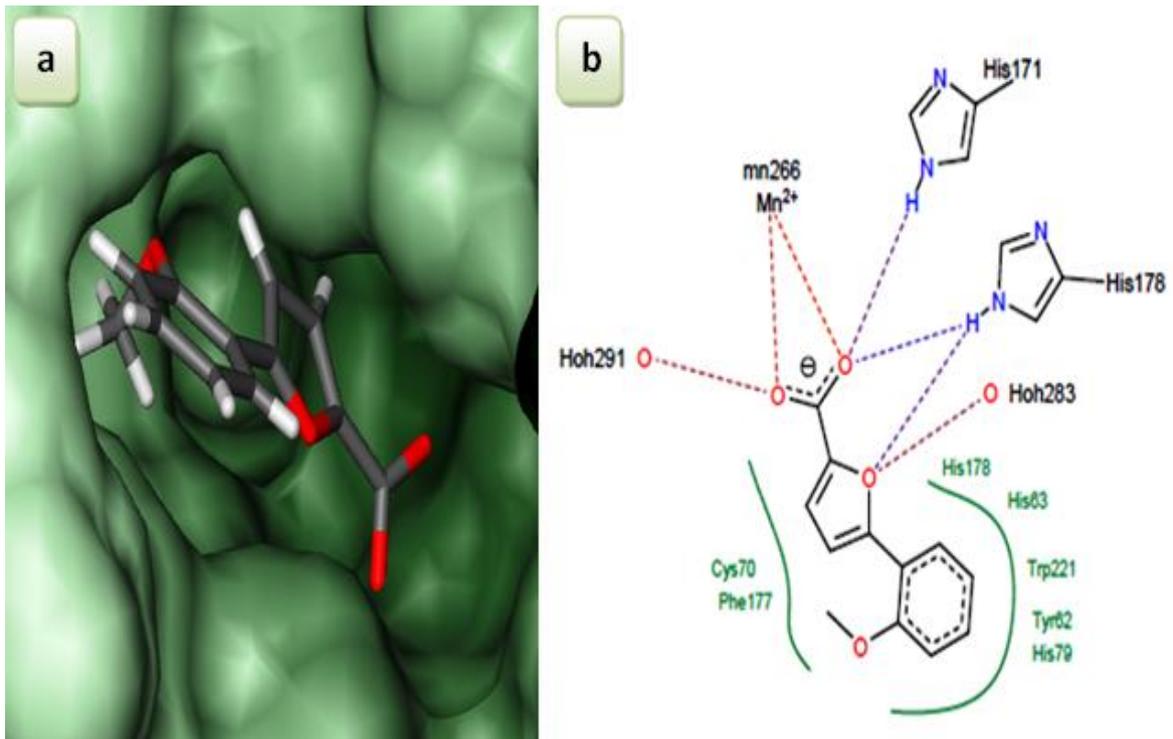


Figure V.5. Docking de l'inhibiteur B21 dans le site actif de l'enzyme EcMetAP. **(a).** Mode de liaison de l'inhibiteur B21 avec le site actif. **(b).** Représentation des interactions formées par l'inhibiteur B21. Les principales liaisons hydrogène entre l'inhibiteur et les résidus du site actif sont indiquées en pointillés.

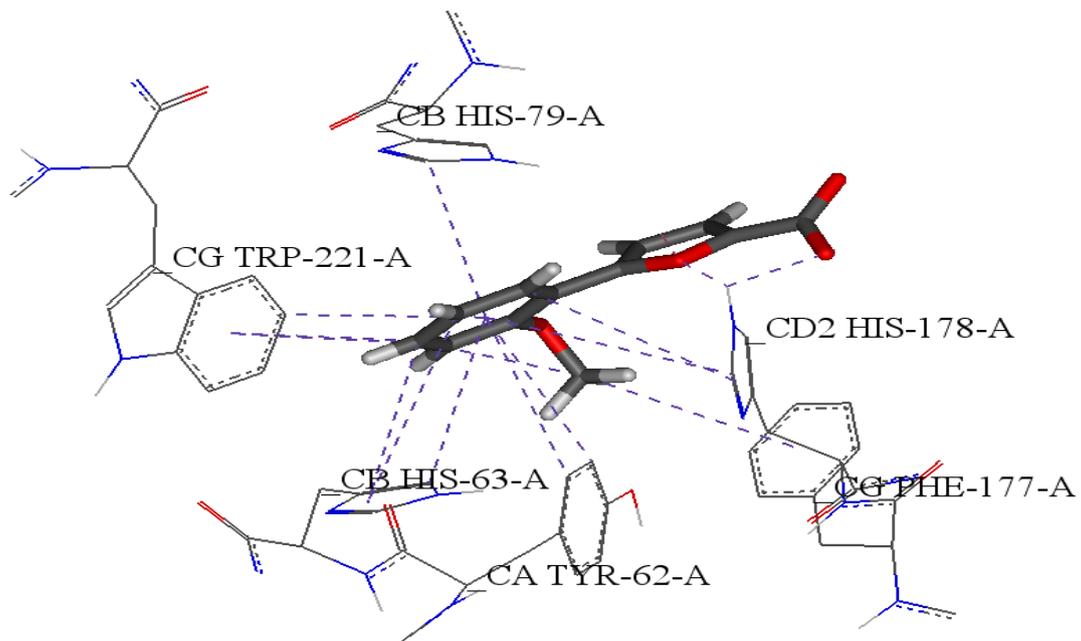


Figure V.6 Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé B21 avec la MetAP de l'*E.coli*

Le meilleur inhibiteur (B21) issu de la recherche précédente, est ensuite choisi comme modèle de référence dans le but d'identifier à partir de la chimiothèque commerciale ZINC de nouveaux inhibiteurs de la cible enzymatique MetAP bactérienne.

VII. Criblage virtuel basé sur la structure de la protéine

Le criblage virtuel (CV) permet la réalisation de manière rapide et à moindre coût des prédictions de l'activité des composés. En effet, le criblage est de plus en plus employé afin de sélectionner au sein de vastes bibliothèques de molécules un nombre restreint de composés à cribler expérimentalement (Kumar et *al.*, 2015).

Le criblage virtuel a été essentiellement basé sur la connaissance de la structure tridimensionnelle de la cible (Walters et *al.*, 1998). Donc, on est parti de la structure de la MetAP afin d'identifier les interactions possibles au sein du site de liaison. Dans ce cas, les molécules à évaluer sont d'abord dockées dans le site actif de la MetAP. Cela consiste à estimer la complémentarité structurale de chaque molécule criblée avec le site actif considéré. L'interaction est ensuite quantifiée (*scoring*) pour conduire à la sélection de nouveaux composés potentiellement actifs.

Tout d'abord, nous avons focalisé nos travaux sur la chimiothèque ZINC pour réaliser le criblage virtuel. Lors de la réalisation de ce travail, 3.687.621 de structures destinées au docking étaient disponibles à la vente immédiate. Comme il existe plusieurs millions de molécules différentes, il est impossible de les tester toutes pour des raisons de coût et de temps, d'où la nécessité de sélectionner un sous ensemble de molécules à tester.

Afin de ne sélectionner que des molécules d'intérêt, il est commun de filtrer la chimiothèque par un certain nombre de descripteurs. En effet, La première étape du criblage virtuel est l'utilisation de filtres pour réduire la taille de la banque commerciale ZINC.

III.1. Filtrage et préparation finale de la chimiothèque ZINC

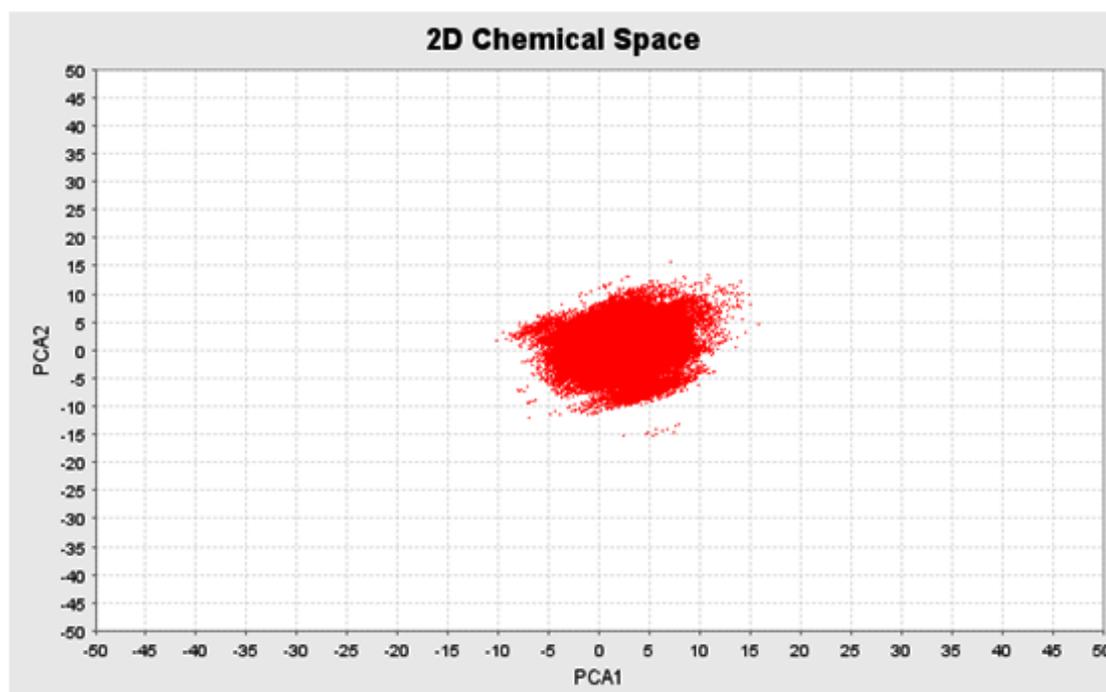
Le logiciel *Screening Assistant* est utilisé pour gérer les 3.7 millions des structures destinées au docking de la chimiothèque ZINC. Ce logiciel permet la sélection de composés pour des tests de criblage en fonction de leurs propriétés physicochimiques et par leur diversité. De plus, l'application de ces filtres permet d'éliminer des composés dont les caractéristiques sont trop éloignées de celles d'un médicament.

III.1.1. Filtres physico-chimiques

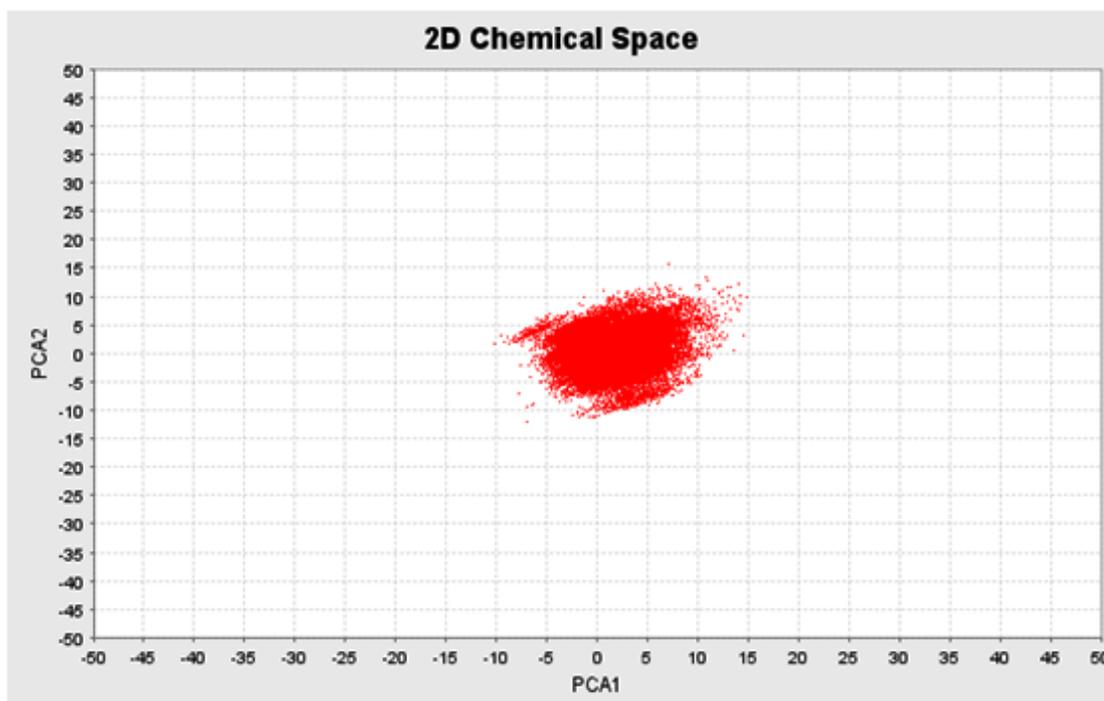
Dans notre cas, les propriétés moléculaires telles que la masse moléculaire, le logP, la proportion d'atomes donneurs et accepteurs, et le nombre de liaisons sujettes à la rotation sont les principaux critères de choix. Bien sûr, cette liste n'est pas exhaustive. L'application de ces filtres réduit notre sélection à environ deux millions de molécules. Au total, 1 915 167 molécules ont été sélectionnées par *Screening Assistant*. Or les moyens informatiques à notre disposition limitent notre capacité à tester tous ces composés ; un algorithme de diversité a été appliqué à cet ensemble pour ne sélectionner finalement que 200 000 molécules à cribler virtuellement.

III.1.2. Sélection de composés par diversité

La méthode de sélection par diversité se base sur le principe de similarité, selon lequel les molécules ayant des structures voisines ont une activité biologique proche (Spencer, 1997). De ce fait, nous avons utilisé un algorithme de diversité pour sélectionner un ensemble de 200 000 composés. Cet algorithme a été implémenté dans *Screening Assistant*. Il est basé sur le regroupement des composés en clusters, qui doivent contenir des composés chimiquement similaires. La sélection consiste à choisir une molécule dans chaque cluster. L'espace chimique avant et après sélection par diversité est représenté dans les graphes suivants.



Graphe V.5. Molécules commerciales filtrées (1 915 167 million) de ZINC.



Grphe V.6. Sélection par diversité (200 000 composés)

Cela nous permet de constater que les deux graphes sont similaires. De ce fait, on dit que les composés sélectionnés par diversité sont représentatifs de l'espace chimique de départ.

III.2. Protocole du criblage virtuel

Après la préparation de la chimiothèque ZINC (réduction du nombre de candidats), l'étape suivante consiste à effectuer le criblage virtuel des collections ciblées pour la recherche de molécules ayant des caractéristiques prometteuses sur la cible MetAP bactérienne. Pour effectuer nos calculs, nous avons appliqué le programme de docking FlexX à l'ensemble pré-filtré. Un total de quatre mois est nécessaire pour cribler 200 000 composés. Ces composés chimiques sont téléchargés à partir de la banque de données ZINC sous format *.sdf*. Nous avons comparé le score de docking de ces inhibiteurs (ΔG) à celui de l'inhibiteur de référence (voir tableaux V.2) et proposé les meilleurs vis-à-vis de l'enzyme MetAP. Finalement, après un protocole de docking-scoring nous avons retenu au total 100 molécules à fort potentiel inhibiteur. Les codes et les résultats de la simulation par FlexX de ces composés sont regroupés dans le tableau V.4 ci-dessous.

Tableau V.4. Meilleurs scores obtenus par FlexX des inhibiteurs dans le site actif de l'EcMetAP

Code	Score KJ/mole	Code	Score KJ/mole	Code	Score KJ/mole
ZINC54965407	-44.149	ZINC72434831	-37.918	ZINC04811349	-36.170
ZINC05515132	-43.602	ZINC03870990	-37.896	ZINC54763507	-36.152
ZINC44290512	-42.836	ZINC32577550	-37.843	ZINC71791177	-36.145
ZINC31945244	-42.376	ZINC41410864	-37.811	ZINC95933641	-36.117
ZINC57957926	-41.608	ZINC38534984	-37.711	ZINC01697328	-36.069
ZINC00443079	-41.567	ZINC57866988	-37.566	ZINC82585512	-36.050
ZINC31964207	-41.177	ZINC04340080	-37.471	ZINC72166410	-36.045
ZINC65351479	-41.137	ZINC72240833	-37.448	ZINC72168750	-35.978
ZINC04785369	-40.549	ZINC06276906	-37.411	ZINC77597498	-35.952
ZINC12535207	-40.306	ZINC49882275	-37.396	ZINC76370800	-35.939
ZINC03307916	-40.273	ZINC67847542	-37.359	ZINC90686505	-35.929
ZINC06816130	-40.130	ZINC22151060	-37.208	ZINC71649475	-35.897
ZINC04468845	-39.859	ZINC01417030	-37.066	ZINC13741968	-35.896
ZINC1596161	-39.834	ZINC55131886	-36.973	ZINC05721281	-35.875
ZINC76135800	-39.830	ZINC15880082	-36.952	ZINC00377285	-35.840
ZINC04638792	-39.588	ZINC57631728	-36.945	ZINC64936867	-35.822
ZINC15085593	-39.477	ZINC55383607	-36.920	ZINC72481572	-35.821
ZINC07556665	-39.441	ZINC00114563	-36.854	ZINC31308822	-35.769
ZINC76137383	-39.351	ZINC72388389	-36.843	ZINC15223641	-35.750
ZINC41410890	-39.337	ZINC67351021	-36.720	ZINC76193193	-35.738
ZINC04637211	-39.212	ZINC36178876	-36.639	ZINC03856312	-35.710
ZINC01293347	-39.186	ZINC76010110	-36.594	ZINC22176802	-35.696
ZINC65348680	-39.104	ZINC72280453	-36.581	ZINC73709178	-35.664
ZINC77597680	-38.842	ZINC57752185	-36.461	ZINC06792631	-35.647
ZINC77597647	-38.701	ZINC14075041	-36.455	ZINC25612458	-35.623
ZINC04187539	-38.614	ZINC04139358	-36.377	ZINC76566671	-35.610
ZINC01396580	-38.609	ZINC05736197	-36.368	ZINC20086057	-35.560
ZINC95366420	-38.579	ZINC65351459	-36.347	ZINC00524548	-35.536
ZINC95750605	-38.556	ZINC71278843	-36.283	ZINC95362866	-35.519
ZINC75817741	-38.475	ZINC40510808	-36.260	ZINC65490988	-35.436
ZINC13118854	-38.367	ZINC76712800	-36.249	ZINC69591343	-35.426
ZINC32919079	-38.295	ZINC67473025	-36.226	ZINC82707186	-35.414
ZINC95970055	-38.177	ZINC69520758	-36.198	ZINC00202657	-35.403
ZINC67773470	-38.169				

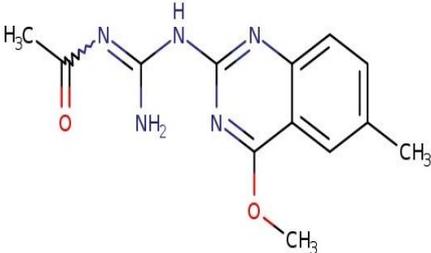
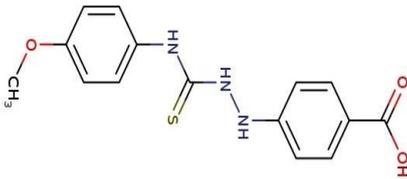
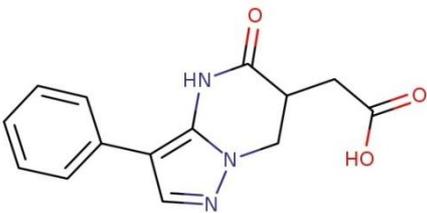
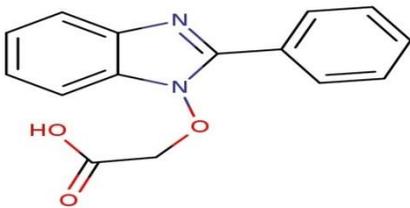
III.3. Molécules sélectionnées comme candidates

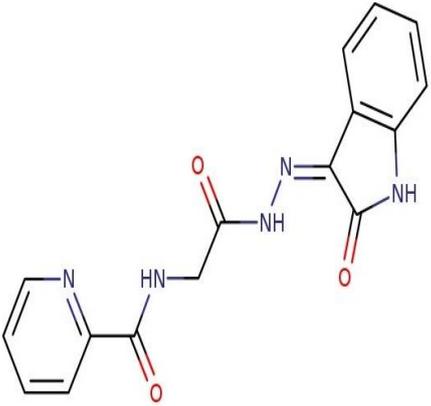
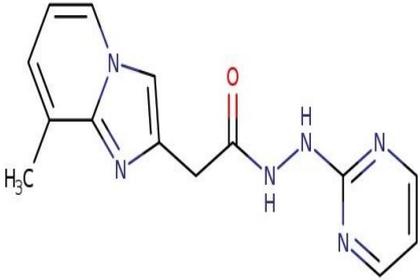
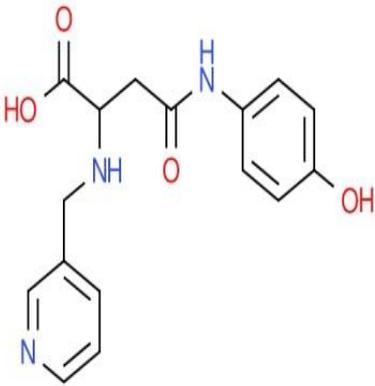
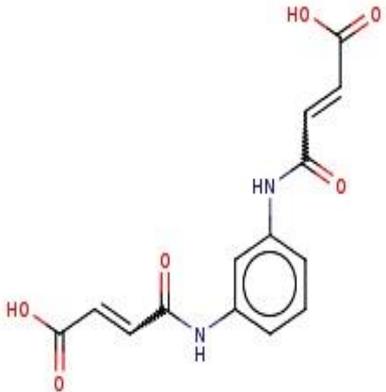
D'après le tableau V.4, une centaine de composés potentiellement intéressants ont été retenus sur la base de leurs scores. Malheureusement, dans l'impossibilité de les tester tous, nous avons choisi les meilleurs inhibiteurs de la MetAP pour une évaluation *in vitro*. Cependant, avant de commander les molécules, il est important de :

- Visualiser la structure de la molécule ;
- Rechercher de manière plus précise certaines sous-structures potentiellement toxiques ;
- S'assurer que les molécules sont disponibles chez les différents fournisseurs.

De ce fait, neuf des meilleures molécules ont subi une analyse *in silico* pour visualiser les interactions enzyme-ligand, ainsi que l'évaluation de leurs propriétés ADME-Tox. Les inhibiteurs testés sont représentés dans le tableau V.5 suivant dont la lecture nous indique clairement que tous les composés choisis pour cette étude possèdent les critères nécessaires pour être inhibiteur potentiel de la MetAP bactérienne.

Tableau V.5. Données chimiques et structurales des composés sélectionnés comme candidats.

Zinc ID code	Structure	Nom chimique	Score 1XNZ (Kj/mole)	Score 1QXY (Kj/mole)	Score 4FO8 (Kj/mole)	Score 3PKA (Kj/mole)
ZINC 05515132		(1,2-diphenyl-2-ureidoiminoethylidene)ammonia	-43.602	-21.991	-35.021	-37.034
ZINC 04785369		N-[amino-(4-methoxy-6-methylquinazolin-2-yl)aminomethylene]acetamide	-40.549	-32,142	-27.417	-37.004
ZINC 03307916		4-[N'-[(4-methoxyphenyl)thiocarbonyl]hydrazino]benzoate	-40.273	-30,100	-22.810	-32.362
ZINC 15085593		(5-oxo-3-phenyl-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)acetic acid	-39.477	-28.265	-22.264	-31.732
ZINC 01396580		2-[(2-phenyl-1H-1,3-benzimidazol-1-yl)oxy]acetic acid	-38.609	-21.563	-36.474	-40.049

<p>ZINC 15880082</p>		<p>N-[2-oxo-2-[N'-(2-oxoindol-3-yl)hydrazino]ethyl]pyridine-2-carboxamide</p>	<p>-36.952</p>	<p>-34.866</p>	<p>-33.207</p>	<p>-45.336</p>
<p>ZINC 72280453</p>		<p>2-(8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)-N'-pyrimidin-2-yl-acetohydrazide</p>	<p>-36.581</p>	<p>-42.994</p>	<p>-25.927</p>	<p>-36.488</p>
<p>ZINC 04139358</p>		<p>4-(4-hydroxyphenyl)amino-4-oxo-2-(3-pyridylmethylamino)butanoic</p>	<p>-36.377</p>	<p>-46.682</p>	<p>-32.330</p>	<p>-44.207</p>
<p>ZINC 31308822</p>		<p>(Z)-4-[3-[(Z)-4-hydroxy-4-oxo-but-2-enoyl]amino]anilino]-4-oxo-but-2-enoic</p>	<p>-35.769</p>	<p>-32.336</p>	<p>-34.293</p>	<p>-48.642</p>

III.4. Prédiction du mode d'interaction des meilleurs composés

L'étude de l'interaction entre le site actif de l'enzyme MetAP bactérienne et les neuf inhibiteurs décrits précédemment pour former un complexe stable est réalisée à l'aide du logiciel FlexX. Dans cette partie, nous présenterons les différentes liaisons qu'elles impliquent avec le site actif de cette enzyme. Cette étude devrait contribuer à apporter une meilleure connaissance du comportement structural de la cible d'intérêt MetAP et les interactions qu'elle peut avoir avec ses inhibiteurs.

III.4.1. Interaction EcMetAP- ZINC05515132

À la lumière des résultats obtenus dans le tableau V.5, l'inhibiteur (1,2-diphényl-2-ureidoimino-ethylidene) aminourea dont le code ID est ZINC05515132, donne la meilleure énergie d'interaction (-43.602 KJ/mole), ainsi qu'une bonne pénétration au niveau du site actif. L'analyse visuelle des interactions entre cet inhibiteur et l'enzyme est représentée dans la figure V.7. Les lignes vertes représentent les interactions hydrophobiques. Les tirets discontinus représentent les ponts hydrogène. Cette énergie d'interaction est traduite par la présence de différentes liaisons entre l'enzyme EcMetAP et l'inhibiteur, le programme FlexX utilisé dans ce travail nous a permis de visualiser les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobiques.

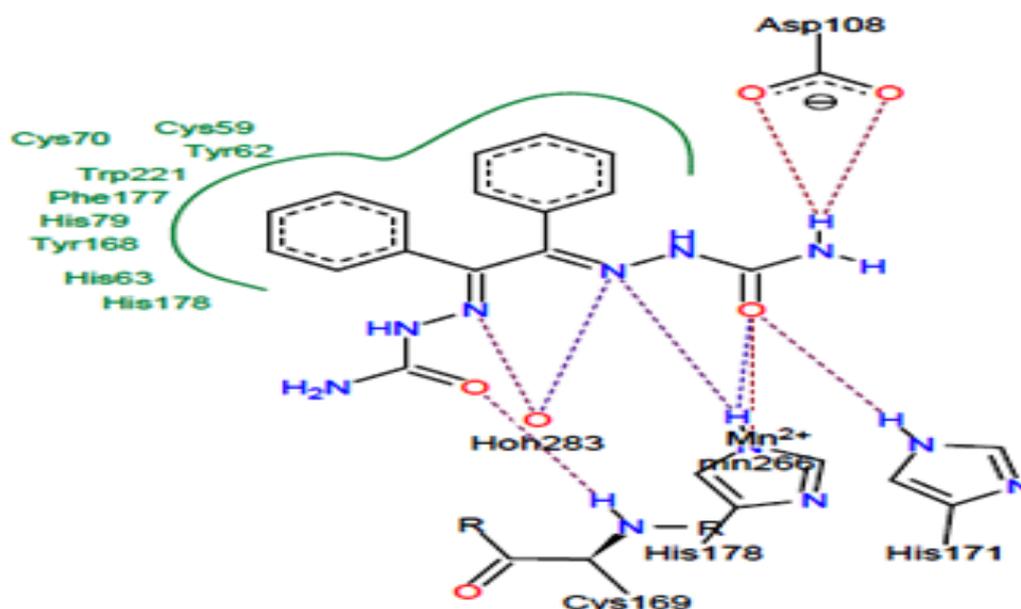


Figure V.7. Représentation des résidus d'interaction de l'inhibiteur ZINC05515132 avec le site actif d'EcMetAP

Le composé ZINC05515132 établit neuf liaisons hydrogène avec les résidus Asp108, Cys169, His171, His178, Mn266 et H₂O283. Dans le tableau V. 6 ci-dessous nous avons résumé ces différents ponts.

Tableau V. 6. Les neuf ponts formés par le composé ZINC05515132 et les résidus du site actif de l'EcMetAP

Liaisons	Résidus du site actif	Atome de site actif	Atome du ZINC05515132	Distance Å
1	Asp108	O _{D2}	H ₃₁ -N ₁₂	1.98
2		O _{D1}		2.15
3	Cys169	N-H	O ₁₇	2.35
4	His171	N _{E2} -H _{E2}	O ₁₁	2.13
5	His178	N _{E2} -H _{E2}	N ₈	2.34
6			O ₁₁	2.57
7	Mn266	-	O ₁₁	1.89
8	H ₂ O283	O	N ₈	2.32
9			N ₁₄	2.47

De plus, la visualisation des résultats du docking montre que l'inhibiteur ZINC05515132 forme avec le site actif de l'EcMetAP plusieurs interactions hydrophobiques avec les résidus Cys59, Tyr62, His63, Cys70, His79, Tyr168, Phe177, His178 et Trp221. ces interactions sont représentées dans la figure V.8 ci-dessous.

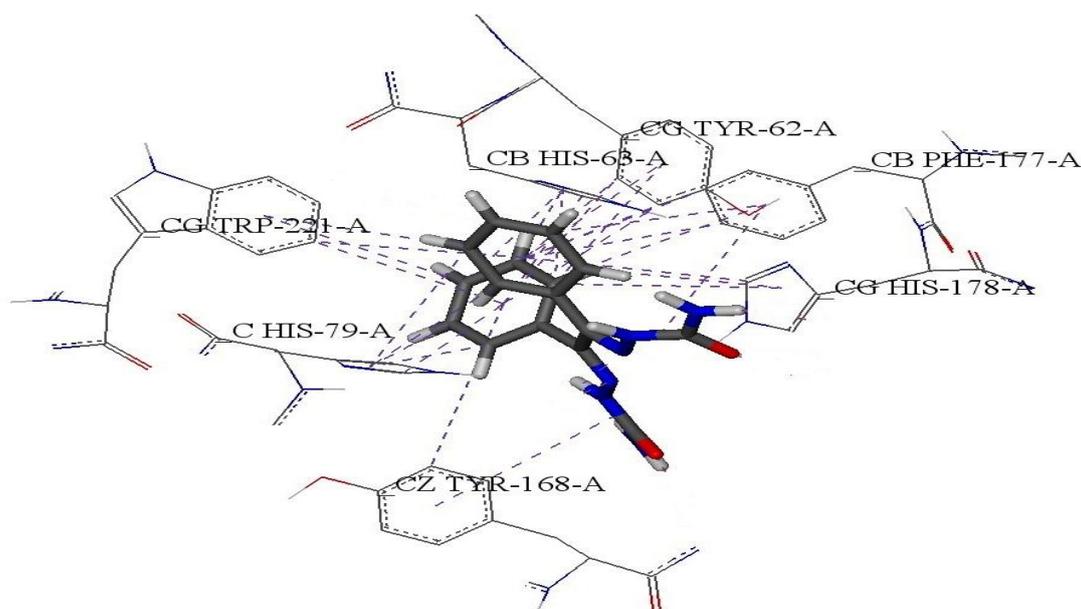


Figure V. 8. Représentation des interactions hydrophobiques formées entre le composé ZINC05515132 et le site actif de l'EcMetAP

III.4.2. Interaction EcMetAP- ZINC04785369

Dans le cas de l'inhibiteur ZINC04785369, le complexe enzyme-inhibiteur donne une énergie d'interaction de -40.549 KJ/mole. Les liaisons de type hydrogène observées lors de l'interaction de cet inhibiteur avec le site actif de l'enzyme EcMetAP sont représentées dans le tableau V. 7 et la figure V. 9 ci-dessous:

Tableau V. 7. Interactions formées par le composé ZINC04785369.

Liaisons	Résidus du site actif	Atome de site actif	Atome du ZINC04785369	Distance Å
1	Asp97	O _{D2}	H ₃₆ -N ₁₈	1.90
2	His171	N _{E2} -H _{E2}	N ₁₄	2.34
3	His178	N _{E2} -H _{E2}	N ₁₁	2.26
4		N _{E2} -H _{E2}	N ₁₄	2.24
5	Glu204	O _{E1}	H ₃₁ -N ₁₈	1.49
6	Mn266	-	N ₁₄	2.15
7	H ₂ O283	O	N ₁₁	2.67
8	H ₂ O411	O	H ₂₇	1.89

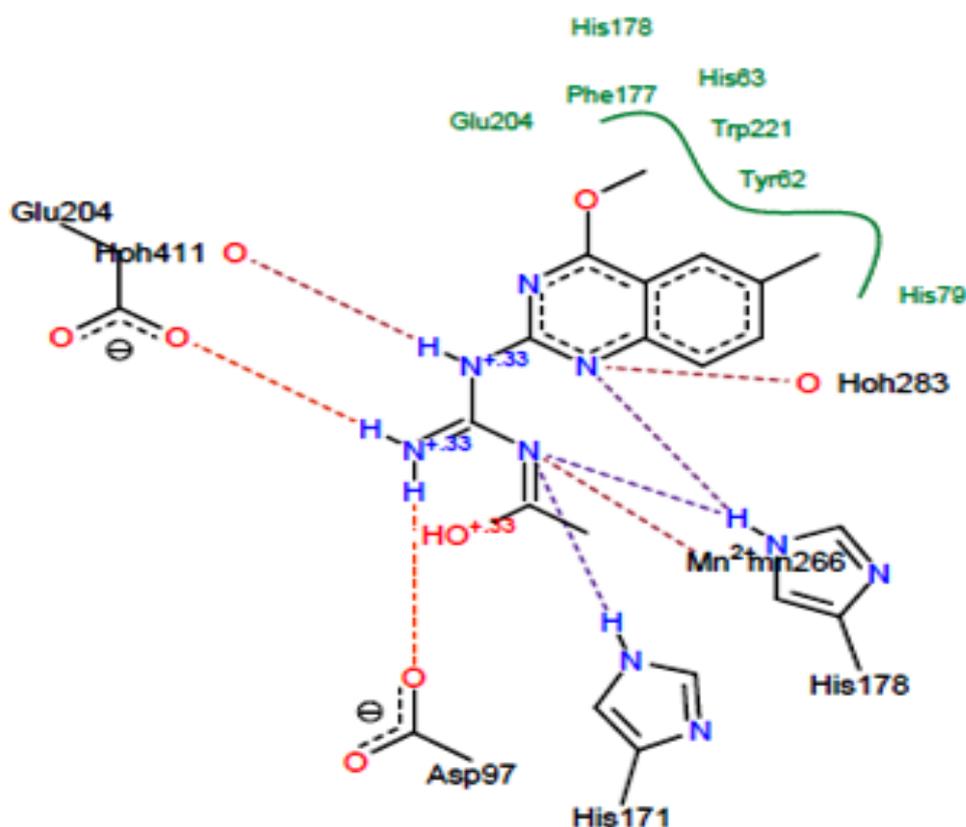


Figure V. 9. Représentation de liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur ZINC04785369

De nombreuses interactions de type hydrophobe participent également à la stabilité du complexe EcMetAP- ZINC04785369. Ces interactions sont constatées entre l'inhibiteur et les résidus Tyr62, His63, His79, Phe177, His178, Glu204 et Trp221 du site actif de l'enzyme (figure V. 10).

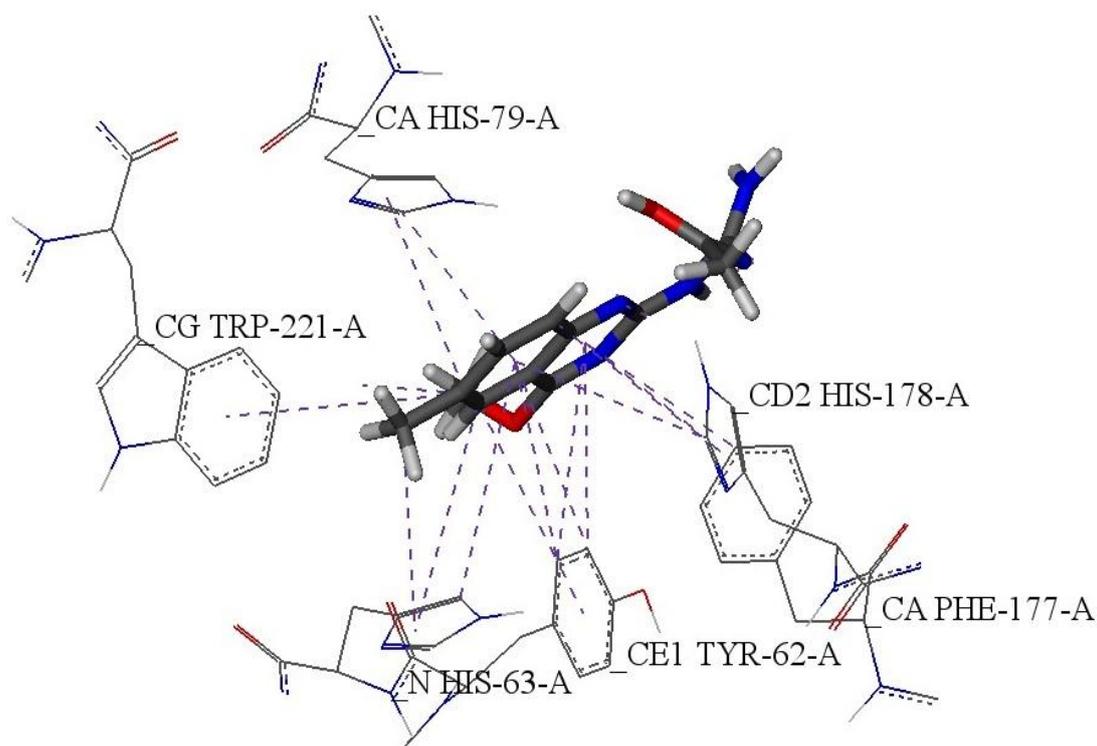


Figure V. 10. Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur ZINC04785369

III.4.3. Interaction EcMetAP- ZINC03307916

Le criblage réalisé par FlexX fait ressortir le composé ZINC03307916 en troisième position avec un score égal à -40.273 Kj/mole. Ce score se traduit par la présence de nombreuses interactions entre l'inhibiteur et les résidus de site actif (tableau V.8 et figure V.11). Dans le tableau suivant nous avons résumé les paires d'atomes interagissant dans les différentes interactions:

Tableau V. 8. Liaisons formées par le composé ZINC03307916 dans le site actif de l'EcMetAP.

Liaisons	Résidus du site actif	Atome de site actif	Atome du ZINC03307916	Distance Å
1	Tyr62	O	H ₃₀ -N ₉	1.94
2	Cys70	S _G	H ₃₂ -N ₁₃	2.21
3	His171	N _{E2} - H _{E2}	O ₂₂	2.07
4	His178	N _{E2} - H _{E2}	O ₂₂	2.24
5	Mn265	-	O ₂₁	1.98
6	Mn266	-	O ₂₂	1.98
7		-	O ₂₁	1.96

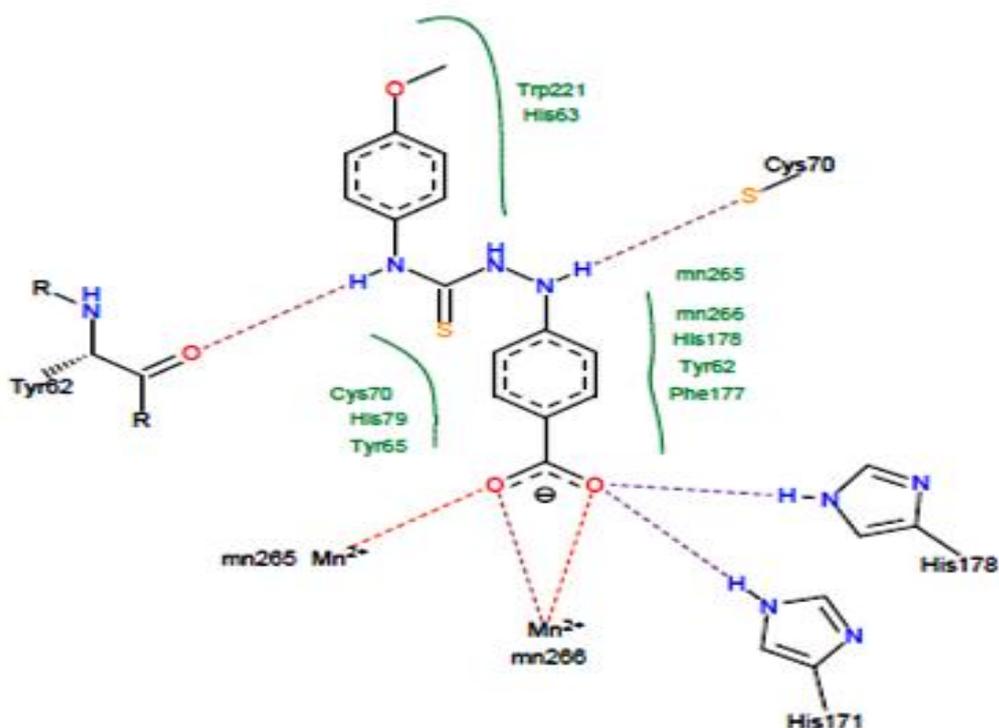


Figure V. 11. Résultat de docking de composé ZINC03307916 avec le site actif de l'EcMetAP

Il faut également souligner l'intervention des résidus Tyr62, His63, Tyr65, His79, Phe177, His178 et Trp221 dans la stabilité du complexe *EcMetAP*- ZINC03307916 en permettant la formation de nombreuses interactions de type hydrophobe (Figure V.12).

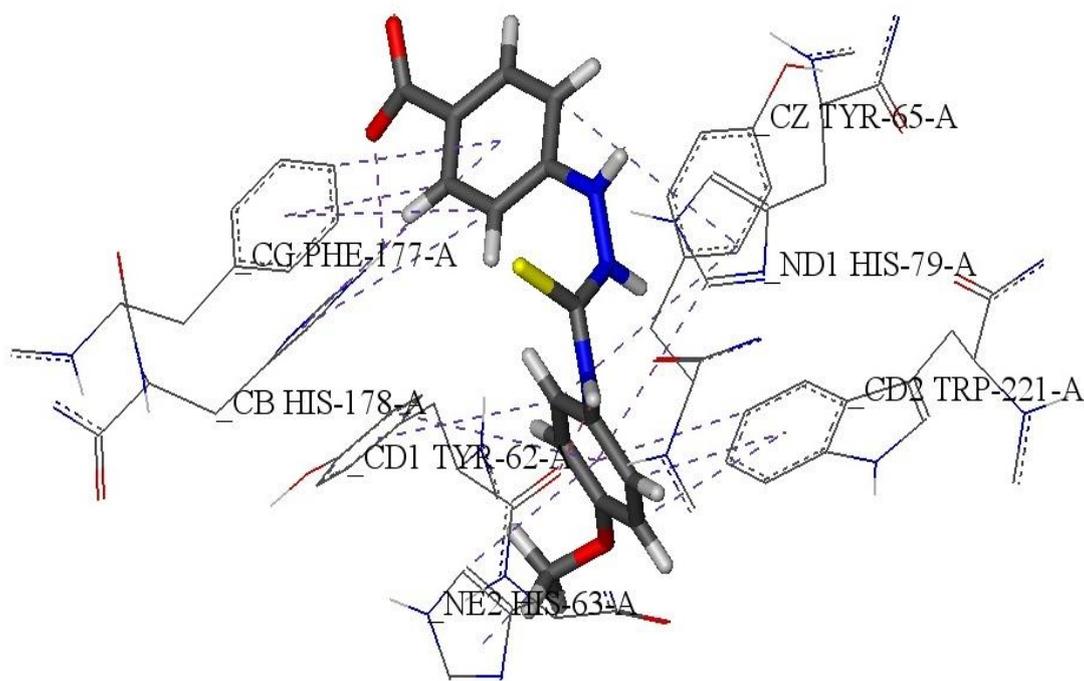


Figure V. 12. Interactions hydrophobique entre l'inhibiteur ZINC03307916 et le site de liaison de l'EcMetAP

III.4.4. Interaction EcMetAP- ZINC15085593

Le docking de cette petite molécule a donné une énergie de liaison égale à -39.477 Kj/mole. Les résidus impliqués dans les différents interactions entre l'inhibiteur ZINC15085593 et le site actif de l'enzyme EcMetAP sont présentés dans le tableau V. 9 et la figure V.13.

Tableau V. 9. Les sept ponts formés par le composé ZINC15085593

Liaisons	Résidus du site actif	Atome de site actif	Atome du ZINC15085593	Distance Å
1	His171	N _{E2} - H _{E2}	O ₂₀	2.33
2	His178	N _{E2} - H _{E2}	O ₁₄	1.74
3			O ₂₀	2.20
4	H ₂ O283	O	O ₁₄	2.63
5	Mn265	-	O ₂₁	2.08
6	Mn266	-	O ₂₀	2.38
7		-	O ₂₁	1.87

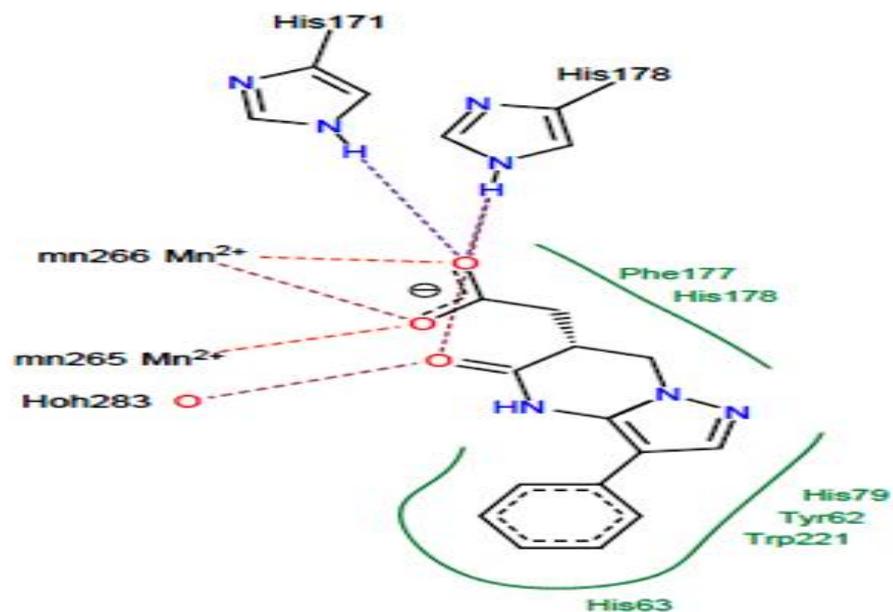


Figure V. 13. Représentation des interactions ZINC15085593-EcMetAP

Il est à noter que, la stabilité de ce composé au sein du site actif est assurée également par de nombreuses interactions hydrophobiques faisant intervenir les résidus Tyr62, His63, His79, Phe177, His178 et Trp221 (figure V.14).

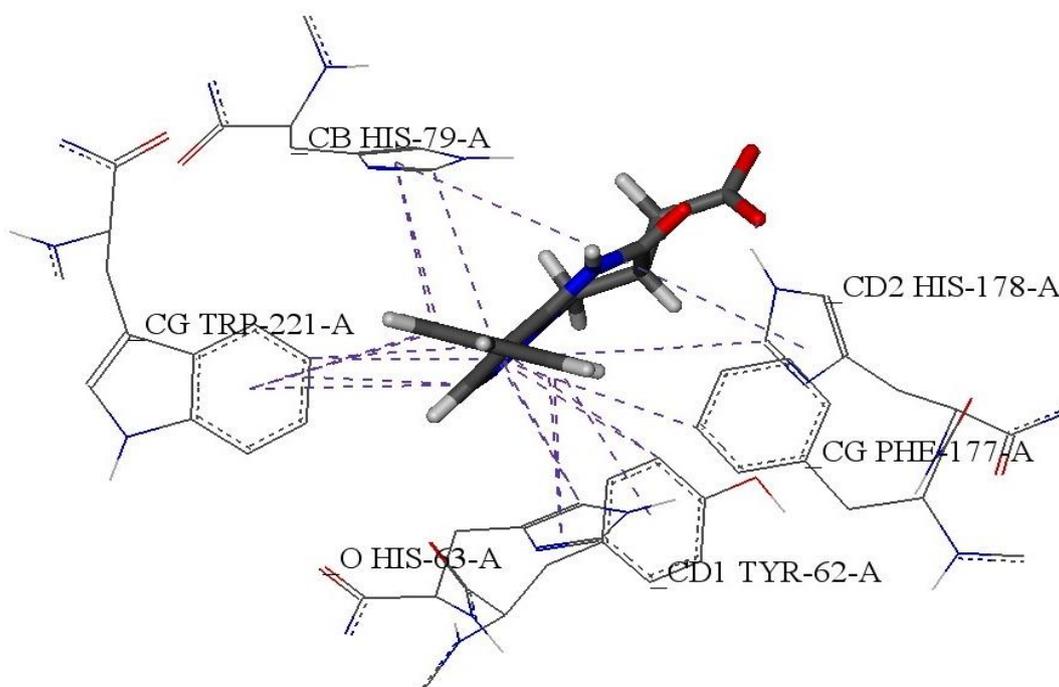


Figure V. 14. Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé ZINC15085593 avec le site actif de l'EcMetAP

III.4.5. Interaction MtMetAP- ZINC01396580

La modélisation de l'interaction MtMetAP-ZINC01396580 simulé par docking moléculaire avec FlexX nous a permis d'obtenir un complexe plus stable avec une énergie d'interaction égale à -40.049 Kj/mole. Cette énergie résulte de la mise en place de plusieurs liaisons hydrogène et interactions hydrophobiques (figure V.15).

Les travaux de Lu et *al.*, (2011) mettent en évidence les résidus responsables de la reconnaissance du substrat par le site actif de la MetAP. De plus, les structures cristallographiques de la MtMetAP montrent que les résidus His114 et His212 jouent un rôle important dans la fonction catalytique de cette enzyme (Lowther et Matthews, 2000 ; Addlagatta et *al.*, 2005). Les longueurs et les orientations spatiales des différentes liaisons hydrogène obtenues sont résumées sur le tableau V.10.

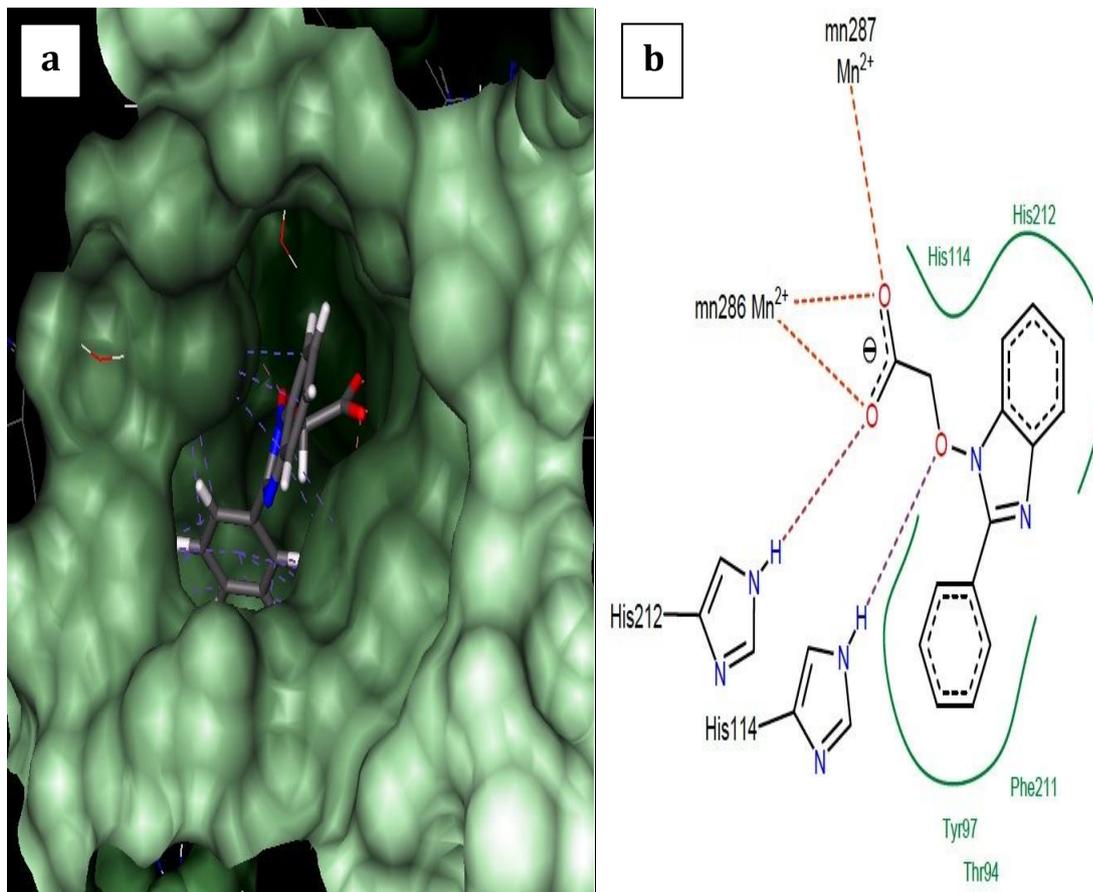


Figure V. 15. Docking de l'inhibiteur ZINC01396580 dans le site actif de la MtMetAP par FlexX. **a** : ZINC01396580 à l'intérieur du site actif. **b** : Représentation des interactions formées par l'inhibiteur ZINC01396580

Tableau V. 10. Interactions formées par l'inhibiteur ZINC01396580

Liaisons	Résidus du site actif	Atome de site actif	Atome du ZINC01396580	Distance Å
1	Mn286	-	O ₁₉	2.12
2			O ₃₁	2.17
3	Mn287	-	O ₁₉	2.19
4	His114	N _{E2} - H _{E2}	O ₁₆	1.79
5	His212	N _{E2} - H _{E2}	O ₃₁	2.05

Deux poches hydrophobiques stabilisant l'inhibiteur ZINC01396580 dans le site de liaison de la MtMetAP. Ils sont réalisés avec les résidus Thr94, Tyr97, His114, Phe211 et His212 (figure V.16).

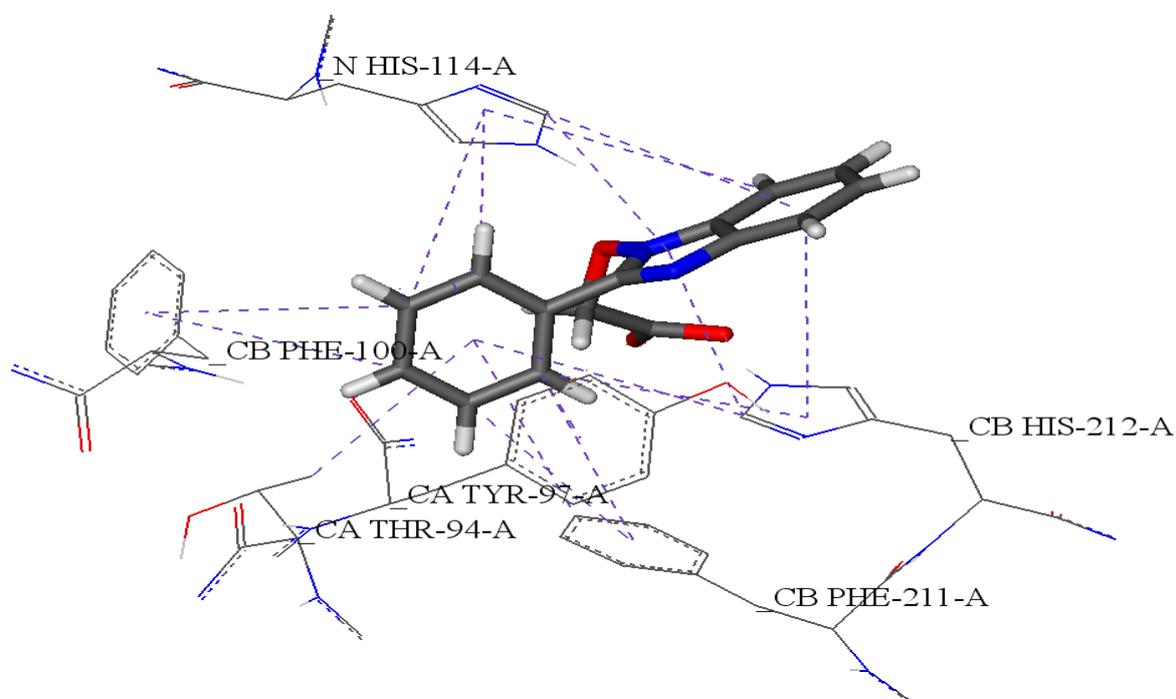


Figure V. 16. Représentation des interactions hydrophobiques formées entre l'inhibiteur ZINC01396580 et le site actif de l'MtMetAP

III.4.6. Interaction MtMetAP- ZINC15880082

Le composé ZINC15880082 dont le nom chimique N-[2-oxo-2-[N'-(2-oxoindol-3-yl)hydrazino]ethyl] pyridine-2-carboxamide forme le complexe MtMetAP-inhibiteur le plus stable et possède le meilleur effet inhibiteur avec une valeur d'énergie de liaison de -45.336 kj/mole (figure V. 17). Ces résultats s'expriment visuellement par la mise en place de

nombreuses interactions de type hydrogène entre l'enzyme MetAP et l'inhibiteur ZINC15880082. Dans le tableau V. 11 ci-dessous nous avons résumé les paires d'atomes interagissant dans ces liaisons.

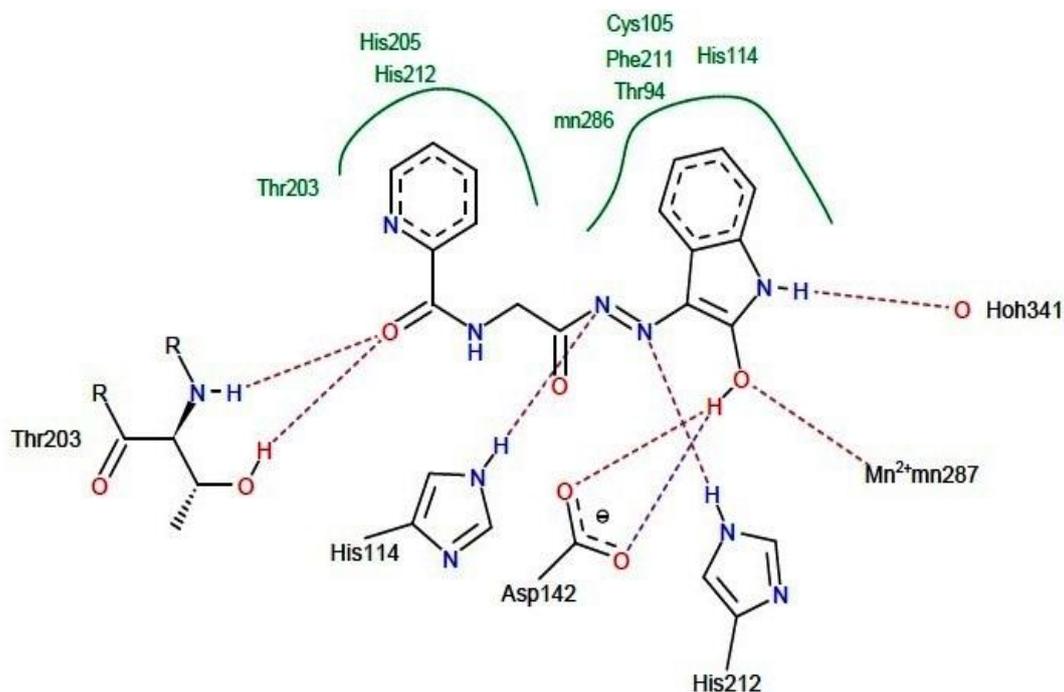


Figure V. 17. Représentation du mode de fixation prédit par le programme FlexX entre MtMetAP et l'inhibiteur ZINC15880082

Tableau V. 11. Ponts formés par l'inhibiteur ZINC15880082 dans le site actif de la MtMetAP

Liaisons	Résidus du site actif	Atome de site actif	Atome du ZINC15880082	Distance Å
1	His114	N _{E2} -H _{E2}	N ₁₃	2.27
2	Asp142	O _{D1}	H ₃₀ -O ₁₁	2.16
3		O _{D2}	H ₃₀ -O ₁₁	1.89
4	His211	N _{E2} -H _{E2}	N ₁₂	2.27
5	Thr203	O _{G1} -H _{G1}	O ₁₉	2.21
6		N ₁ -H ₁	O ₁₉	1.75
7	H ₂ O341	O	H ₁₀ -N ₉	1.72
8	Mn287	-	O ₁₁	1.81

L'inhibiteur ZINC15880082 est stabilisé par plusieurs interactions hydrophobiques réalisées avec les résidus Thr94, Cys105, His114, Thr203, His205, Phe211 et His212. Parmi ces interactions celles qui sont présentées dans la figure suivante.

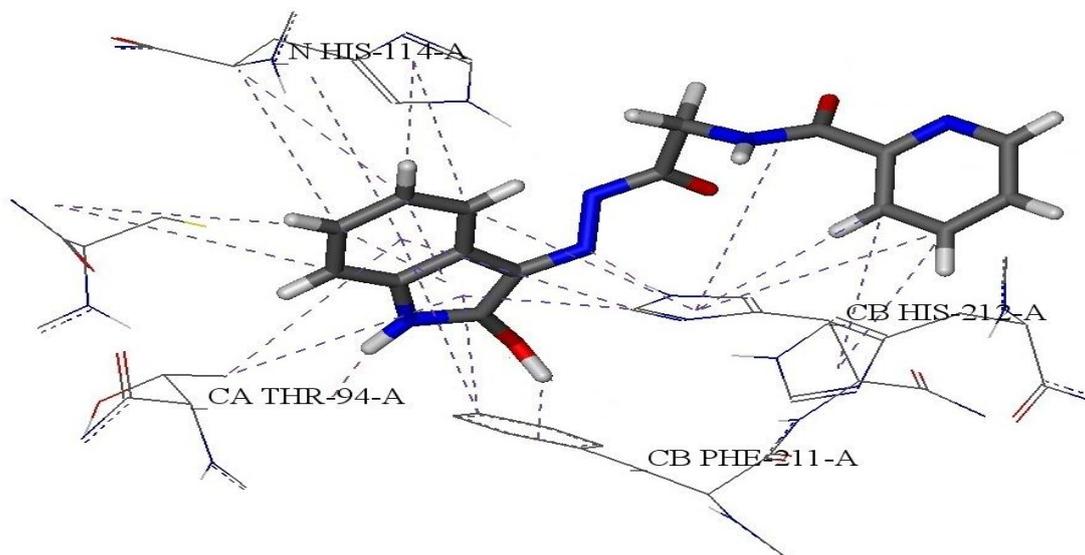


Figure V. 18. Interactions hydrophobique entre l'inhibiteur ZINC15880082 et le site de liaison de la *MfMetAP*

III.4.7. Interaction *S.aureus* MetAP- ZINC72280453

La visualisation des résultats du docking montre que le composé ZINC72280453 forme avec le site actif de la MetAP neufs liaisons représentées en tirets discontinus. Dans le tableau V.12 et la figure V.19 ci-dessous nous avons résumé ces différentes liaisons.

Tableau V. 12. Les ponts formés par l'inhibiteur ZINC72280453

Liaisons	Résidus du site actif	Atome de site actif	Atome du ZINC72280453	Distance Å
1	Asp93	O _{D1}	H ₃₁ -N ₁₄	2.10
2	His175	N _{E2} - H _{E2}	O ₁₃	2.35
3	Glu202	O _{E1}	H ₃₂ -N ₁₅	1.28
4		O _{E2}		2.08
5	H ₂ O3148	O	N ₁₇	2.78
6	H ₂ O3172	O	N ₁₇	3.04
7		O	N ₁₈	3.21
8		Co1003	-	O ₁₃
9	-		N ₁₇	2.33

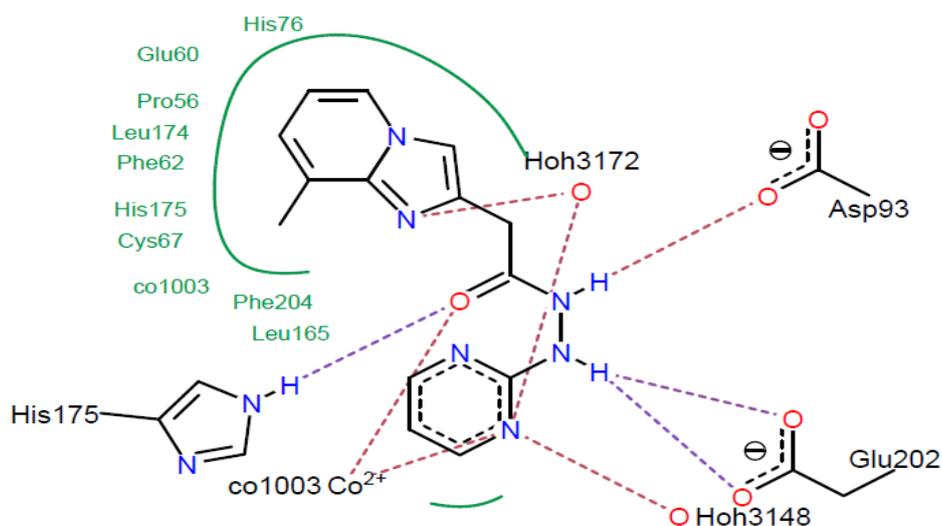


Figure V. 19. Résultat de docking avec FlexX de l'inhibiteur ZINC72280453 avec le site actif de *S.aureus* MetAP

De nombreuses interactions de type hydrophobe assurent également la stabilité du complexe *S.aureus* MetAP- ZINC72280453. Ces interactions sont formées entre l'inhibiteur et les résidus Pro56, Glu60, Phe62, Cys67, His76, Leu165, Leu174, His175, phe204 et Co1003 du site actif de l'enzyme (figure V.20).

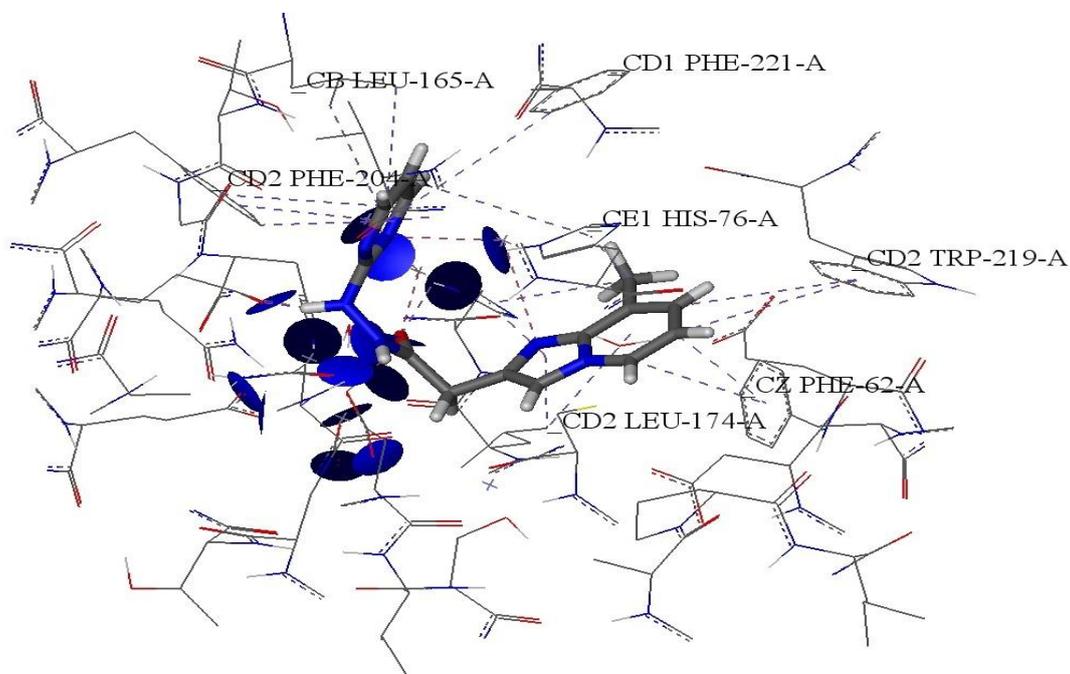


Figure V. 20. Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé ZINC72280453 avec le site actif de *S.aureus* MetAP

III.4.8. Interaction *S.aureus* MetAP - ZINC04139358

Le programme de criblage FlexX nous a permis de prédire l'énergie d'interaction entre l'inhibiteur ZINC04139358 et la MetAP de *S.aureus* qui s'évalue à -46.682 KJ/mole. Ces résultats s'expriment visuellement par la mise en place de nombreuses interactions entre l'enzyme et cet inhibiteur (figure V.21).

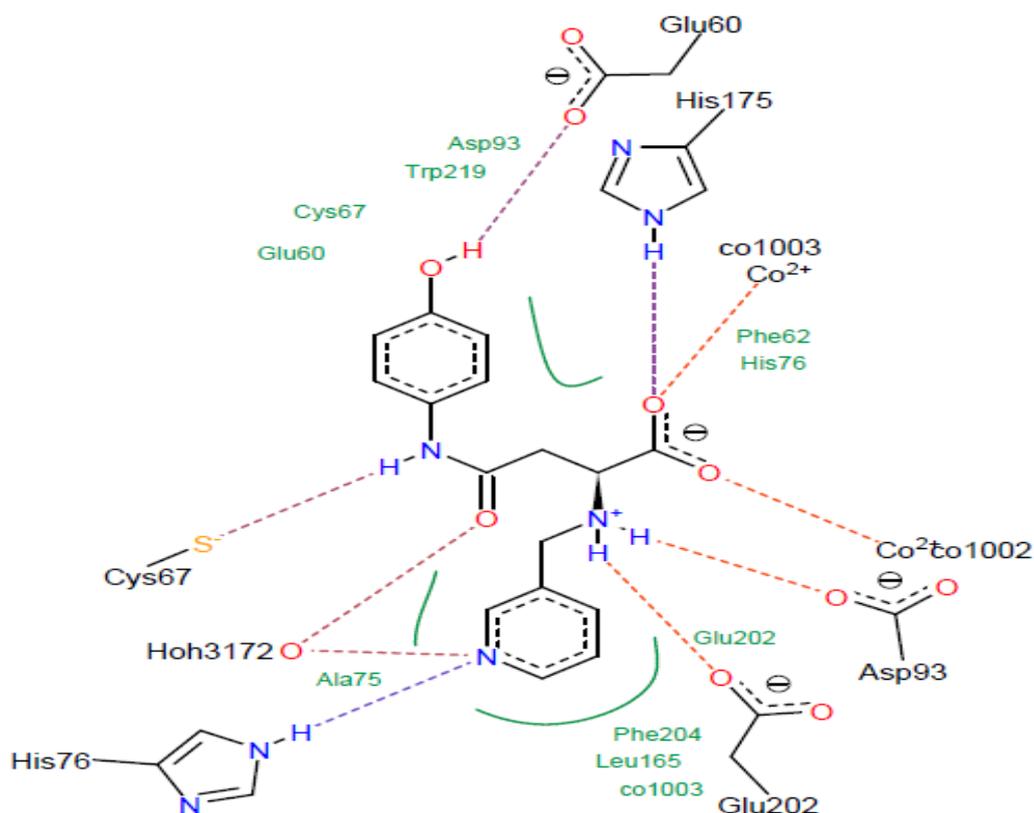


Figure V. 21. Mode de liaison de composé ZINC04139358 avec le site actif de *S.aureus* MetAP

L'inhibiteur ZINC04139358 forme plusieurs ponts hydrogène avec les résidus de site actif, dans le tableau V.13 nous avons résumé ces liaisons. En plus, des interactions de type hydrophobe sont également observées avec les résidus Glu60, Phe62, Cys67, His76, Asp93, Leu165, Phe204 et Trp219 (Figure V.22).

Tableau V. 13. Les interactions formées par l'inhibiteur ZINC04139358

Liaisons	Résidus du site actif	Atome de site actif	Atome du ZINC04139358	Distance Å
1	Glu60	O _{E1}	H ₃₈ -O ₂₁	2.20
2	Cys67	S _G	H ₃₃ -N ₁₄	2.40
3	His76	N _{E2} -H _{E2}	N ₅	2.55
4	Asp93	O _{D1}	H ₄₀ -N ₈	1.56
5	His175	N _{E2} -H _{E2}	O ₂₄	2.25
6	Glu202	O _{E1}	H ₃₉ -N ₈	2.06
7	Co1002	-	O ₂₃	1.80
8	Co1003	-	O ₂₄	1.90
9	H ₂ O3172	O	O ₁₃	2.87
10		O	N ₅	2.63

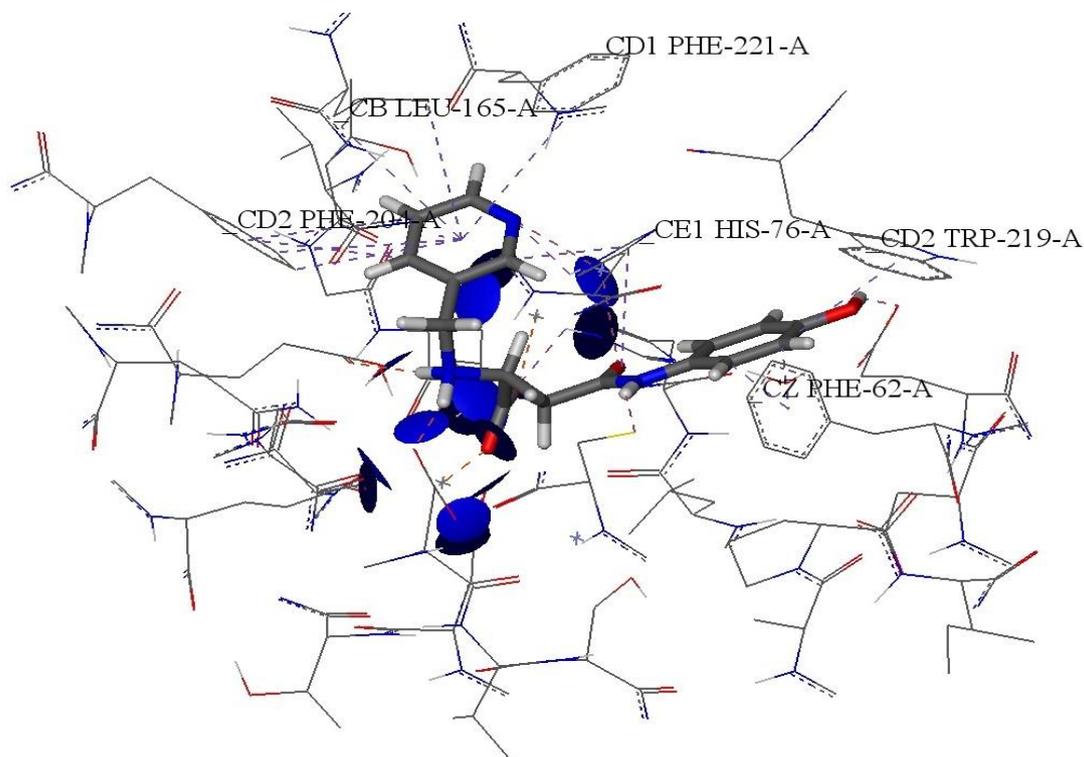


Figure V. 22. Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur ZINC04139358 avec le site actif de la *S.aureus*MetAP

III.4.9. Interaction MtMetAP- ZINC31308822

Le docking du composé (Z)-4-[3-[[[(Z)-4-hydroxy-4-oxo-but-2-enoyl]amino]anilino]-4-oxo-but-2-enoic (ZINC31308822) dans le site actif de la MtMetAP donne l'une des meilleures énergies d'interaction obtenue jusque là soit -48.642Kj/mole.

Comme le montre la figure V.23, l'inhibiteur ZINC31308822 établit 7 liaisons hydrogène avec le site actif de la MtMetAP. Les liaisons de type hydrogène observées lors de l'interaction sont représentées dans le tableau V.14 ci-dessous. De plus, la stabilité du complexe MtMetAP- ZINC31308822 est également assurée par de nombreuses interactions hydrophobiques observées avec les résidus His114, Phe202, Phe211 et His212.

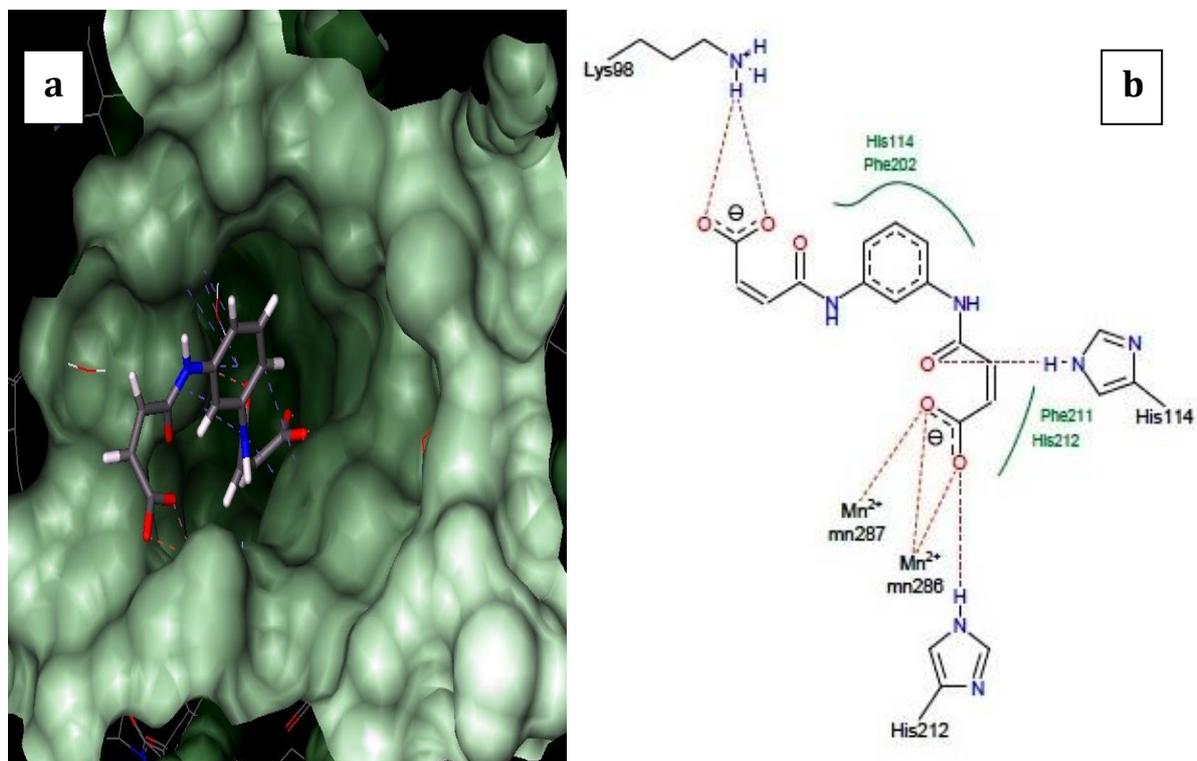


Figure V. 23. Représentation de l'inhibiteur ZINC31308822 dans le site actif de la MtMetAP par FlexX. **a** : Le composé ZINC31308822 se niche dans la poche catalytique. **b** : Représentation des interactions formées par l'inhibiteur ZINC31308822

Tableau V. 14. Liaisons formées par l'inhibiteur ZINC31308822.

Liaisons	Résidus du site actif	Atome d'acide aminé	Atome du ZINC31308822	Distance Å
1	Lys98	N-H _Z	O ₂₂	2.08
2			O ₂₁	2.26
3	His114	N _{E2} -H _{E2}	O ₉	1.94
4	His212	N _{E2} -H _{E2}	O ₁₄	1.96
5	Mn286	-	O ₁₃	2.19
6		-	O ₁₄	2.12
7	Mn287	-	O ₁₃	2.16

III.5. Prédiction de la similarité médicamenteuse

Le faible taux de succès de la conversion des composés "hits" en médicaments en raison de paramètres pharmacocinétiques défavorables a suscité un regain d'intérêt pour comprendre plus clairement ce qui fait qu'un composé ressemble à un "médicament". Les propriétés pharmacocinétiques, notamment l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du médicament, jouent un rôle important dans son efficacité. Par conséquent, la prédiction des propriétés ADME-Tox au début du processus de développement d'un médicament sont largement acceptés (Wang et *al.*, 2009). Nous allons présenter dans cette partie de travail quelques règles qui constituent un ensemble de lignes directrices relatives aux propriétés structurales des composés, utilisées pour le calcul rapide des propriétés ADME-Tox d'une molécule.

Nous avons prédit les paramètres pharmacocinétiques et de toxicité des meilleurs inhibiteurs de la MetAP bactérienne en utilisant les serveurs SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) et PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr>). Les valeurs des propriétés observées sont montrées dans les tableaux qui suivent.

III.5.1. Propriétés pharmacocinétiques

Selon le tableau V.15 suivant, la barrière hémato-encéphalique est imperméable à tous les composés à l'exception de l'inhibiteur ZINC01396580. Tous les composés ont également montré une forte possibilité d'absorption gastro-intestinale. De plus, SwissADME permet d'estimer si un produit chimique est inhibiteur ou non des isoenzymes du cytochrome P450 (CYP). Les isoenzymes du CYP sont responsables de la biotransformation des médicaments. Les modèles renvoient «Oui» ou «Non» si les neuf composés étudiés présentent une probabilité plus élevée d'être inhibiteur ou non inhibiteur d'un CYP donné. Les composés ZINC05515132, ZINC15085593, ZINC04139358 et ZINC31308822 ne sont pas des inhibiteurs pour les isoenzymes cytochrome P450, contrairement au reste des molécules qui inhibent l'une de CYP. La connaissance de cette inhibition est importante pour voir les interactions médicamenteuses et éviter leur risque.

Tableau V.15. Propriétés pharmacocinétiques des petites molécules obtenues à partir de serveur SwissADME

Propriétés	ZINC 05515132	ZINC 04785369	ZINC 03307916	ZINC 15085593	ZINC 01396580	ZINC 15880082	ZINC 72280453	ZINC 04139358	ZINC 31308822
Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique	non	non	non	non	oui	non	non	non	non
Absorption gastro-intestinale	élevée								
Inhibition de CYP1A2	non	oui	non	non	oui	oui	oui	non	non
Inhibition de CYP2C19	non	non	non	non	oui	non	non	non	non
Inhibition de CYP2C9	non	non	oui	non	non	non	non	non	non
Inhibition de CYP2D6	non								
Inhibition de CYP3A4	non								

III.5.2. La toxicité

Dans le but de vérifier la toxicité des inhibiteurs de la MetAP, plusieurs paramètres ont été déterminés *in silico*. Dans le tableau V.16 ci-dessous nous avons résumé ces résultats.

Tableau V.16. Le profil de toxicité relative des composés étudiés obtenus à partir de serveur preADMET

Paramètre	ZINC 05515132	ZINC 04785369	ZINC 03307916	ZINC 15085593	ZINC 01396580	ZINC 15880082	ZINC 72280453	ZINC 04139358	ZINC 31308822
CR souris	négative	négative	négative	négative	négative	négative	positive	négative	positive
CR rats	négative	négative	négative	négative	négative	négative	positive	négative	positive
Test d'Ames	mutagène	Non mutagène							
Inhibition de hERG	faible risque	faible risque	faible risque	risque moyen	risque moyen	risque moyen	risque moyen	risque moyen	risque moyen
Algae-at	0.139027	0.069964 1	0.015195 4	0.149907	0.078826	0.098782	0.102252	0.07818	0.114234
Daphnia- at	0.120942	0.217985	0.029085 7	0.547631	0.0827927	0.615952	0.548877	0.609952	0.555806
Medak-at	0.028156 4	0.078246 4	0.001953 34	0.441582	0.0120588	0.672382	0.47227	0.584204	0.486959
Minnow-at	0.109318	0.086277 5	0.001651 78	0.560295	0.0124547	0.893135	0.471651	0.862353	0.321288

La prédiction de la toxicité montre que tous les inhibiteurs de la MetAP présentent des propriétés cancérogènes négatives concernant le test sur les souris et sur les rats (CR) à l'exception des composés ZINC72280453 et ZINC31308822. Les études de toxicité chez les rongeurs ont joué un rôle central dans l'identification des composés potentiellement dangereux pour l'homme. Cependant, nous avons noté que tous les composés étudiés présentent un effet mutagène, pouvant donc induire des modifications génétiques à l'exception de l'inhibiteur ZINC31308822 qui révèle un effet non mutagène. Nous avons également noté un risque moyen d'inhibition de gène hERG par ces molécules, à l'exception des composés ZINC05515132, ZINC04785369 et ZINC03307916. Rappelons que le blocage

de ce gène peut aboutir à un arrêt cardiaque. Concernant les tests utilisant les espèces aquatiques, un bon résultat à été démontré pour la totalité des composés.

En conclusion, la plupart des inhibiteurs de la MetAP bactérienne étudiés répondent favorablement aux critères pharmacocinétiques et toxicologiques. Ces informations sont très utiles lors de leur optimisation et développement pour devenir des candidats médicaments.

Activité antibactérienne *in vitro*

IV.1. Activité antibactérienne sur *Mycobacterium smegmatis*

Les neuf composés sélectionnés ont été testés *in vitro* pour leurs activités antibactériennes sur la bactérie *Mycobacterium smegmatis*.

La méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des composés testés vis-à-vis de la souche bactérienne. On observe que la bactérie étudiée réagit différemment aux composés testés. Les résultats du test de sensibilité microbienne aux composés sont regroupés dans le tableau V.17. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures.

Tableau V.17. Inhibition de la croissance de *Mycobacterium smegmatis*

Composés testés	Quantité de composé / disque (100mM/8µl) (500nmole/disc)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
1	ZINC15880082	-
2	ZINC15085593	-
3	ZINC04139358	-
4	ZINC05515132	-
5	ZINC01396580	07± 0.5
6	ZINC31308822	6.5± 0.5
7	ZINC04785369	19± 0.5
8	ZINC72280453	-
9	ZINC03307916	-
10	Isoniazide (5mM/ 6 µl)	35± 0.5

- Pas d'activité

Les résultats de l'antibiogramme ont montré que la moyenne des zones d'inhibition produites contre la bactérie variait de 6,5 à 19 mm (figure V.24). Parmi les composés testés, seul l'inhibiteur ZINC04785369 (composé N7) était capable d'inhiber la croissance de *M. smegmatis*. Par contre, les autres composés n'ont pas d'effet inhibiteur significatif car les diamètres d'inhibition n'ont pas dépassé 06 mm pour l'espèce testée. La majorité de ces composés sont probablement incapables de traverser la paroi bactérienne de *M. smegmatis*. Par ailleurs, les espèces de Mycobacterium sont uniques parmi les bactéries à Gram positif en produisant une paroi cellulaire complexe sert de barrière de perméabilité qui empêche l'entrée d'agents chimio thérapeutique (Daffé et *al.*, 1998 ; Jackson et *al.*, 2014 ; Bansal-Mutalik et Nikaido, 2014).

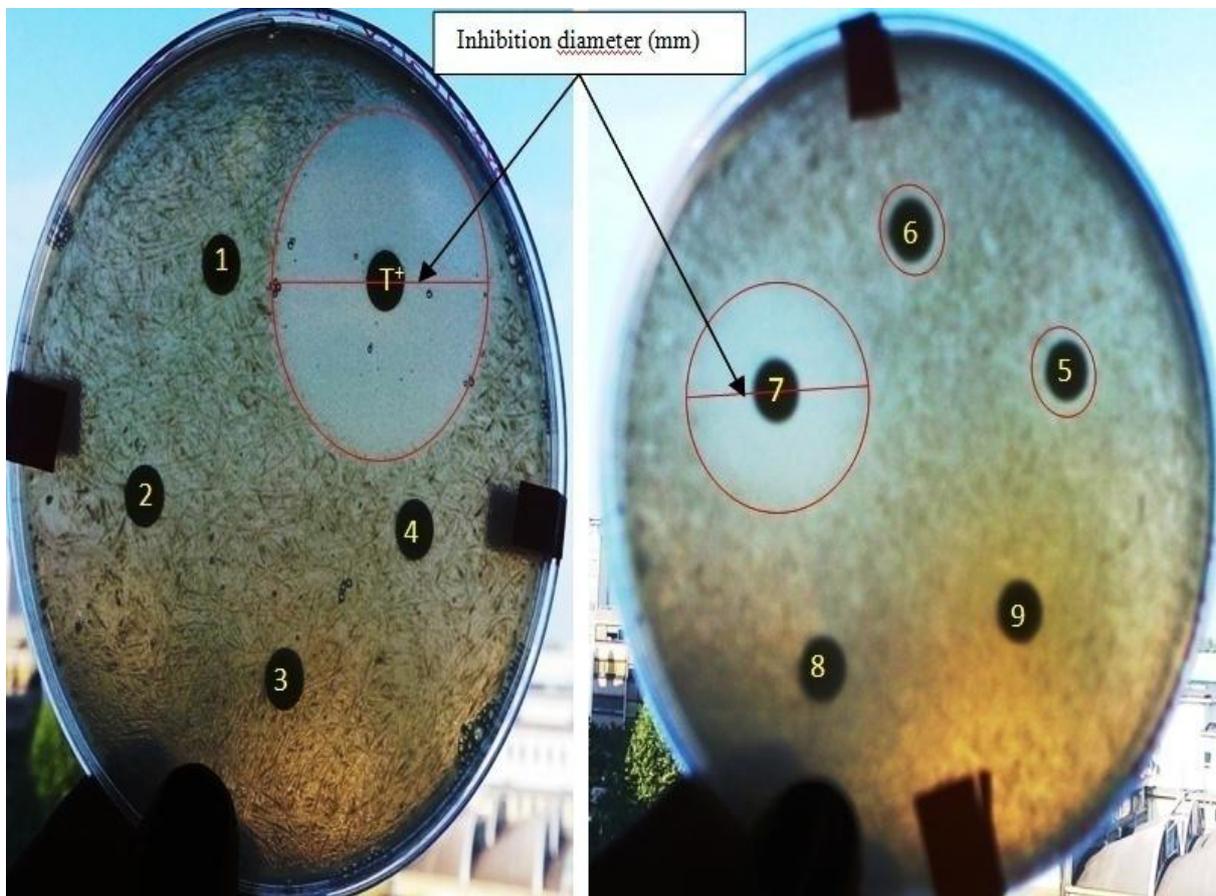


Figure V.24. Photographies de la zone inhibitrice des composés testés sur la souche bactérienne *M. smegmatis*

Le produit actif de la précédente étude a été testé de nouveau pour confirmer les résultats obtenus. Le même antibiogramme a été répété pour le composé N7, avec des dépôts croissants (2, 4, 6 et 8 μ l). Les diamètres de la zone d'inhibition sont donnés par rapport à la

quantité de l'inhibiteur déposée sur le disque. Les résultats sont représentés sous la forme d'un tableau (tableau V.18), fournissant les diamètres mesurés pour chaque concentration de composé N7. L'expérience a été effectuée en triple et les résultats sont exprimés sous forme de valeurs moyennes de trois mesures.

Tableau V.18. Inhibition de la croissance de *M. smegmatis* avec le composé ZINC04785369

Composé	Zones d'inhibition en mm				Isoniazide (6µl/disque) (4 µg/disque)
	(2µl/disque) (55 µg/disque)	(4µl/disque) (109 µg/disque)	(6µl/disque) (164 µg/disque)	(8µl/disque) (218 µg/disque)	
<i>M. smegmatis</i>	-	10± 0.5	16± 0.5	18± 0.5	27± 1

Selon les résultats obtenus, il est clair que le composé ZINC04785369 (composé N7) est à l'origine de zones importantes d'inhibition contre *M. smegmatis* où les diamètres varient entre 10 et 18 mm (figure V.25). Nous notons que l'activité antibactérienne du composé testé a augmenté avec l'augmentation de sa concentration. Le composé N7 (dérivé de la quinazoline) est un inhibiteur efficace de la croissance de *M. smegmatis*.

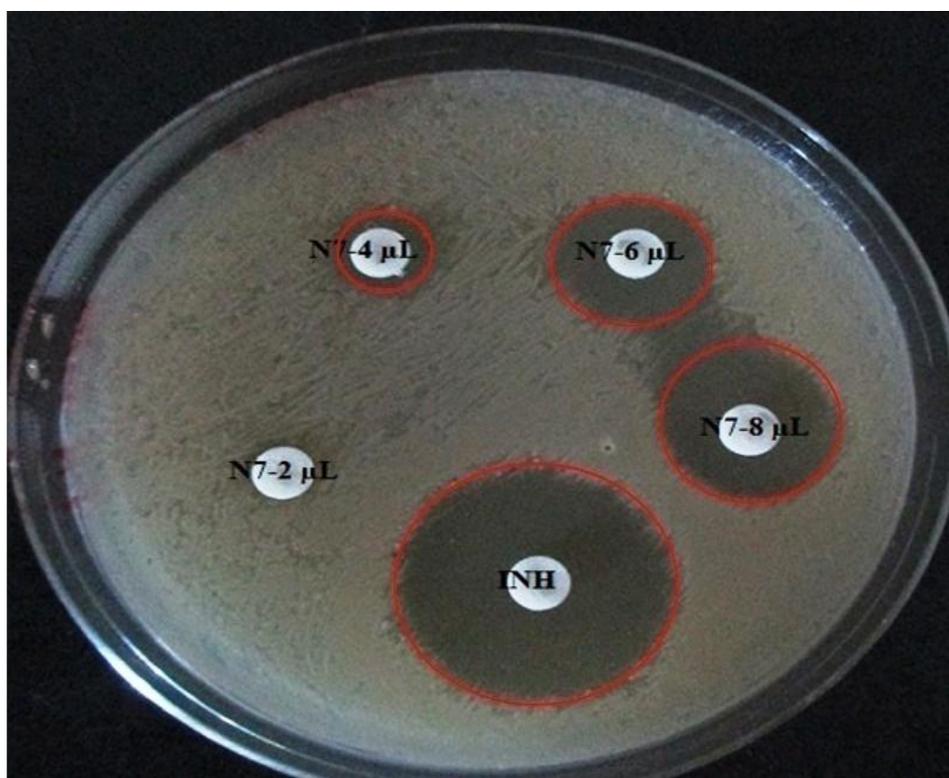


Figure V.25. Diamètre des zones d'inhibition pour l'inhibiteur ZINC04785369

IV.2. Activité inhibitrice sur les souches bactériennes *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*

L'activité antimicrobienne de chaque inhibiteur de MetAP a été testée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé contre une bactérie Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et deux bactéries Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Les résultats du test de sensibilité microbienne aux composés sont regroupés dans le tableau V.19. Les valeurs indiquées sont la moyenne de deux mesures.

Tableau V.19. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance de trois souches bactériennes

Composé testé	Code des inhibiteurs (500nmole/disc)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	ZINC15880082	-	-	-
2	ZINC15085593	-	-	-
3	ZINC04139358	-	-	-
4	ZINC05515132	-	-	-
5	ZINC01396580	-	-	-
6	ZINC31308822	-	-	-
7	ZINC04785369	10± 0.2	10±0.5	-
8	ZINC72280453	-	-	-
9	ZINC03307916	06±0.5	10±0.5	-
10	Ciprofloxacin*	25± 0.5	23± 0.5	30± 0.5

(-) Pas d'activité ; (*) 5 µg/disc.

Les résultats du tableau V.19 montrent que le degré de sensibilité de chaque bactérie vis à vis des composés est différent d'une espèce à une autre. La moyenne des zones d'inhibition produites contre les bactéries variait de 06 à 10 mm (figure V.26). En effet, le composé N7 exerce une activité sur les bactéries *E. coli* et *S. aureus*, suivi par le composé N9 qui inhibe seulement la croissance de *S. aureus*. Toutefois, les zones d'inhibition ont été plus faibles que celle de l'antibiotique, qui présentait une très grande zone d'inhibition de la croissance bactérienne. Par contre, les autres composés n'ont pas d'effet inhibiteur détectable sur les espèces testées. En ce qui concerne *P. aeruginosa*, aucun des composés n'a été capable

d'inhiber sa croissance. Cette bactérie possède un potentiel de résistance élevé par rapport aux autres espèces (Mérens et *al.*, 2011).

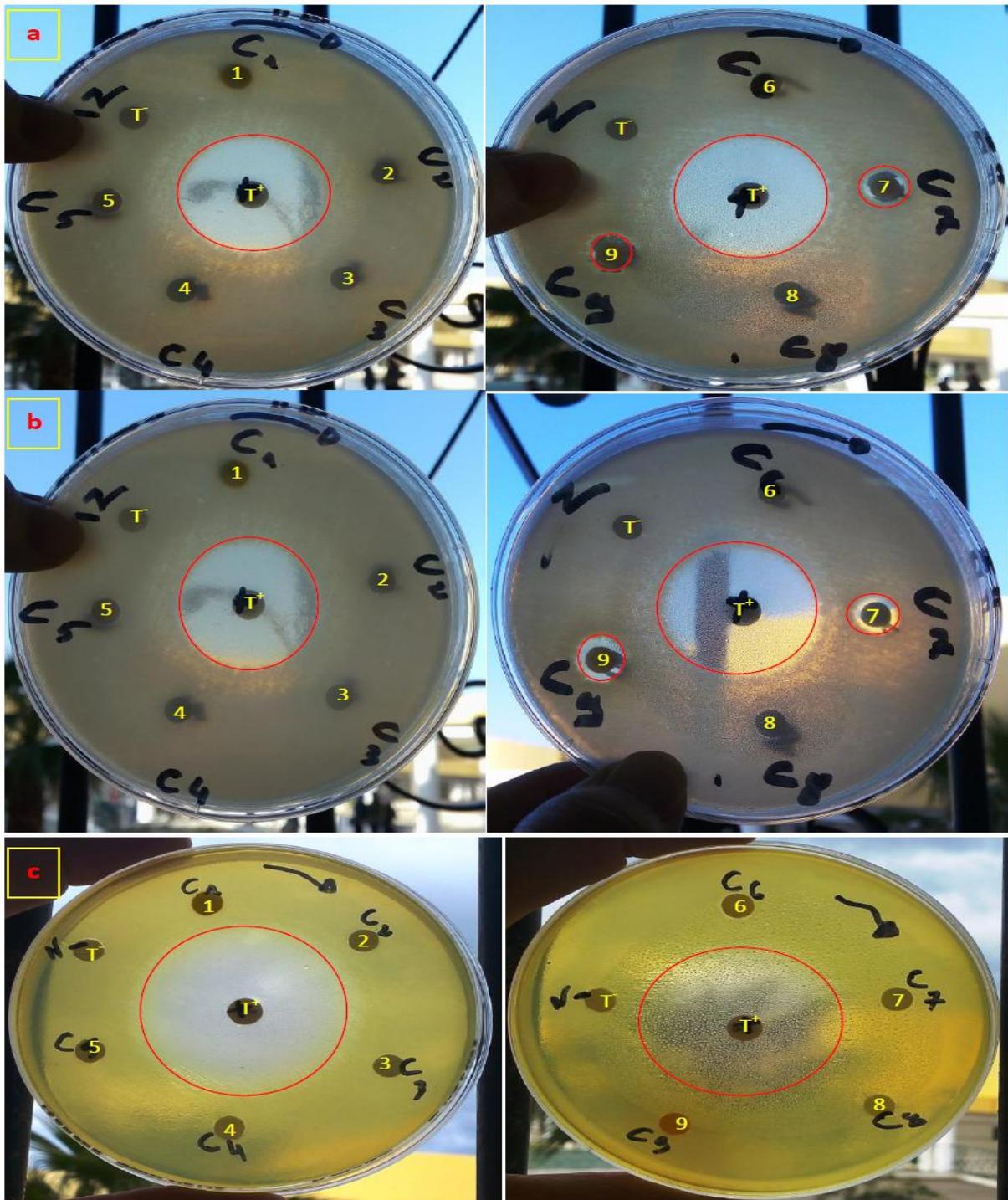


Figure V.26. Photographies de la zone inhibitrice des composés testés sur les souches bactériennes : (a) *E. coli*, (b) *S. aureus* et (c) *P. aeruginosa*. T⁻ : Le contrôle négatif (DMSO) n'a montré aucune activité. T⁺ : Le témoin positif. Les ronds rouges indiquent le diamètre d'inhibition.

Ces résultats ont montré que *S. aureus* était plus sensible que *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cette sensibilité, plus marquée des Gram⁺ par rapport aux Gram⁻ vis-à-vis des inhibiteurs, a été déjà observée dans plusieurs études antérieures (Vaara, 1992). La grande résistance des bactéries à Gram⁻ est liée en partie à la complexité de la paroi cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram⁺ (Silhavy et al., 2010). On sait que cette double membrane est impliquée dans la sensibilité plus faible des bactéries Gram négatives aux antibiotiques par rapport à celle des Gram positifs, elle ne permet pas l'entrée des antimicrobiens (Masi et al., 2017 ; Domalaon et al., 2018).

IV.3. Détermination des CMI des meilleurs composés

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode standardisée de microdilution en milieu liquide (microplaque 96 puits à fond « U », Greiner), en collaboration avec le laboratoire « Transporteurs Membranaires, Chimiorésistance et Drug-Design. UMR_MD1. Faculté de Médecine, Université de Marseille (France) ». Sous la direction de Dr Jean Michel BOLLA (Chargé de Recherche à l'Inserm). Les résultats sont présentés à la figure V.27 et au tableau V.20 ci-dessous.

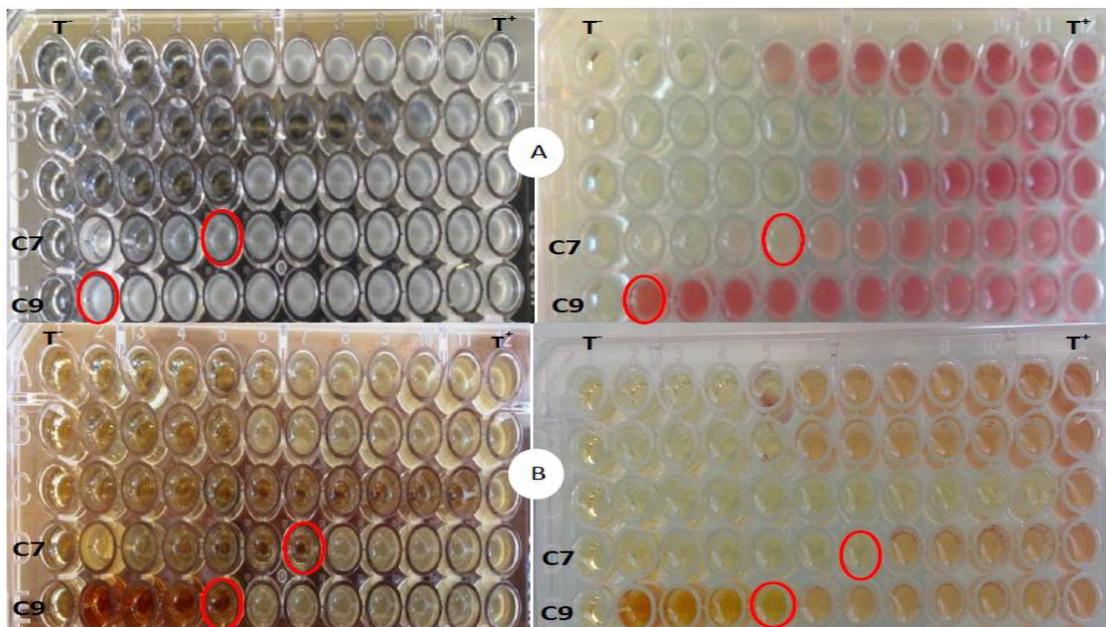


Figure V.27. Utilisation des microplaques pour la détermination des CMI. La plaque A correspond à *E. coli* en présence et en absence de l'INT, la plaque B correspond à *S. aureus* en présence et en absence de l'INT. Les ronds noirs indiquent la CMI de composé testé.

Nous rapportons dans le tableau V.20 les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de nos composés vis-à-vis des deux bactéries testées (*E. coli* et *S. aureus*).

Tableau V.20. Valeur de la CMI pour les meilleurs inhibiteurs relatifs aux bactéries testées

Composé	Concentration minimale inhibitrice (CMI) (µg/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
7 : ZINC04785369	256	64
9 : ZINC03307916	≥1024	256
Erythromycine	512	64

Les résultats des CMI ont confirmé ceux obtenus par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. La CMI du composé N7 est respectivement de 256 et 64 µg / mL pour *E. coli* et *S. aureus*. Le composé N9 a présenté quant à lui une CMI de 256 µg / mL contre la souche de *S. aureus*. Le composé N7 appartient aux dérivés de la quinazoline dont il a été rapporté qu'ils possédaient un large spectre d'activités biologiques. Les résultats obtenus dans notre étude étaient cohérents avec ceux trouvés par d'autres auteurs. En effet, Jantová et *al.*, (2004), Khodarahmi et *al.*, (2012) et Zayed & Hassan, (2014) ont constaté que les dérivés de quinazoline présentaient des activités antimicrobiennes prometteuses.

Ces résultats sont parfaitement compatibles à ceux révélés par le criblage *in silico*. Les composés 7 (ZINC04785369) et 9 (ZINC03307916) ont montré de bonnes interactions avec le site actif de l'enzyme MetAP. Le résultat d'amarrage est montré visuellement par l'établissement de nombreuses interactions hydrophobes et hydrophiles entre divers résidus d'acides aminés de site actif et ces inhibiteurs. Le composé 7 forme le complexe MetAP-inhibiteur le plus stable avec un meilleur effet inhibiteur et une valeur d'énergie de liaison égale à -40,549 kj/mole pour *E. coli*, -37,004 kj/mole pour *M. tuberculosis* et à -32,142 kj/mole pour *S. aureus*; suivi du composé 9 avec un score de -40,273 kj/mole pour *E. coli* et de -30, 100 kj/mole pour *S. aureus*. De plus, nous avons observé que le composé 7 présentait une activité faible mais significative sur les deux, Gram positif et Gram négatif, démontrant sa capacité à traverser l'enveloppe de cette bactérie et à atteindre sa cible intracellulaire.

Dans cette étude, nous avons identifié deux nouveaux inhibiteurs potentiels de la MetAP bactérienne de la chimiothèque ZINC en appliquant une stratégie combinant un criblage virtuel basé sur la structure de la cible et des tests microbiologiques. Ainsi, ces résultats sont particulièrement encourageants pour le développement de cette approche avec des applications thérapeutiques possibles pour les composés étudiés ici.

De nombreux exemples de criblage virtuel réussi ont été décrits ces dernières années (Samal et *al.*, 2015; Petersen et *al.*, 2015; Kokkonen et *al.*, 2015; Helgren et *al.*, 2017; Nastasa et *al.*, 2018; Mishra et *al.*, 2019). A partir de structures de protéines cristallographiques à haute résolution et de banques de données chimiques préalablement filtrées, de taille et de diversité différente. Ce processus vise à limiter l'espace chimique des composés de départ à une liste de composés ayant le plus de chances d'obtenir de bons résultats lors des tests expérimentaux afin d'éviter de tester les molécules inutiles. De plus, 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). Enfin, on peut dire que le criblage virtuel *in silico* peut faciliter dans certains cas la découverte de molécules susceptibles d'avoir des applications thérapeutiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

Adams C., Brantner B. 2006. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars ? *Health Affairs*. **25** (2), 420-428.

Addlagatta A., Quillin M. L., Omotoso O., Liu J. O., Matthews B. W. 2005. Identification of an SH3-binding motif in a new class of methionine Aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a mode of interaction with the ribosome. *Biochemistry*. **44**, 7166-7174.

Alex A.A., Millan D.S. Contribution of Structure-Based Drug Design to the Discovery of Marketed Drugs, in Drug Design Strategies, D.D. Livingstone, A.M., Editor. 2009. 498p.

Altmeyer M. A., Marschner A., Schiffmann R., Klein C. D. 2010. Subtype-selectivity of metal-dependent methionine aminopeptidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **20**, 4038-4044.

Altmeyer M., Amtmann E., Heyl C., Marschner A., Scheidig A.J., Klein C.D. 2014. Beta-aminoketones as prodrugs for selective irreversible inhibitors of type-1 methionine aminopeptidases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **24** (22), 5310-5314.

Arfin S.M., Kendall R.L., Hall L., Weaver L.H., Stewart A.E., Matthews B.W., Bradshaw R.A. 1995. Eukaryotic methionyl aminopeptidases: two classes of cobalt-dependent enzymes Proc. *National Academy of Sciences of the USA*. **92**, 7714-7718.

Archambaud M. 2009. Les Antibiotiques. Mode d'action. Mécanismes de Résistance. Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse.

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 en Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. France : Université d'Orléans, 2007, 183 p.

Ascione A. 2012. Boceprevir in chronic hepatitis C infection: a perspective review. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. **3** (3), 113-121.

Bansal-Mutalik R., Nikaido H. 2014. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **111** (13), 4958-4963.

Beautrait A. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel vsm-g tt étude du domaine fat de la kinase d'adhérence focale FAK. Thèse de doctorat en Chimie Informatique et Théorique. France : Université Henri Poincaré. Nancy, 2008, 242 p.

Berman H. M. 2008. The Protein Data Bank: a historical perspective. *Acta Crystallographica*. **A64**, 88-95.

Bernier S.G., Taghizadeh N., Thompson C.D., Westlin W.F., Hannig G. 2005. Methionine aminopeptidases type I and type II are essential to control cell proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry*. **95**, 1191-1203.

Bissantz C., Folkers G., Rognan D. 2000. Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases. 1. Evaluation of Different Docking/Scoring Combinations. *Journal of Medicinal Chemistry*. **43** (25), 4759-4767.

Böhm H. J. 1992. The computer program LUDI: a new method for de novo design of enzyme inhibitors. *Journal of Computer-aided Molecular Design*. **6**, 61-78.

Boucherit H. Etude théorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la méthionine aminopeptidase de *mycobacterium tuberculosis* par diverses molécules. Mémoire de magister : Technologies des explorations biochimiques. Algérie : Université Mentouri de Constantin1, 2012, 110 p.

Boufous E. H., Vadeboncoeur C. 2003. Purification and characterization of the *Streptococcus salivarius* methionine aminopeptidase (MetAP). *Biochimie*. **85**, 993-997.

Boxem M., Tsai C.W., Zhang Y., Saito R. M., Liu J. O. 2004. The *C. elegans* methionine aminopeptidase 2 analog map-2 is required for germ cell proliferation. *FEBS Letters*. **576**, 245-250.

Bradshaw R. A., Brickey W. W., Walker K. W. 1998. N-terminal processing: the méthionine aminopeptidase and N^α-acetyl transferase families. *Trends in Biochemical Sciences*. **23** (7), 263-267.

Brdlik C. M., Crews C. M. 2004. A single amino acid residue defines the difference in ovalicin sensitivity between type i and ii methionine aminopeptidases. *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 9475-9480.

Burnichon N., Texier A. 2003. L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques. [En ligne] <https://studylibfr.com/doc/908568/l--antibiogramme>. Consulté le [30-06-2018].

Centre national de la recherche scientifique. DUD-E. [En ligne] <http://dude.docking.org>. Consulté le [29-06-2018].

Chakraborti K. A., Thilagavathi R. 2003. Computer-aided design of non sulphonyl COX-2 inhibitors: Molecular Docking of Structurally Diverse Cyclooxygenase-2 Inhibitors using FlexX Method. *Internet Electronic Journal of Molecular Design*. **3**, 704-719.

Charifson P.S, Walters W.P. 2002. Filtering databases and chemical libraries. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **16**, 311-323.

Chen J., Lyne P.D., Giordantto F., Lovell T., Li J. 2006. On evaluating molecular-docking methods for prédiction and Enrichment Factors. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **46** (1), 401-415.

Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase substances antibactériennes à l'aide de techniques de « docking » (arrimage) moléculaire. Thèse de doctorat en Microbiologie. Algérie : Université Mentouri Constantine1, 2007, 126 p.

Chikhi A., Bensegueni A. 2010. In Silico Study of the Selective Inhibition of Bacterial Peptide Deformylases by Several Drugs. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*. **3**, 61-65.

Chiu C. H., Lee C. Z., Lin K. S., Tam M. F., Lin L. Y. 1999. Amino Acid Residues Involved in the Functional Integrity of *Escherichia coli* Methionine Aminopeptidase. *Journal of Bacteriology*. **181**, 4686-4689.

Clark D. E. 2008. What has virtual screening ever done for drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery*. **3**, 841-851.

Claussen H., Buning C., Rarey M. 2001. FlexE: Efficient Molecular Docking Considering Protein Structure Variations. *Journal of Molecular Biology*. **308**, 377-395.

Cole J.C., Murray C.W., Nissink J.W.M. 2005. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. *Proteins*. **60**, 325-332.

Colombo A.L., Júnior J.N.A., Guinea J. 2017. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. *Current Opinion in Infectious Diseases*. **30** (6), 528-538.

Comité de l'antibiogramme (CA-SFM). Société Française de Microbiologie. 2017–Edition de janvier 2017 – <http://www.sfm.asso.fr>.

Corbeil C. R. New virtual screening tools for molecular discovery. Thèse de doctorat. Canada : Université McGill Montréal, 2008, 353 p.

Coukell A., Shore C., Jungman E., Talkington K., Kothari P., Urahn S. K. 2016. A Scientific Roadmap for Antibiotic Discovery: A Sustained and Robust Pipeline of New Antibacterial Drugs and Therapies is Critical to Preserve Public Health. *Pew Charitable Trusts*. 1- 42.

Courvalin P., Denis F., Ploy M. C., Garilhe M.P., Trieu-Culot P and Universalis. 2001. « Antibiotiques ». [En ligne] Retrieved 24 mai, 2013, from <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/antibiotiques/>. Consulté le [28-06-2019].

Cvijetić I. N., Verbić T. Ž., Ernesto de Resende P., Stapleton P., Gibbons S., Juranić I. O., Drakulić B. J., Zloh M. 2018. Design, synthesis and biological evaluation of novel aryldiketo acids with enhanced antibacterial activity against multidrug resistant bacterial strains. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **143**, 1474-1488.

Daffé M., Draper P. 1998. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity. *Advances in microbial physiology*. **39**, 131-203.

Daina D., Michielin O., Zoete V. 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*. **7**, 42717.

De la Nuez A., Rodríguez R. 2008. Current methodology for the assessment of ADME-Tox properties on drug candidate molecules. *Biotechnología Aplicada*. **25**, 97-110.

Debellemanière G., et Saleh M. 2015. Anti-infectieux. [En ligne] https://www.emconsulte.com/em/ /2015/html/file_100030.html. Consulter le [29-11-2019].

Didier E. S. 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*. **94**, 61-76.

Douangamath A., Dale G.E., D'Arcy A., Almstetter M., Eckl R., Frutos-Hoener A., Henkel B., Illgen K., Nerdinger S., Schulz H., Mac Sweeney A., Oefner C. 2004. Crystal structures of *Staphylococcus aureus* methionine aminopeptidase complexed with keto heterocycle and aminoketone inhibitors reveal the formation of a tetrahedral intermediate. *Journal of Medicinal Chemistry*. **47**(6), 1325-8.

Domalaon R., Idowu T., Zhanel G. G., Schweizer F. 2018. Antibiotic Hybrids: the Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens? *Clinical Microbiology Reviews*. **31** (2), 1-45.

Duin D.V., Paterson D. 2006. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics of North America*. **30** (2), 377-390.

Ekins S., Nikolsky Y., Nikolskaya T. 2005. Techniques: application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion & tox. *Trends pharmacol science*. **26**, 202-9.

Evdokimov A. G., Pokross M., Walter R. L., Mekel M., Barnett B. L., Amburgey J., Seibel W. L., Soper S. J., Djung J. F., Fairweather N., Diven C., Rastogi V., Grinius L., Klanke C., Siehnel R., Twinem T., Andrews R., Curnow A. 2007. Serendipitous Discovery of Novel Bacterial Methionine Aminopeptidase Inhibitors. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. **66**, 538-546.

Fer M. J., Corre L. L., Pietrancosta N., Evrard-Todeschi N., Olatunji S., Bouhss A., Calvet-Vitale S., Gravier-Pelletier C. 2018. Bacterial Transferase MraY, a Source of Inspiration towards New Antibiotics. *Current Medicinal Chemistry*. **25** (42), 6013-6029.

Ferreira L. G., Dos Santos R. N., Oliva G., Andricopulo A. D. 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. **20**, 13384-13421.

Flandrois J. P. Bactériologie Médicale. Coll Azay. Puf, Presses universitaires de Lyon. 2000. 300 p.

Fox W. Statistiques Sociales. 3^{ème} édition. France : De Boeck, 1999, 374 p.

Frottin F., Martinez A., Peynot P., Mitra S., Holz R.C., Meinnel T. 2006. The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Molecular & Cellular Proteomics*. **5** (12), 2336-2348.

Frottin F. Analyse intégrative du rôle de l'excision de la méthionine N-terminale dans le cytoplasme des eucaryotes supérieurs. Thèse de doctorat en Biologie. France : Université Paris XI, 2011, 286 p.

Genné D., Siegrist H.H. 2003. De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Medical Suisse*. **20**, 464- 468.

Ghosh S., Nie A., An J., Huang Z. 2006. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. **10** (3), 194-202.

Giganti D., Guillemain H, Spadoni J. L., Nilges M., Zagury J.F., Montes M. 2010. Comparative Evaluation of 3D Virtual Ligand Screening Methods: Impact of the Molecular Alignment on Enrichment. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **50**, 992-1004.

Giglione C., Serero A., Pierre M., Boisson B., Meinnel T. 2000. Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *The EMBO Journal*. **19**, 5916-5929.

Giglione C., Boularot A., Meinnel T. 2004. Protein N-terminal methionine excision. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **61**, 1455-1474.

Gillet V. J. 2013. Ligand-Based and Structure-Based Virtual Screening. [En ligne] content.ebi.ac.uk/1-valgillet-ligand-basedandstructure-basedvirtualsecreening-150324123808-conversion-gate01.pdf. Consulté le [24-11-2019].

Gnuplot homepage. [En ligne] <http://www.gnuplot.info>. Consulté le [13-01-2019].

Goujon E. Etude de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de photo dégradation. Thèse de doctorat en Physiologie et Génétique Moléculaires. France : Université Blaise Pascal, 2015, 156 p.

Grosdidier A. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie. France : Université Joseph Fourier, 2007, 90 p.

Guillemain H. Evaluation et application de méthodes de criblage *in silico*. Thèse de doctorat en Bioinformatique. France : Le Cnam Paris, 2012, 246 p.

Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. 2002. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. **47**, 409-443.

Helgren T.R., Chen C., Wangtrakuldee P., Edwards T.E., Staker B.L., Abendroth J., Sankaran B., Housley N.A., Myler P.J., Audia J.P., Horn J.R., Hagen T.J., Prowazekii R. 2017. Methionine aminopeptidase as a promising target for the development of antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **25** (3), 813-824.

Herbst R.S., Fukuoka M., Baselga J. 2004. Gefitinib--a novel targeted approach to treating cancer. *Nature Reviews Cancer*. **4** (12), 956-65.

Hioual K.S., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Boucherit H., Mokrani E.H., Teniou S., Merabti B. 2004. Successful challenge: A key step in infectious diseases treatment using computer-aided drug design. *International Journal of Biological Sciences*. **1**, 11-14.

Hirel P. H., Schmitter J. M., Dessen P., Fayat G., Blanquet S. 1989. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Biochemistry*. **86**, 8247-8251.

Hou T., Xu X. 2004. Recent Development and Application of Virtual Screening in Drug Discovery: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*. **10**, 1011-1033.

Huang N., Shoichet B.K., Irwin J.J. 2006. Benchmarking Sets for Molecular Docking. *Journal of Medicinal Chemistry*. **49** (23), 6789-6801.

Huang M., Xie S.X., Ma Z.Q., Huang Q.Q., Nan F.J., Ye Q.Z. 2007. Inhibition of Monometalated Methionine Aminopeptidase: Inhibitor Discovery and Crystallographic Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*. **50** (23), 5735-5742.

Irwin J.J., Shoichet B.K. 2005. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **45** (1), 177-182.

Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S., Coleman R.G. 2012. Zinc: A free tool to discover chemistry for biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **52**, 1757-1768.

Jackson, M. 2014. The Mycobacterial Cell Envelope-Lipids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 4 (10), a021105.

Jantová S., Stankovský S., Špirková K. 2004. In vitro antibacterial activity of ten series of substituted quinazolines. *Biologia, Bratislava*. **59** (6), 741-752.

Jocley Q. A., Josélia A. L., Angelo C P., Ricardo B .A., Magaly G. A. 2011. Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*. **17**, 1401-1412.

Jyoti T., Shrayanee D., Zeeshan F., Saif H. 2014. Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. ID 541340: 1-7.

Kanudia P., Mittal M., Kumaran S., Chakraborti P. 2011. Amino-terminal extension present in the methionine aminopeptidase type 1c of *Mycobacterium tuberculosis* is indispensable for its activity. *BMC Biochemistry*. **12**, 35. doi: 10.1186/1471-2091-12-35.

Kapetanovic I. M. 2008. Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico chemico-biological approach. *Chemico-Biological Interactions*. **171**(2), 165-176.

Kar S., Roy K. 2013. How far can virtual screening take us in drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery*. **8**(3), 245-261.

Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D. 2004. Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening Accuracy. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. **57**, 225-242.

Khodarahmi G., Jafari E., Hakimelahi G., Abedi D., Rahmani Khajouei M., Hassanzadeh F. **2012. Synthesis of Some New Quinazolinone Derivatives and Evaluation of Their Antimicrobial Activities.** *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **11** (3), 789-797.

Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. **3**, 935-49.

Klebe G et Mietzner T. 1994. A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. *Journal of Computer-aided Molecular Design*. **8**, 583-606.

Klein C. D. P., Folkers G. 2003. Understanding the selectivity of fumagillin for the methionine aminopeptidase type II. *Oncology Research*. **13**, 513-520.

Kokkonen P., Kokkola T., Suuronen T., Poso A., Jarho E., Lahtela-Kakkonen M. 2015. Virtual screening approach of sirtuin inhibitors results in two new scaffolds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **76**, 27-32.

Kore P. P., Mutha M. M., Antre R. V., Oswal R. G., Kshirsagar S. S. 2012. Computer-Aided Drug Design: An Innovative Tool for Modeling. *Open Journal of Medicinal Chemistry*. **2**, 139-148.

Kramer B., Rarey M., Lengauer T. 1999. Evaluation of the FlexX Incremental Construction Algorithm for Protein–Ligand Docking. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. **37**, 228-241.

Kruger E. A., Figg W. D. 2000. Tnp-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. **9**, 1383-1396.

Kufareva I., Abagyan R. 2012. Methods of protein structure comparison. *Methods in Molecular Biology*. **857**, 231-257.

Kumar V., Krishna S., Siddiqi M. I. 2015. Virtual screening strategies: Recent advances in the identification and design of anti-cancer agents. *Methods*. **71**, 64-70.

Labayle D. Guide Pharmaco. Édition lamare, Paris. 2001. 568.

Lagarde N. Méthodes de criblage virtuel in silico: importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6. Thèse de doctorat en Bioinformatique. France : Conservatoire national des arts et metiers, CNAM, 2014, 317p.

Lavecchia A., Di Giovanni C. 2013. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Current Medicinal Chemistry*. **20** (23), 2839-2860.

Le Guilloux V. Développement de méthodes et d'outils chémoinformatiques pour l'analyse et la comparaison de chimiothèques. Thèse de doctorat en Chimie théorique et informatique. France : Université d'Orléans, 2006, 295 p.

Le Guilloux V., Arrault A., Colliandre L. 2012. Mining collections of compounds with Screening Assistant 2. *Journal of Cheminformatics*. **4**, 1-16.

Leopoldini M., Russo N., Toscano M. 2007. Which One among Zn(II), Co(II), Mn(II), and Fe(II) is the Most Efficient Ion for the Methionine Aminopeptidase Catalyzed Reaction? *Journal of the American Chemical Society*. **129**, 7776-7784.

Liao C., Sitzmann M., Pugliese A., Nicklaus M.C. 2011. Software and resources for computational medicinal chemistry. *Future Medicinal Chemistry*. **3** (8), 1057-1085.

Lionta E., Spyrou G., Vassilatis D. K., Cournia Z. 2014. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **14**, 1923-1938.

Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **46**, 3-26.

Liu S., Widom J., Kemp C. W., Crews C. M., Clardy J. 1998. Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. *Science*. **282**, 1324-1327.

Loichot C et Grima M. 2004. Métabolisme des médicaments. Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale DCEM1 2005/2006.

Lowther W.T., Zhang Y., Sampson P.B., Honek J.F., Matthews B.W. 1999. Insights into the Mechanism of *Escherichia coli* Methionine Aminopeptidase from the Structural Analysis of Reaction Products and Phosphorus-Based Transition-State Analogues. *Biochemistry*. **38** (45), 14810-14819.

Lowther W. T., Matthews B. W. 2000. Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1477**, 157-167.

Lowther W.T., Matthews, B.W. 2002. Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. *Chemical Reviews*. **102** (12), 4581-608.

Lu J.P., Ye Q.Z. 2010. Expression and characterization of mycobacterium tuberculosis methionine aminopeptidase type1a. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **20**, 2776-9.

Lu J.P., Yuan X.H., Yuan H., Wang W.L., Wan B., Franzblau S.G., Ye Q.Z. 2011. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidases by bengamide derivatives. *ChemMedChem*. **6** (6), 1041-8.

Luo Q.L., Li J.Y., Liu Z.Y., Chen L.L., Li J., Qian Z., Shen Q., Li Y., Lushington G.H., Ye Q.Z., Nan F.G. 2003. Discovery and structural modification of inhibitors of methionine aminopeptidases from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Medicinal Chemistry*. **46**, 2631-2640.

Lyne P. D. 2002. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug discovery today*. **7**, 1047-1055.

Lynn M., Jonathan G., Todd A., Black. 2003. Peptide deformylase: the first success from genomics efforts. *Nature Reviews Genetics*. **4**, 442-456.

Ma Z.Q., Xie S.X., Huang Q.Q., Nan F.J., Hurley T.D., Ye Q.Z. 2007. Structural analysis of inhibition of *E. coli* methionine aminopeptidase: implication of loop adaptability in selective inhibition of bacterial enzymes. *BMC Structural Biology*. **7**, 84.

Martínez J. L. 2008. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science*. **321** (5887), 365-7.

Masi M., Réfrégiers M., Pos K. M., Pagès J. M. 2017. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nature Microbiology*. **2** (3), 17001.

McGovern S.L., Shoichet B.K. 2003. Information Decay in Molecular Docking Screens against Holo, Apo, and Modeled Conformations of Enzymes. *Journal of Medicinal Chemistry*. **46** (14), 2895-2907.

Mérens A., Delacour H., Plésiat P., Cavallo G. D., Jeanno K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance. *Revue Francophone des Laboratoires*. **41** (435), 49-62.

Merzoug A. Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase. Thèse de Doctorat en biochimie. Algérie : Université Frères Mentouri - Constantine 1, 2018, 193 p.

Mishra R.C., Kumari R., Yadav S., Yadav J.P. 2019. Target Based Virtual Screening of New Leads Inhibitor against Bacterial Cell Division Protein FtsZ for the Discovery of Antibacterial Agents. *Medicinal Chemistry*. doi: 10.2174/1573406415666190206233448.

Mitra S., Job K.M., Meng L., Bennett B., Holz R.C. 2008. Analyzing the catalytic role of Asp97 in the methionine aminopeptidase from *E.coli*. *FEBS Journal*. **275**, 6248-6259.

Monge A. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche *in silico* de nouveaux composés bioactifs. Thèse de doctorat en Chimie théorique et informatique. France : Université d'Orléans, 2006, 186 p.

Muegge I., Oloff S. 2006. Advances in virtual screening. *Drug Discovery Today*. **4** (3), 405-411.

Mullis M M., Rambo I M., Baker B J., Reese B K. 2019. Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02518>.

Mysinger M.M., Carchia M., Irwin J. J., Shoichet B.K. 2012. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*. **55** (14), 6582-6594.

Nastasa C., Vodnar D.C., Ionu L., Stana A., Benedec D., Tamaian R., Oniga O and Tipericiu B. 2018. Antibacterial Evaluation and Virtual Screening of New Thiazolyl-Triazole Schiff Bases as Potential DNA-Gyrase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. **19**, 1-18.

Nauciel C., Vilde J. L. Mécanismes de résistance aux antibiotiques. In Bactériologie médicale, 2ème édition. Paris: Masson, 2005, pp. 45 - 64.

Nonato M. C., Widom J., Clardy J. 2006. Human methionine aminopeptidase type 2 in complex with L- and D-methionine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **16**, 2580- 3.

Novak K.M. Drug Facts and Comparisons.56th edition.St. Louis, Missouri, Wolters Kluwer Health, 2002. 619 p.

Obolski U., Dellus-Gur E., Stein G. Y., Hadany L. 2016. Antibiotic Cross-Resistance in the Lab and Resistance Co-Occurrence in the Clinic: Discrepancies and Implications in *E.coli*. *Infection, Genetics and Evolution*. **40**, 155-61.

Oefner C., Douangamath A., D'Arcy A., Hafeli S., Mareque D., Mac Sweeney A., Padilla J., Pierau S., Schulz H., Thormann M., Wadman S and Dale G.E. 2003. The 1.15 Å Crystal Structure of the Staphylococcus aureus Methionyl-aminopeptidase and Complexes with Triazole Based Inhibitors. *Journal of Molecular Biology*. **332**:13-21

Olaleyed O. A., Bishaie W. R., Liu J. O. 2009. Targeting the role of N-terminal methionine processing enzymes in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Tuberculosis*. **S1**, S55- S59.

Olaley O., Raghunand T. R., Bhat S., He J., Tyagi S., Lamichhane G., Gu P., Zhou J., Zhang Y., Grosset J., Bishai W. R., Liu J. O. 2010. Methionine Aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* as Novel Antimycobacterial Targets. *Chemistry & Biology*. **17**, 86-97.

OMS, 2017, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [En ligne] <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. Consultez le [20-08-2019].

Palomino J. C., Leão S. C., Ritacco V. 2007. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care.

Petersen G.O., Saxena S., Renuka J., Soni V., Yogeeswari P., Santos D.S., Bizarro C.V., Sriram D. 2015. Structure-based virtual screening as a tool for the identification of novel inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* 3- dehydroquinone dehydratase, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **60**, 124-131.

Pham T.A., Jain A.N. 2006. Parameter estimation for scoring protein-ligand interactions using negative training data. *Journal of Medicinal Chemistry*. **49** (20), 5856-68.

Ponaire S., Zinglé C., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M. 2012. Growth inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by prodrugs of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase inhibitors, promising anti-mycobacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **51**, 277-285.

Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. 1996. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *Journal of Molecular Biology*. **261**, 470-489.

Reddy A. S., Pati S. P., Kumar P. P., Pradeep H.N., Sastry G. N. 2007. Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective. *Current Protein and Peptide Science*. **8**, 329-351.

Renwick M. J., Simpkin V and Mossialos E. 2016. Targeting innovation in antibiotic drug discovery and development. The need for a One Health – One Europe – One World Framework. *Health policy series*. Study Number 45.

Rishton G.M. 1997. Reactive compounds and in vitro false positives in HTS. *Drug Discovery Today*. **2**, 382-384.

Samal H.B., Das J.K., Mahapatra R.K., Suar M. 2015. Molecular modeling, simulation and virtual screening of MurD ligase protein from *Salmonella Typhimurium* LT2. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. **73**, 34-41.

Schiffmann R. Development and Characterization of Inhibitors of the *E. coli* Methionine Aminopeptidase. Thèse de doctorat. Allemagne : Université de la Sarre, 2006, 189 p.

Schiffmann R., Heine A., Klebe G., Klein C.D. 2005. Metal ions as cofactors for the binding of inhibitors to methionine aminopeptidase: a critical view of the relevance of in vitro metalloenzyme assays. *Angewandte Chemie International Ed Engl*. **44** (23), 3620-23.

Schneider G et Böhm H. J. 2002. Virtual screening and fast automated docking methods. *Combinatorial chemistry*. **7**(1), 64-70.

Shoichet B. K. 2004. Virtual screening of chemical libraries. *Nature*. **432**, 862-865.

Silhavy T.G., Kahne D., and Walker S. 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **2**, a000414.

Sotriffer C.M.R., Kubinyi H., Folkers G. 2011. Virtual screening: Principles, challenges, and Practical Guidelines. Volume 48. WILEY-VCH.

Spencer R. W. 1997. Diversity Analysis in high throughput screening. *Journal of Biomolecular Screening*. **2**, 69-70.

Swaika A., Crozier J. A., Joseph R. W. 2014. Vemurafenib: an evidence-based review of its clinical utility in the treatment of metastatic melanoma. *Drug Design, Development and Therapy*. **8**, 775-787.

Talele T.T., Khedkar S.A., Rigby A.C. 2010. Successful Applications of Computer Aided Drug Discovery: Moving Drugs from Concept to the Clinic. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **10**, 127-141

Towbin H., Bair K. W., DeCaprio J. A., Eck M. J., Kim S., Kinder F. R., Morollo A., Mueller D. R., Schindler P., Song H. K., Oostrum J. V., Versace R. W., Voshol H., Wood J., Zabludoff S., Phillips P. E. 2003. Proteomics-based Target Identification. Bengamides as a new class of methionine aminopeptidase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. **278**, 52964-52971.

Tripathi R. P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V. K. 2005. Fighting Tuberculosis: An Old Disease with New Challenges. *Medicinal Research Reviews*. **25** (1), 93-131.

Tsai J., Lee J.T., Wang W. 2008. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **105**, 3041-3046.

Tuccinardi T. 2009. Docking-based virtual screening: recent developments. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. **12**, 303-314.

Tucker L. A., Zhang Q., Sheppard G. S., Lou P., Jiang F., McKeegan E., Lesniewski R., Davidsen S. K., Bell R. L., and Wang J. 2008. Ectopic expression of methionine aminopeptidase-2 causes cell transformation and stimulates proliferation. *Oncogene*. **27**, 3967-3976.

Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological reviews*. **56**, 395-411.

Van de Waterbeemd H., Gifford E. 2003. ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise? *Nature Reviews Drug Discovery*. **2**, 192-204.

Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H. Y., Smith B. R., Ward K.W., Kopple K. D. 2002. *Journal of Medicinal Chemistry*. **45**, 2615-2623.

Verdonk M.L., Cole J.C., Hartshorn M.J., Murray C.W., Taylor R.D. 2003. Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins*. **52**, 609-623.

Vieth M., Hirst J.D., Kolinski A., Brooks C.L. 1998. Assessing energy functions for flexible docking. *Journal of Computational Chemistry*. **19**, 1612-1622.

Vittecoq M., Godreuil S., Prugnolle F., Durand P., Brazier L., Renaud N., Arnal A. 2016. Antimicrobial Resistance in Wildlife. *Journal of Applied Ecology*. **53** (2), 519-29.

Vogelman B et Craig W.A. 1986. Kinetics of antimicrobial activity. *The Journal of Pediatrics*. **108** (5), 835-840.

Wai Yun N. L. Bacterial methionine aminopeptidase as a potential target for therapeutics. Thèse de doctorat. Japan: Uuniversité de Hong Kong, 2006, 203p.

Walsh C. 2000. Molecular Mechanisms That Confer Antibacterial Drug Resistance. *Nature*. **406** (6797), 775-81.

Walters W. P., Stahl M.T., Murcko M. A. 1998. A virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today*. **3**, 160-178.

Wang J., Sheppard G. S., Lou P., Kawai M., BaMaung N., Erickson S. A., Tucker-Garcia L., Park C., Bouska J., Wang Y.C., Frost D., Tapang P., Albert D. H., Morgan S. J., Morowitz M., Shusterman S., Maris J. M., Lesniewski R., Henkin J. 2003. Tumor suppression by a rationally designed reversible inhibitor of methionine aminopeptidase-2. *Cancer Research*. **63**, 7861-7869.

Wang W.L., Chai S.C., Huang M., He H.Z., Hurley T.D., Ye Q.Z. 2008. Discovery of inhibitors of *Escherichia coli* methionine aminopeptidase with the fe(ii)-form selectivity and antibacterial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. **51**, 6110-6120.

Wang J.L., Skolnik S. 2009. Recent advances in physicochemical and admet profiling in drug discovery. *Chemistry & Biodiversity*. **6**, 1887-1899.

Wang W.L., Chai S.C, Ye Q.Z. 2009. Synthesis and structure-function analysis of fe(ii)-form-selective antibacterial inhibitors of *Escherichia coli* methionine aminopeptidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **19**, 1080-1083.

Xie S.X., Huang W.J., Ma Z.Q., Huang M., Hanzlik R.P., Ye Q.Z. 2006. Structural analysis of metalloform-selective inhibition of methionine aminopeptidase. *Acta crystallographica. Section D, Biological Crystallography*. 62 (Pt 4), 425-32.

Xu W., Lucke A.J., Fairlie D.P. 2015. Comparing sixteen scoring functions for predicting biological activities of ligands for protein targets. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **57**, 76-88.

Yala D., Merada S., Mohamedi. D., Ouar Korich M. N. 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du maghreb* n°91.

Ye Q.Z., Xie S.X., Huang M., Huang W.J., Lu J.P., Ma Z.Q. 2004. Metalloform-Selective Inhibitors of *Escherichia coli* Methionine Aminopeptidase and X-ray Structure of a Mn(II)-Form Enzyme Complexed with an Inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*. **126** (43), 13940-13941.

Yves P., Elisabetta L., Hongliang Z., Christophe M. 2010. DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology*. **17**, 421-33.

Zayed M. F., Hassan M. H. 2014. Synthesis and biological evaluation studies of novel quinazolinone derivatives as antibacterial and anti-inflammatory agents. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **22**, 157-162.

Zhang P., Nicholson D. E., Bujnicki J.M., Su X., Brendle J.J., Ferdig M., Kyle D.E., Milhous W.K., Chiang P.K. 2002. Angiogenesis inhibitors specific for methionine aminopeptidase 2 as drugs for malaria and leishmaniasis. *Journal of Biomedical Science*. **9** (1), 34-40.

Zuo S., Guo Q., Ling C., Chang Y. H. 1995. Evidence that two zinc fingers in the methionine aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae* are important for normal growth. *Molecular Genetics and Genomics*. **246**, 247-253.

ANNEXES

Annexe 1. Les milieux de culture

I. Méthode de diffusion à partir d'un disque sur milieu solide

1. Le milieu LB (Difco™ LB Broth, Lennox)

Composition par litre:

Tryptone	10.0g
L'extrait de levure	5.0g
Le chlorure de sodium	5.0g

2. Le milieu de culture utilisé pour *Mycobacterium smegmatis* constitue de :

Extrait de levure	0.4%
Extrait de malt	1%
CaCO ₃	0.2%
Glucose	0.4%

3. La gélose Mueller Hinton

Composition par litre:

Infusion de viande de bœuf.....	2g
Peptone de caséine.....	17.5g
Amidon.....	1.5g
Agar.....	17g

II. Méthode de micro dilution en milieu liquide

1. Milieu de culture pour *E.coli*

Composition de milieu MH II par Litre :

- Extrait de boeuf.....	3.0g
- Hydrolysate acide de la caséine.....	17.5g
- Amidon.....	1.5g

2. Milieu de culture pour *S. aureus*

Composition de milieu TSA par Litre :

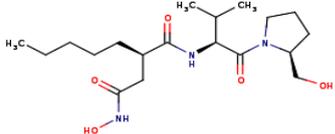
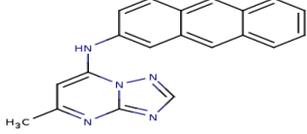
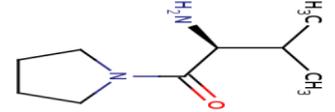
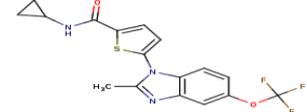
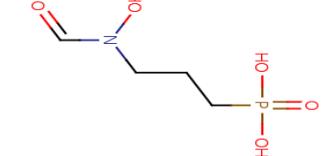
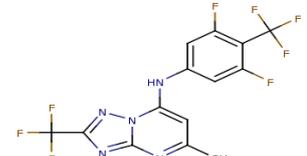
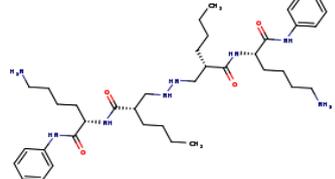
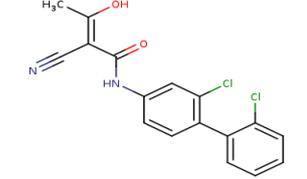
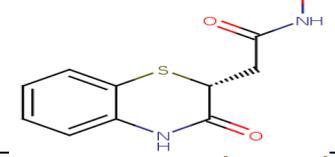
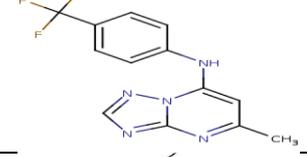
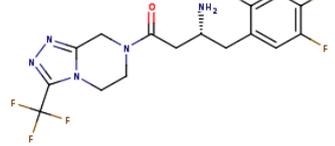
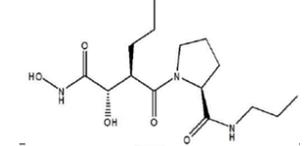
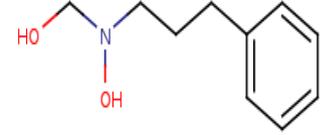
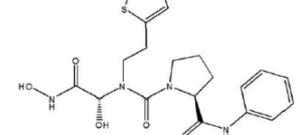
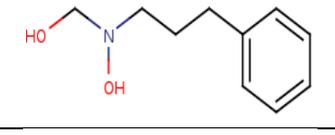
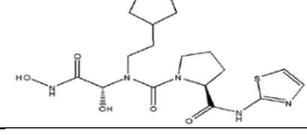
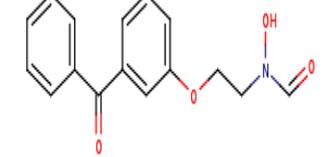
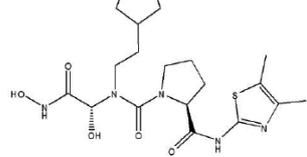
- Digestion pancréatique de la caséine.....	15g
- Enzymatique condensé de farine de soja.....	5g
- Chlorure de sodium.....	5g
- Agar.....	15g

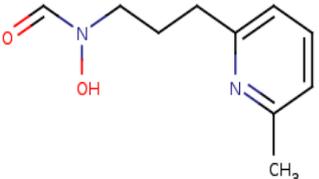
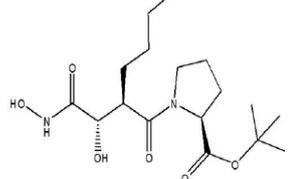
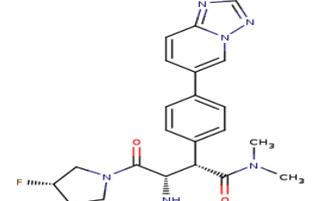
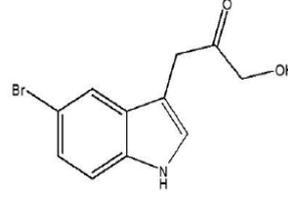
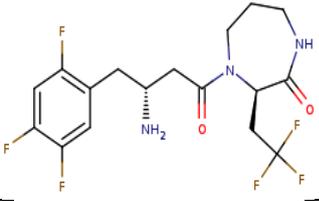
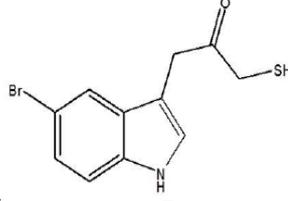
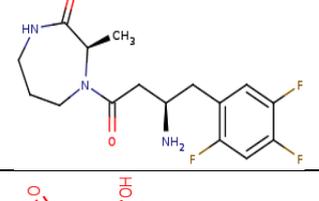
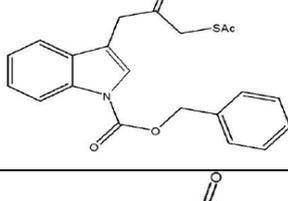
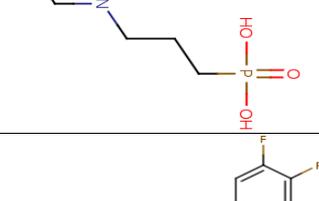
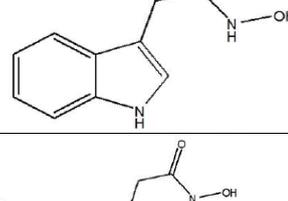
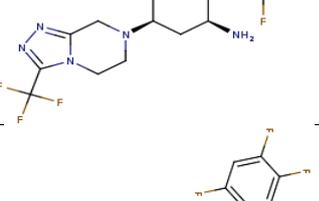
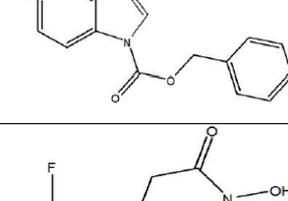
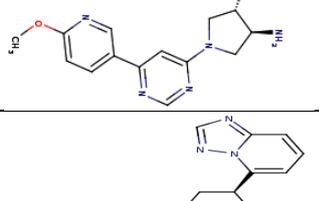
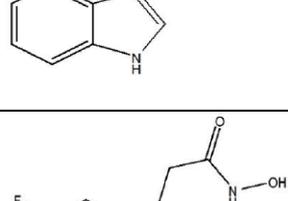
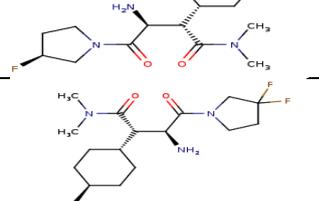
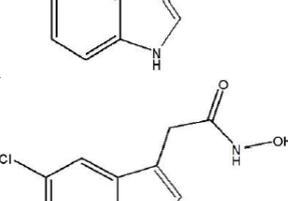
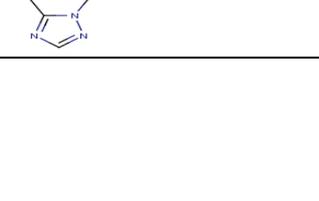
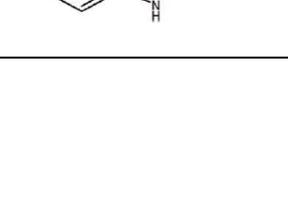
Annexe 2. Liste de 200 complexes utilisés pour calculer le RMSD

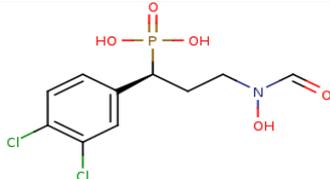
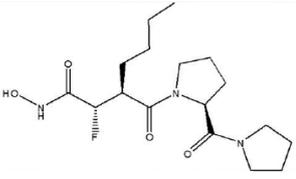
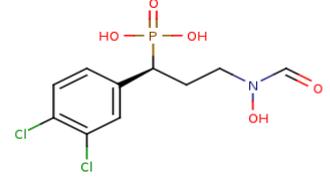
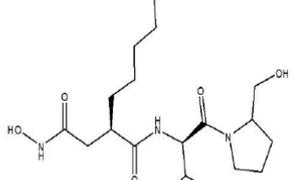
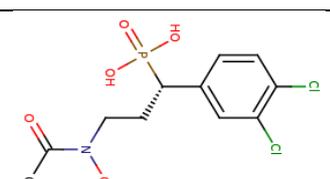
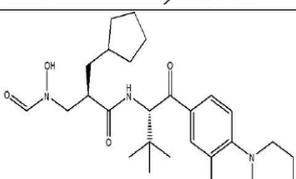
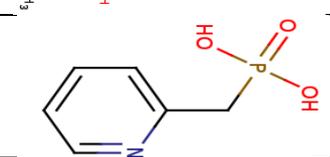
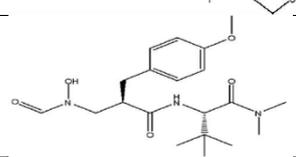
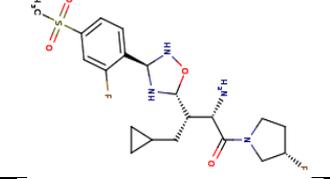
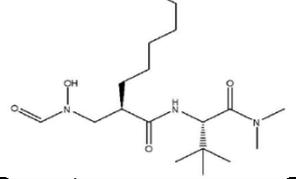
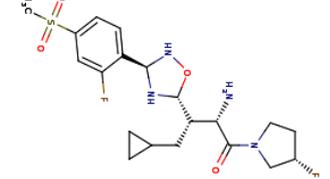
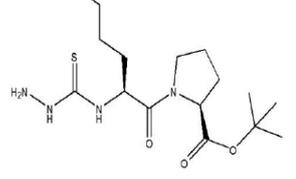
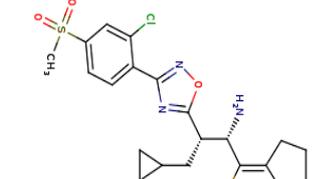
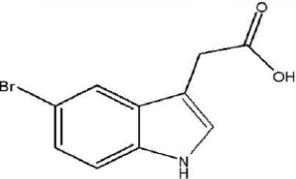
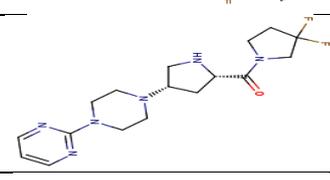
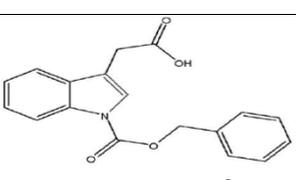
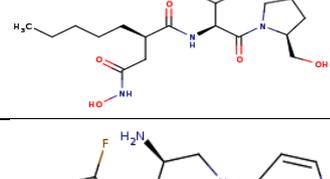
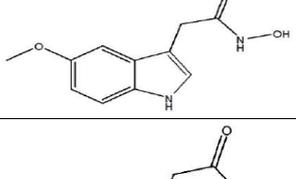
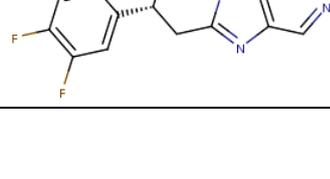
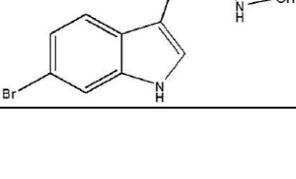
Code PDB	Ligand	RMSD Å	Code PDB	Ligand	RMSD Å
1A4G	ZMR	0.518	2P98	YE7	0.774
1A4Q	DPC	0.906	2PRK	YE8	2.066
1AQN	IPA	1.718	2Q92	B23	0.921
1B9S	FDI	0.953	2Q93	B21	0.696
1B9T	RAI	1.870	2Q95	A05	1.174
1B9V	RA2	0.943	2Q96	A18	1.831
1C1C	612	0.841	2QT9	524	1.344
1C6X	3IN	2.060	2QTB	474	1.574
1C23	MPH	1.046	2QWD	4AM	1.182
1C27	NLP	1.236	2QWE	GNA	0.664
1CP6	BUB	1.831	2QWF	G20	0.478
1E8V	DAN	0.964	2QWG	G28	0.759
1EP4	S11	1.194	2QWK	G39	0.599
1EUS	DAN	0.707	2RF2	MRX	1.261
1EUU	GAL	1.904	2RGU	356	0.939
1F8B	DAN	1.014	2RIP	34Q	1.842
1FK9	EFZ	0.796	2RKI	TT1	0.847
1FKO	EFY	0.795	2SIM	DAN	0.535
1G2A	BB2	0.885	2SLI	SKD	0.663
1G27	BB1	0.902	2VG5	NNC	0.403
1HNV	TBO	1.226	2VG6	NNB	0.517
1INF	ST4	1.200	2VG7	NNI	0.337
1ING	ST5	1.342	2VVZ	DAN	0.703
1IVD	ST1	1.920	2VW1	DAN	0.735
1IX1	MH1	1.268	2WAJ	SNB	0.665
1GSO	NAG	1.247	2WIH	P48	0.986
1KJ1	MAN	1.365	2WON	ZZE	1.170
1KQ0	MED	1.324	2ZD1	T27	0.754
1L7F	BCZ	0.581	2ZOQ	5ID	0.756
1L7H	NAG	1.077	3AH4	GAL	2.002
1LM4	OCS	0.883	3B7E	ZMR	0.506
1LOK	TRS	1.190	3B7R	BIR	1.645
1LQY	BB2	1.567	3B7U	KEL	1.108
1LRU	BB2	0.957	3C6U	M22	1.061
1LRY	BB2	1.156	3C43	315	2.027
1M7G	ADX	0.686	3CHR	4BS	1.483
1MT3	MES	1.213	3CKZ	ZMR	0.578
1MWE	SIA	2.076	3CL0	G39	0.639
1NN2	NGK	1.548	3CMD	MLI	0.663
1O86	LPR	1.076	3D4L	605	0.693
1QXY	M2C	0.860	3D27	605	1.210
1R5G	AO1	1.796	3DLG	GWE	0.988
1R5H	AO2	1.874	3DM2	CSD	1.476
1S1W	UC1	2.021	3DOK	GWJ	0.914
1S17	GNR	0.540	3DOL	GWJ	1.413
1SLI	DAN	1.025	3E3U	NVC	1.222
1SZZ	BB2	2.074	3EBH	BES	1.373
1TKF	DTR	2.001	3EBI	BEY	1.882
1TKH	DPN	0.871	3EIO	AJH	0.872

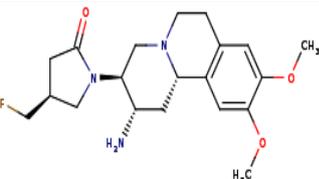
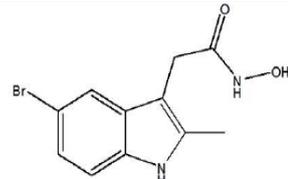
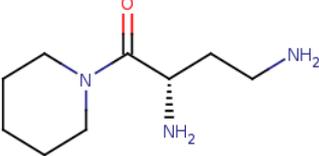
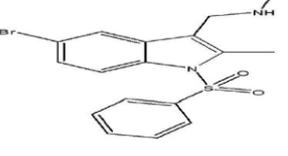
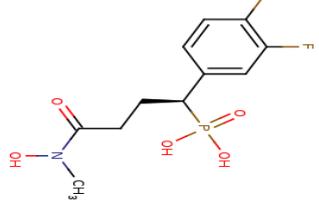
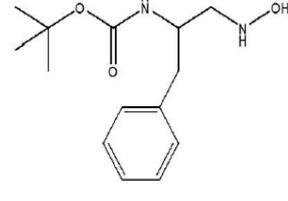
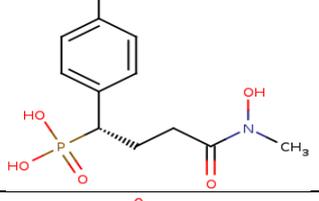
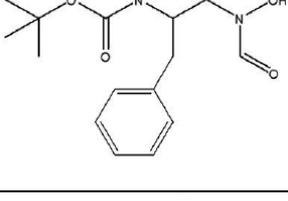
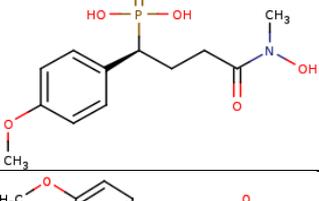
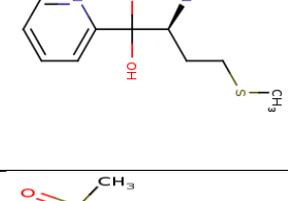
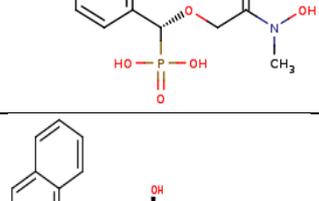
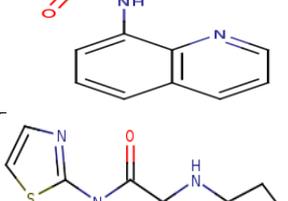
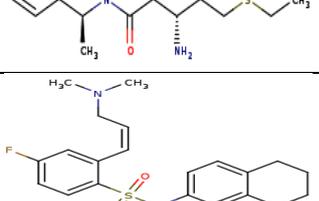
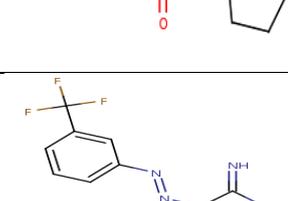
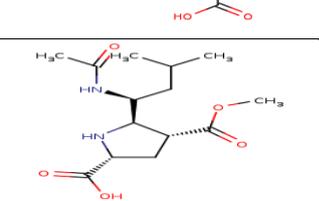
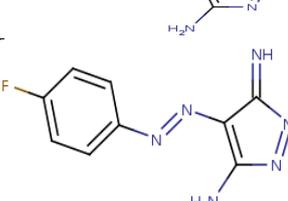
1TKT	H12	0.764	3F8S	PF2	1.400
1TXR	BES	1.705	3FFI	3OB	1.376
1V3C	SLB	0.569	3FHR	P40	1.460
1V3D	DAN	0.781	3FMM	XI2	0.974
1VCJ	IBA	1.617	3G5K	BB2	1.350
1VEY	EPE	2.093	3GC7	B45	0.728
1W0O	SIA	1.521	3GC8	B45	0.867
1W8N	DAN	0.915	3GCP	SB2	0.851
1W8O	LBT	1.555	3GCQ	1BU	0.738
1WCQ	DAN	0.782	3GCS	BAX	0.523
1WS1	BB2	1.953	3GCU	R48	1.311
1X70	715	2.074	3HV6	R39	1.040
1XBU	IOY	1.428	3IU8	T03	1.373
1XNZ	FCD	0.900	3K6L	2BB	0.861
1XOU	MSE	0.739	3KED	DAB	2.003
1XRY	BES	1.833	3KWF	B1Q	1.031
1YVM	TMG	1.731	3L03	4OH	0.350
1YW9	A84	2.005	3L8X	N4D	0.834
2ADU	R20	1.458	3LAK	KR1	0.663
2AI7	SB7	1.092	3LN1	CEL	1.404
2AIE	SB9	1.079	3LQL	LDT	0.813
2B3L	ACY	2.000	3MBL	LSG	1.427
2B5J	3AC	1.090	3MH3	BOG	1.259
2BAN	357	1.934	3NNU	EDB	2.000
2BE2	R22	1.027	3O1L	MSE	1.135
2BER	SLB	0.572	3OBJ	BMU	0.739
2BEB	SLB	1.215	3ONC	LDT	0.616
2CCV	A2G	0.518	3PGH	FLP	0.908
2CGZ	TNR	1.764	3PTB	BEN	0.567
2DQM	BES	1.296	3RR3	FLR	1.742
2EK9	BES	1.368	3SLI	SKD	0.667
2EVC	FC3	0.567	4QWK	3BV	0.599
2EVM	FC2	1.201	1BQM	HBV	5.277
2EW5	Y12	1.348	1BS4	2PE	5.965
2EW6	Y13	1.167	1BSZ	2PE	6.739
2GBI	XIH	0.917	1HNI	AAA	5.602
2GG0	U11	1.596	1R58	AO5	3.587
2GG3	U13	1.801	2BB7	QMS	4.787
2GG5	U19	2.018	2EVO	CT0	6.897
2GG8	U15	2.011	2FJP	S14	8.155
2GU5	NLP	1.189	2GG7	U14	6.634
2GU6	NLP	0.828	2GG9	U16	3.058
2HHA	3TP	1.476	2GGB	U17	3.057
2HPT	BES	1.540	2I3Z	LIR	4.773
2HT7	G39	1.448	2NQ6	HM4	4.709
2HTQ	ZMR	0.693	2OPH	277	4.289
2HTU	BCZ	1.314	2P9A	YE6	4.733
2IIV	565	1.226	2Q94	A04	3.164
2JID	GVB	0.996	2QWB	SIA	3.828
2OKL	CIT	1.273	2X52	GYT	5.307
2OS3	BB2	1.015	3PKA	Y02	2.400

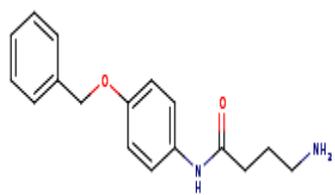
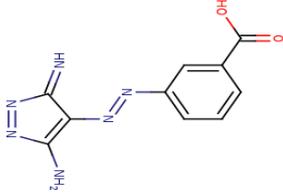
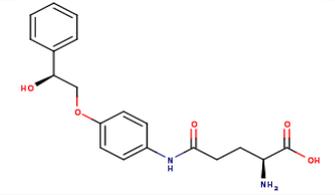
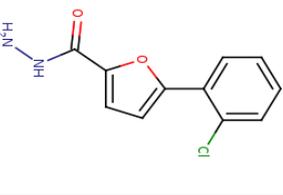
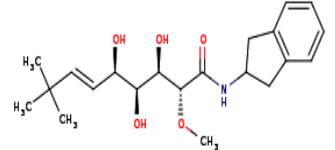
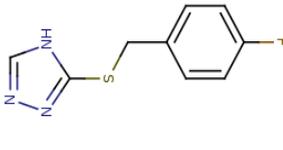
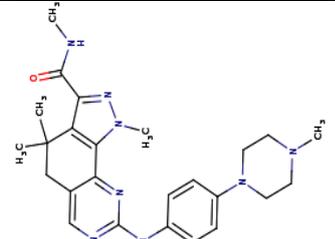
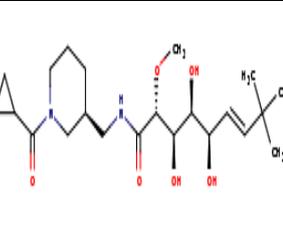
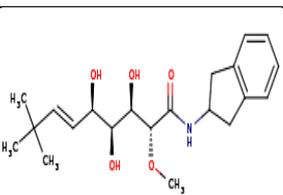
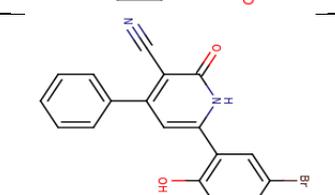
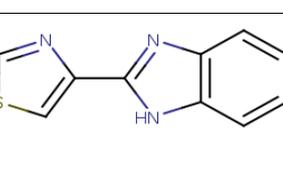
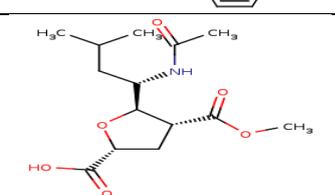
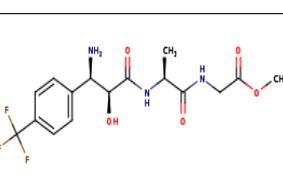
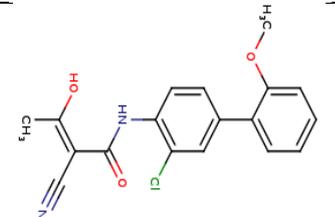
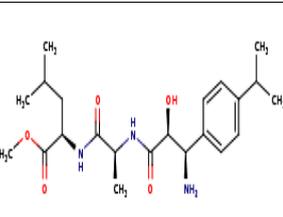
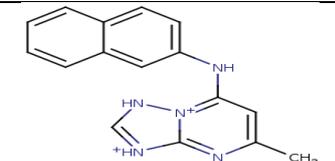
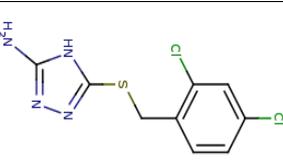
Annexe 3 : Liste des 92 inhibiteurs avec leurs activités biologiques (IC₅₀) et leurs énergies d'interaction (ΔG) données par FlexX

Inhibiteur	IC ₅₀ (nM)	log IC ₅₀	ΔG (Kj/ mole)	Inhibiteur	IC ₅₀ (nM)	log IC ₅₀	ΔG (Kj/ mole)
	10	1	-35.25		56	1.74	-36.66
	3000	3.47	-20.14		64	1.80	-24.03
	20	1.30	-36.30		22	1.34	-28.40
	130	2.11	-21.48		22	1.34	-30.94
	5	0.56	-43.41		280	2.44	-26.72
	18	1.25	-41.58		6.7	0.82	-30.45
	400	2.60	-19.42		2	0.30	-34.40
	160	2.20	-18.24		16	1.20	-33.34
	3900	3.59	-26.36		2	0.30	-32.18

	2200	3.34	-19.62		6	0.77	-29.33
	4	0.60	-46.36		56000	5.74	-16.11
	2.6	0.41	-44.33		80000	4.90	-15.18
	6.6	0.81	-37.30		35000	5.54	-18.61
	80	1.90	-41.85		1400	3.14	-20.76
	21	1.32	-30.35		27	1.43	-24.70
	4.6	0.66	-42.85		2000	3.30	-22.44
	2.3	0.36	-44.67		160	2.20	-21.97
	4.8	0.68	-40.53		80	1.90	-24.15

	150	2.17	-28.86		20	1.30	-31.24
	15000	4.17	-10.71		10	1	-30.67
	700	2.84	-30.06		0.6	0.22	-32.00
	4600	3.66	-17.93		200	2.30	-15.48
	15900	4.20	-12.70		30	1.47	-26.64
	19	1.27	-36.50		590	2.77	-25.70
	0.2	0.69	-46.13		380000	5.57	-18.37
	13	1.11	-28.98		300000	5.47	-14.92
	1.5	0.17	-49.44		9000	3.95	-24.81
	3.8	0.57	-35.71		210	2.32	-20.63

	6.8	0.83	-33.64		5000 0	4.69	-18.45
	130	2.11	-21.35		6000	3.77	-21.94
	120	2.07	-20.10		5200 0	4.71	-19.90
	10	1	-36.55		50	1.69	-20.79
	20	1.30	-37.66		1600 0	4.20	-31.24
	50	1.69	-39.41		2140	3.33	-18.90
	30	1.47	-35.29		67	1.82	-19.46
	19	1.27	-32.22		250	2.39	-29.20
	41	1.61	-33.04		580	2.76	-27.98

	61	1.78	-33.66		1750	3.24	-33.00
	17	1.23	-40.15		1160	3.06	-23.90
	5580	3.74	-26.99		580	2.76	-16.00
	45	1.65	-38.38		960	2.98	-31.94
	21	1.32	-26.55		760	2.88	-21.90
	50	1.69	-30.55		470	2.67	-16.01
	410	2.61	-35.22		1700	3.23	-34.20
	200	2.30	-26.91		3500	3.54	-31.70
	47	1.67	-31.85		240	2.38	-15.05

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

- **Hanane Boucherit***, Abdelouahab Chikhi, Abderrahmane Bensegueni, Amina Merzoug, Jean-Michel Bolla. 2020. Identification of Novel Inhibitors of Bacterial Methionine Aminopeptidase Using In Silico Virtual Screening Approach and In Vitro Validation. *Current Computer-Aided Drug Design*. 16 (4): 389-401. DOI: 10.2174/1573409915666190617165643
- **Hanane Boucherit***, Abdelouahab Chikhi, Abderrahmane Bensegueni, Amina Merzoug, Denis Tritsch. 2018. Virtual Screening and in vitro Antibacterial Activity for the Identification of Novel Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Methionine Aminopeptidase. *Current Enzyme Inhibition*. 14 (3): 166-185. DOI: 10.2174/1573408014666180626154016
- **Hanane Boucherit***, Amira Nouioua, Asma Serrar, Abdelouahab Chikhi, Abderrahmane Bensegueni, Amina Merzoug. 2016. Research of new inhibitors of *staphylococcus aureus* methionine aminopeptidase by computer simulation. *European Journal of Biomedical And Pharmaceutical Sciences*. 3: 54-66.

Communications

- **Hanane BOUCHERIT***., Abdelouahab Chikhi., Abderrahmane Bensegueni., Amina Merzoug. Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la méthionine aminopeptidase. « 14^{ième} journées nationales du département de pharmacie de Betna2 ». 27-28 Avril **2016**.
- **Hanane BOUCHERIT***., Abdelouahab Chikhi., Abderrahmane Bensegueni., Amina Merzoug. Recherche *in silico* de nouveaux composés bioactifs et applications à l'inhibition de la méthionine aminopeptidase. « 1^{ère} séminaire international de pharmacie de Sétif ». 11-12 Mai **2016**.
- **Hanane BOUCHERIT***., Abdelouahab Chikhi., Abderrahmane Bensegueni., Amina Merzoug. Utilisation du criblage virtuel dans la recherche de nouveaux agents anti bactériens. La première conférence internationale d'infectiologie d'Annaba (CiiA). Annaba 27-28 Octobre **2017**.

- **Hanane BOUCHERIT***, Amina Merzoug., Abdelouahab Chikhi., Abderrahmane Bensegueni. Research of new inhibitor for *mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase using *in silico* virtual screening and *in vitro* validation, promising anti-mycobacterial agents. «Journée Internationale de Bioinformatique de Boumerdès ». 5 Novembre **2019**.
- **Hanane BOUCHERIT***, Amina Merzoug., Abdelouahab Chikhi., Abderrahmane Bensegueni. Recherche de nouveaux inhibiteurs de la méthionine aminopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis* par le criblage virtuel *in silico* et validation *in vitro*. « Le 1^{er} séminaire national des molécules bioactives d'OUM-EL-BOUAGHI ». 18 & 19 Novembre **2019**.



RESEARCH ARTICLE

The Research of New Inhibitors of Bacterial Methionine Aminopeptidase by Structure Based Virtual Screening Approach of ZINC DATABASE and *In Vitro* Validation



Hanane Boucherit^{1,2,*}, Abdelouahab Chikhi¹, Abderrahmane Bensegueni¹, Amina Merzoug^{1,2} and Jean-Michel Bolla³

¹Laboratory of Applied Biochemistry, Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Mentouri Brothers University, Constantine 1 - Algeria; ²Abdelhafid Boussouf University Center, Mila, Algeria; ³Aix Marseille University, INSERM, SSA, MCT, Marseille, France

Abstract: Background: The great emergence of multi-resistant bacterial strains and the low renewal of antibiotics molecules are leading human and veterinary medicine to certain therapeutic impasses. Therefore, there is an urgent need to find new therapeutic alternatives including new molecules in the current treatments of infectious diseases. Methionine aminopeptidase (MetAP) is a promising target for developing new antibiotics because it is essential for bacterial survival.

Objective: To screen for potential MetAP inhibitors by *in silico* virtual screening of the ZINC database and evaluate the best potential lead molecules by *in vitro* studies.

Methods: We have considered 200,000 compounds from the ZINC database for virtual screening with FlexX software to identify potential inhibitors against bacterial MetAP. Nine chemical compounds of the top hits predicted were purchased and evaluated *in vitro*. The antimicrobial activity of each inhibitor of MetAP was tested by the disc-diffusion assay against one Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and two Gram-negative (*Escherichia coli* & *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. Among the studied compounds, compounds ZINC04785369 and ZINC03307916 showed promising antibacterial activity. To further characterize their efficacy, the minimum inhibitory concentration was determined for each compound by the microdilution method which showed significant results.

Results: These results suggest compounds ZINC04785369 and ZINC03307916 as promising molecules for developing MetAP inhibitors.

Conclusion: Furthermore, they could therefore serve as lead molecules for further chemical modifications to obtain clinically useful antibacterial agents.

ARTICLE HISTORY

Received: January 28, 2019
Revised: April 26, 2019
Accepted: May 06, 2019

DOI:
10.2174/1573409915666190617165643



Keywords: Methionine aminopeptidase, antibacterial agents, zinc database, screening assistant, virtual screening, Flex X.

INTRODUCTION

Multiple drug resistance among bacteria has become a global issue with a considerable impact on the mortality associated with infectious diseases [1-3]. One strategy for combating this resistance consists of focusing on new targets involved in biochemical processes that are essential to bacterial growth.

Methionine aminopeptidases (MetAPs) represent a unique class of proteases responsible for the hydrolytic removal of N-terminal methionines from

elongating polypeptide chains during protein synthesis [4-6]. The physiological importance of MetAP activity is underscored by the lethality of organisms where all MetAP genes have been deleted or all MetAP gene products are inhibited. This has been shown for *E. coli*, *S. enterica* and *S. cerevisiae* [7-9]. Therefore, MetAP has been selected as a target of interest in the search for new antibacterial agents.

Virtual screening (VS) is a computational technique, which is used to screen novel potential active molecules (called hits) from a chemical

database. When used prior to experimental screening, it can be considered as a powerful computational filter for reducing the size of a chemical library that will be further experimentally tested. Currently, pharmaceutical companies and many institutions employ routinely VS as one of drug discovery methods [10-14]. Virtual screening has historically been essentially based on knowledge of the three dimensional structure of the target (*structure based virtual screening*, SBVS). In this case, the molecules to be evaluated are first docked artificially (docking) in the active site of the target. The interaction is then quantified (scoring) to lead to the selection of new potentially active

MATERIAL AND METHODS

Choice of the enzymatic target

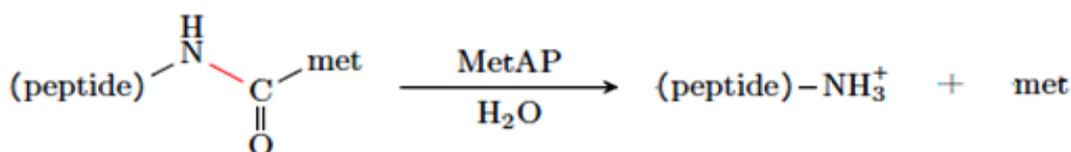


Fig. (1). Reaction catalyzed by methionine aminopeptidase

MetAPs are ubiquitous enzymes that are used as potential drug targets in the pharmacological field, including the treatment of bacterial or parasitic infections, and cancer treatment [17, 25, 26]. The 3D structures for the selected bacterial MetAPs, being the object of our study, were downloaded in *.pdb* format from the PDB database (<http://www.rcsb.org>). We chose three codes of the MetAP enzyme, by introducing their ID code (1XNZ, 1QXY and 4FO8 respectively). Thus,

chemical entities [15, 16]. In the area of drug design, VS methods have been widely used and helped in identifying novel molecules as potential antibacterial agents [17-24]. In the present study, we report a virtual screening study aimed at identifying novel inhibitors that target bacterial MetAP from the chemical database ZINC. We selected a set of molecules to be tested *in silico* by molecular docking on the MetAP target. Compounds with the highest docking score, were selected for the biological tests. Antibacterial activity was demonstrated for two compounds whose MIC was determined on three different bacterial species involved in human pathogenicity.

The MetAP catalyzes the irreversible cleavage of the N-terminal methionine from nascent polypeptides (Fig 1).

these structures were chosen according to the following criteria:

- Crystallographic resolution of about 2.0 Å or less;
- Presence of the metal ion in the catalytic site;
- Non-covalent binding between ligand and protein;
- Presence of a low molecular weight inhibitor;
- Activities of bound ligands ranging from micromolar to nanomolar.

The main characteristics of these enzymes issued from the PDB database are summarized in the table 1 below.

Table1. Main characteristics of the selected MetAP for this study

Name of bacteria	Code	Resolution (Å)	Ligand	Number of Chains	Number of AAs per Chain	Metal Ion	Reference
<i>E. coli</i>	1XNZ	1.52	FCD	1	264	Mn	[27]
<i>S. aureus</i>	1QXY	1.04	M2C	1	252	Co	[28]
<i>P.aeruginosa</i>	4FO8	1.9	MET	4	280	Mn	[29]

Prediction of the binding site of the MetAP enzyme

The identification of the binding site is crucial to perform a structure-based virtual screening. For that, Amino acids involved in protein-ligand interactions can guide the position of

the active site. This is the most guaranteed method to identify a binding site because it uses experimental data and not the predicted data^[30]. The FlexX software is used to identify potential binding sites of a ligand on the enzyme target (table2).

Table2. List of active site amino acids

EcMetAP (1XNZ)	<i>S. aureus</i>MetAP (1QXY)	<i>P.aeruginosa</i> MetAP (4FO8)
Cys59, Tyr62, His63, Tyr65, Cys70, Cys78, His79, Asp97, Thr99, Asp108, Thr109, Ser110, Tyr168, Cys169, His171, His178, Thr202, Glu204, Gln233, Glu235	Asp59, Glu60, Cys67, His76, Asn91, Asp93, Ser95, Asp104, Trn105, Trn166, His168, His175, Glu202, Gln231, Glu233	Tyr62, lys67, cys70, his79, asp96, thr98, asp107, thr108, cys168, his170, his177, thr201, glu203, gln232, glu234

The ligands collection

ZINC database (<http://zinc.docking.org>) is a free database of commercially available compounds designed for virtual screening. It contains over 35 million purchasable compounds in 3D formats,

ready for docking, with compounds physico-chemical properties information and the contact details of the suppliers. ZINC is provided by the Department of Pharmaceutical Chemistry at the University of California, San Francisco^[31]. Since we were trying to find active compounds against MetAP which can be directly

purchasable for further *in vitro* studies, we chose in this work the “lead like in stock” database, which contains about 3.7 million compounds, for our *in silico* screening based on structure.

Filtering the ZINC database

Screening Assistant

The Screening Assistant software (<http://screeningassistant.sourceforge.net/>) makes it possible to manage the libraries, and select compounds for screening tests according to their physicochemical properties and their diversity. This software is available for free under the GPL license. It is programmed in Java and uses a MySQL database [32, 33]. This software is therefore used before screening. In our case, we used Screening Assistant to manage the 3.7 million structures intended for docking of the ZINC chemical library on the three selected MetAP.

The features of the software include:

- Compilation of the library from different providers with automatic support for duplicates;
- Filtration of compound by their physicochemical properties;
- Filtration of compounds based on their properties "drug-like" and "lead-like";
- Graphical analyzes of the bases;
- Removal of compound that can generate false positives in biochemical tests;
- Suppression of potentially mutagenic compound;

- Selection of compound by diversity.

1. Physico-chemical filters

Several physicochemical filtering, were applied. The filters are intended to eliminate compounds whose characteristics are too far removed from those of a drug. We applied the following filters:

- Lipinski rules [34, 35] :
A partition coefficient ($\log P$) ≤ 5 ;
Molecular weight of the compounds (g/mol) ≤ 500 ;
Number of H bond donors ≤ 5 ;
Number of H bond acceptors ≤ 10 ;
- Veber et al [36] :
Rotatable bonds ≤ 15 ;
The polar surface of the compound (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$;
- Supplementary criteria [32, 37] :
Halogens ≤ 7 ;
Single-chains = 0;
Perfluorinated-chain = 0;
Big ring size < 7 ;
 $O \geq 1$;
 $N \geq 1$;
No NO₂;
No SO₂;
No CF₃;
Bad atoms = 0;
Presence of a reactive function = 0;
PDL_score or score Progressif interne 'Drug-Like' ≤ 1 ;
CFMS ≤ 1 : By default.

2. Selection of compounds by diversity

The selection of compounds is based on the principle of similarity; the similar molecules should have a similar biological activity [32]. Thus, testing a single molecule of a similar group provides a reasonable estimate

of the potency of other members of the same group. As a result, the screening of compounds with sufficiently different structures will be favored. This is to isolate several families of interests. Diversity selection is based on the clustering of compounds, which must contain chemically similar compounds. The selection consists in choosing a molecule in each cluster. Screening Assistant uses the Stochastic Clustering Analysis (SCA) algorithm to identify the number of clusters ^[39, 40].

The SCA algorithm proceeds as follows ^[32]:

- The first molecule of the base is considered to be a cluster center.
- Then, for each of the following molecules, the similarity with each cluster center already identified is evaluated. If a molecule with all similarity scores is lower than a threshold value set in advance, this means that the compounds are not in any existing cluster. A new

cluster is created by adding the molecule to the list of cluster centers.

Virtual screening

In the aim to find new potent inhibitors of bacterial MetAP, we have screened the ZINC Chemo-library. The first step of virtual screening is the use of the previously described filters to reduce the size of the library of 3.7 million compounds. A molecular docking with FlexX is then applied to the pre-filtered assembly. Products with the highest score will be selected for the biological tests. The overview of the virtual screening procedure is presented in Fig2.

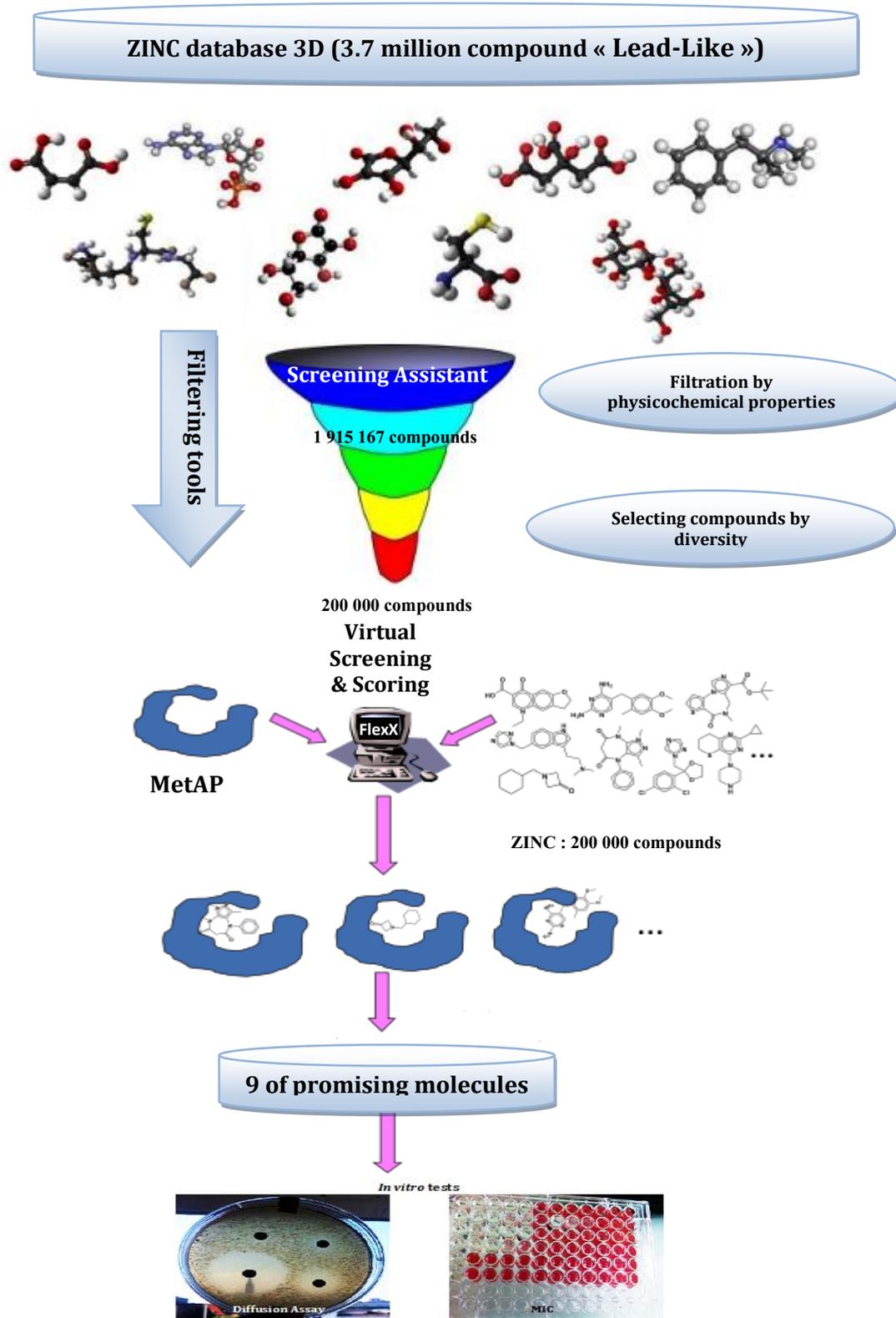


Fig. (2). Schematic representation of the screening strategies adopted in this study

Flex X software

Flex X .2.2.0, 2016 (<http://www.biosolveit.de>) is a commercial computer program that allows the prediction of the geometry of the protein-ligand complex as well

as an estimation of the binding strength between a protein of which the three-dimensional (3D) structure is known and a small ligand molecule ^[41]. This program uses an incremental approach ^[42] working without manual intervention. This algorithm is also

called fragmentation / reconstruction^[43] because at first the ligand is cut into rigid and flexible parts. Between the points where rotations are possible, one or more rigid «ancres» are defined, and then the first rigid part is put into interaction with the receiver followed by the successive addition of the flexible parts with an exploration of the torsion angles^[44]. In FlexX the scoring is done using a modified Böhm scoring function^[42], which includes the following terms: entropic; hydrogen bonding; ionic; aromatic; and lipophilic (equation 1).

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} \times N_{\text{rot}} \\ &+ \Delta G_{\text{hb}} \sum_{\text{neutral H-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ &+ \Delta G_{\text{io}} \sum_{\text{ionic int.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ &+ \Delta G_{\text{aro}} \sum_{\text{aro.int.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ &+ \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{\text{lipo.cont}} f * (\Delta R) \end{aligned}$$

Biological Test

We have chosen to select only nine compounds according to their price and availability in the commercial library (table 3). Samples of this final set were purchased as powders from mcule.com Kft. (Budapest, Hungary) and then dissolved at a concentration of 100 mM in DMSO. The codes of the purchased compounds were as follows: ZINC31308822, ZINC15880082, ZINC04139358, ZINC01396580, ZINC05515132, ZINC04785369, ZINC72280453, ZINC03307916 and ZINC15085593.

As part of the search for new antibacterial substances, we tested these molecules against three

pathogenic strains: one Gram-positive (*Staphylococcus aureus* DSMZ 20231) and two Gram-negative (*Escherichia coli* DSMZ 30083 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853). The antibacterial activity was assessed *in vitro* by two methods: the disc-diffusion assay method for the identification of activity, and the microdilution method to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) of each selected compound in collaboration with laboratory UMR-MD1 Membrane Transporters, Chemoresistance and Drug Design, University of Marseille-France.

The disc-diffusion assay

Petri dishes were inoculated by spreading 150 μL of a bacterial suspension in logarithmic phase of growth (0.5 Mac Farland corresponding to 10^6 CFU / mL) in accordance with the CA-SFM recommendations^[45] to obtain a bacterial mat of Mueller-Hinton agar. Each compound to be tested was loaded on a filter paper disc (6 mm in diameter), after drying the discs were deposited onto the plates. Ciprofloxacin^[46] (5 μg /disc) was used as a positive control and reference. After an incubation period of 24 hours at 37° C, the different diameters of the zones of inhibition obtained around the disks are measured twice and photographed. The active products were further tested to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for each bacterial strain.

1. Determination of MICs

MIC determination is the standard test for evaluating in vitro antibacterial activity^[47]. The MIC was determined using the micro dilution technique. The microplates have 96 wells, divided into 8 rows of 12 columns. In the first column, we placed 200 μL of broth (Mueller Hinton II Broth (MHII) for *E. coli* and Tryptic Soy Agar (TSA) for *S. aureus*) which was used to check for possible contamination of the culture medium (negative control). The second column comprising 190 μL of broth and 10 μL of the tested compound at a final concentration of 2048 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The last column is the positive control containing bacteria and no compound. Then we performed a serial dilution range by taking 100 μL in column 2 and deposit them in column 3. And so

RESULTS AND DISCUSSION

Search for new inhibitors of MetAP

During this work, we were interested in molecules called "Lead-Like" in Stock. We have found 3,687,621 (≈ 3.7 million) structures designed for docking and immediately available. Moreover, to avoid wasting time with molecules having characteristics incompatible with those of compounds of pharmaceutical interest, our screening process comprised a preliminary filtering step. This task, which is supported by the *Screening Assistant* program, is to exclude inappropriate compounds.

Physico-chemical filters

on until the column 11; then to this mixture, 100 μL of the inoculum adjusted to 5.10^5 bacteria/ ml (final concentration) was added from column 2 to 12. The final volume of all the wells was 200 μL . The final concentrations of the dilution range thus generated were between 1024 and 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The plate is then covered and incubated at 37°C . The MIC of the compounds was determined after 18 to 24 hours of incubation from the first well devoid of bacterial growth^[48]. Results are expressed as mean values of four independent determinations. Reference agents in clinical use were also tested in order to check susceptibility of strains: amoxicillin^[49], ciprofloxacin^[46] and erythromycin^[49].

The *Screening Assistant* software^[32] was used to manage the 3.7 million structures intended for docking of the ZINC chemical library. The application of these filters reduced our selection to about two million molecules. A total of 1,915,167 molecules have been selected.

Selecting compound by diversity

A diversity algorithm was applied to all the filtered compounds to finally select the 200,000 molecules screened virtually. The chemical space before and after selection by diversity is shown in figure 3.

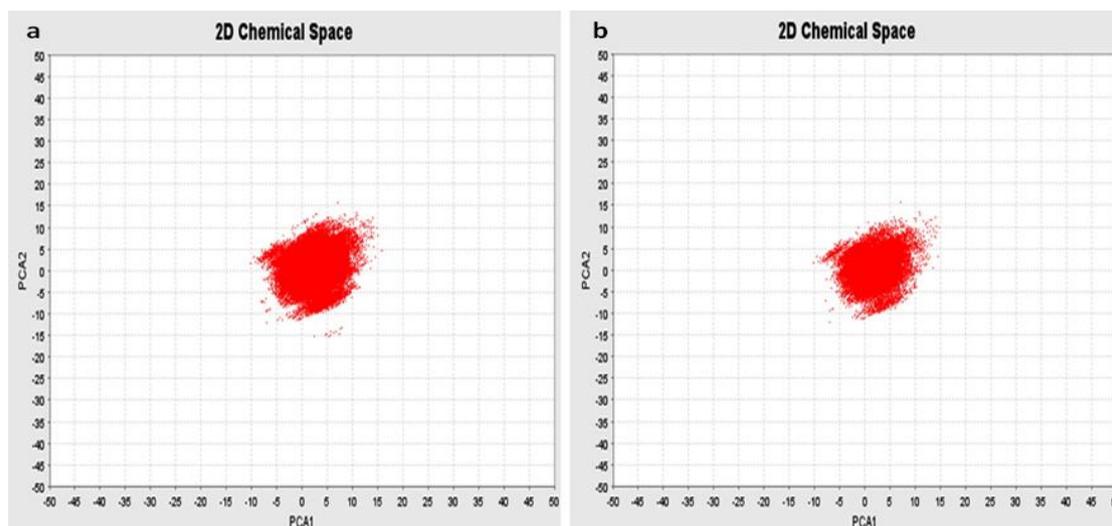


Fig. (3). Selection of compound by diversity **(a)** Filtered molecules (1, 915,167 million). **(b)** Diversity selection (200,000 compounds)

This allows us to see that the two graphs are similar suggesting that the compounds selected by diversity were representative of the starting chemical space.

***In silico* screening**

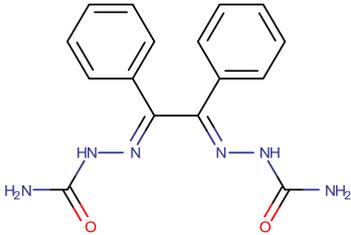
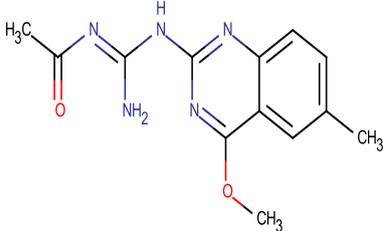
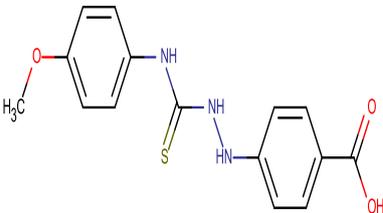
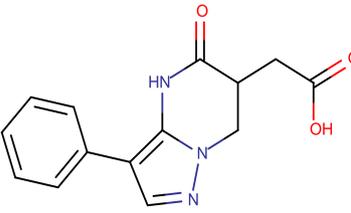
In order to find new, more potent inhibitors of bacterial MetAP, we performed a screening of the 200,000 molecules against Ec-MetAP by Flex X. A total of four months is required to screen these compounds. The docking system consists of 4 microcomputers. This number is due to the material cost. Docking results showed that compounds selected for virtual screening have different orientations in the active site of our therapeutic target because of their diversity on atomic composition and physicochemical properties. For this reason, we selected a total of 100 compounds that exhibited scores below that of the reference inhibitors. The codes and results of the Flex X simulation of

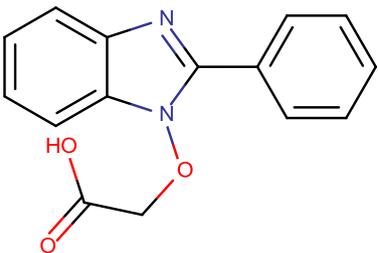
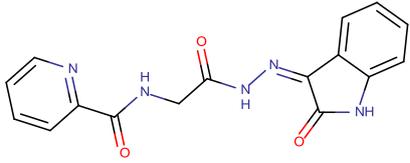
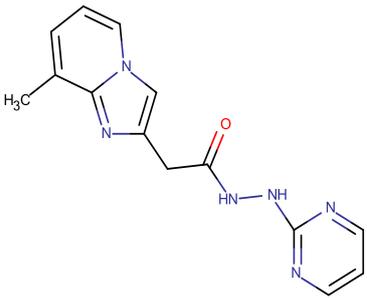
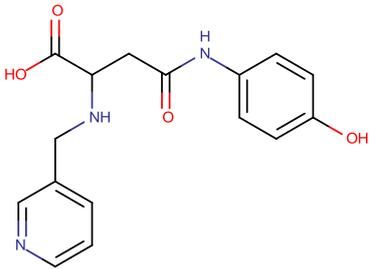
these compounds are shown in supplementary data.

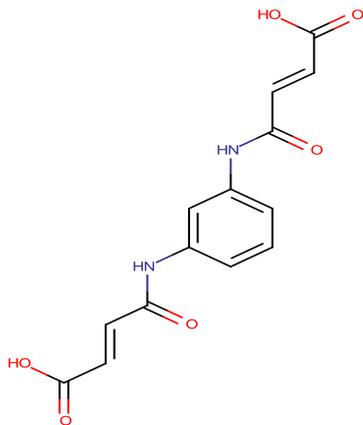
Molecules selected as candidates

Nine of the best compounds from the selection were evaluated *in vitro* for their antibacterial activities against three bacterial species *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The inhibitors tested are shown in the following table.

Table3. Molecules selected as candidates

Zinc ID code	Structure	Name	Score 1XNZ (Kj/mol)	Score 1QXY (Kj/mol)	Score 4FO8 (Kj/mol)
ZINC 05515132		(1,2-diphenyl-2-ureidoiminoethylidene)aminoourea	-43.602	-21.991	-35.021
ZINC 04785369		N-[amino-(4-methoxy-6-methylquinazolin-2-yl)amino-methylene]acetamide	-40.549	-32,142	-27.417
ZINC 03307916		4-[N'-[(4-methoxyphenyl)thiocarbamoyl]hydrazino]benzoate	-40.273	-30,100	-22.810
ZINC 15085593		(5-oxo-3-phenyl-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)acetic acid	-39.477	-28.265	-22.264

<p>ZINC 01396580</p>		<p>2-[(2-phenyl-1H-1,3-benzimidazol-1-yl)oxy]acetic acid</p>	<p>-38.609</p>	<p>-21.563</p>	<p>-36.474</p>
<p>ZINC 15880082</p>		<p>N-[2-oxo-2-[N'-(2-oxoindol-3-yl)hydrazino]ethyl]pyridine-2-carboxamide</p>	<p>-36.952</p>	<p>-34.866</p>	<p>-33.207</p>
<p>ZINC 72280453</p>		<p>2-(8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)-N'-pyrimidin-2-ylacetohydrazide</p>	<p>-36.581</p>	<p>-42.994</p>	<p>-25.927</p>
<p>ZINC 04139358</p>		<p>4-(4-hydroxyphenyl)amino-4-oxo-2-(3-pyridylmethylamino)butanoic acid</p>	<p>-36.377</p>	<p>-46.682</p>	<p>-32.330</p>

ZINC 31308822		(Z)-4-[3-[[[(Z)-4-hydroxy-4-oxo-but-2-enoyl]amino]anilino]-4-oxo-but-2-enoic	-35.769	-32.336	-34.293
------------------	---	--	---------	---------	---------

In vitro screening

The antimicrobial activity using the disc-diffusion assay

The paper disk diffusion method on agar medium allowed us to highlight

the antibacterial power of the compounds tested against bacterial strains. The results are grouped in table 4. The values shown are the average of two measures.

Table4. Growth inhibition of three bacterial strains

Tested compound	Compounds (500nmole/disc)	Diameter of the growth inhibition zone (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	ZINC15880082	-	-	-
2	ZINC15085593	-	-	-
3	ZINC04139358	-	-	-
4	ZINC05515132	-	-	-
5	ZINC01396580	-	-	-
6	ZINC31308822	-	-	-
7	ZINC04785369	10± 0.2	10±0.5	-
8	ZINC72280453	-	-	-
9	ZINC03307916	06±0.5	10±0.5	-
10	Ciprofloxacin*	25± 0.5	23± 0.5	30± 0.5

- No activity; (*) 5 µg/disc.

The results of the table 4 show that the degree of sensitivity of each strain to the compounds is different from one species to another. The average of the inhibition zones varied from 07 to 10 mm (Fig. 4). In fact, compound 7 exerts an activity on *E. coli* and *S. aureus*, and compound 9 only inhibits the growth of *S. aureus*. However, the zones of inhibition were smaller than those of the antibiotic, which showed a very large inhibition zone of bacterial growth, as expected (Fig. 4). On the

other hand, the other compounds did not have detectable inhibitory effect for the tested species. With regard to *P. aeruginosa*, none of the compounds was able to inhibit its growth. This bacterium has a high resistance potential compared to other species. The intrinsic resistance of *P. aeruginosa* combines the characteristic membrane impermeability as well as the constitutive or inducible expression of efflux pumps that together limit the number of antibiotics usable in therapeutic [50].



Fig. (4). The inhibitory zones of the tested compounds on bacterial strains. : (a) *E. coli*, (b) *S. aureus* and (c) *P. aeruginosa*. T⁻: The negative control (DMSO) did not show any activity. T⁺: The positive control. The red circles indicate the diameter of inhibition.

These results showed that *S. aureus* was more sensitive than *E. coli* and *P. aeruginosa*. This sensitivity to inhibitors is more pronounced for Gram positive than Gram negative as it has already been observed in several previous studies [51]. The higher resistance of Gram negative bacteria may be related to the complexity of the cell wall of these microorganisms which contains a double membrane, unlike the simple membrane structure

of Gram positive bacteria [51]. This double membrane is known to be involved in the lower susceptibility of Gram negative bacteria to antibiotics compared to Gram positive [52, 53].

Determination of MICs of the best compounds

The MICs of the actives products, obtained by the microdilution method for each bacterial strain, are shown in table 5 and fig 5, 6.

Table5. Minimum inhibitory concentration (MIC)

Compound	Minimum inhibitory concentration (MIC) ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
7 : ZINC04785369	256	64
9 : ZINC03307916	≥ 1024	256
Amoxicilline	64	1
Ciprofloxacin	2	2
Erythromycine	512	64

The MIC of compound **7** is 256 and $64\mu\text{g/mL}$ for *E. coli* and *S. aureus* respectively which is in accordance with the results obtained with the disc-diffusion assay (see table 4). In addition, compound **9** showed a MIC of $256\mu\text{g/mL}$ against the strain of *S. aureus*. The compound **7** belongs to the quinazoline derivatives which have been reported to possess a wide spectrum of biological activities. The results obtained in our study were consistent with those found by other authors, indeed, Jantova *et al.* (2004), Khodarahmi *et al.* (2012) and Zayed & Hassan. (2014) [54-56] found that quinazoline derivatives exhibited promising antimicrobial activities.

These results are in line with *in silico* observations. Compounds **7** and **9** have

shown good binding interactions to the active site of the MetAP enzyme. The docking result is visually shown by establishing numerous hydrophobic and hydrophilic interactions between various amino acid residues of the active site and these inhibitors. The inhibitor **7** forms the most stable MetAP-ligand complex with better inhibitory effect and a binding energy value equal to -40.549 kJ/mol for *E. coli* and $-32,142\text{ kJ/mol}$ for *S. aureus*; followed by compound **9** with a score of -40.273 kJ/mol for *E. coli* and $-30,100\text{ kJ/mol}$ for *S. aureus*. The representative interaction mode of these compounds with the binding pocket of *E. coli* and *S. aureus* MetAPs are given in Fig 5 and Fig 6. In addition, we observed that compound **7** exhibited a weak but significant activity on both, Gram positive and

Gram negative, demonstrating its ability to cross the envelope of these

Many examples of successful virtual screening have been described in recent years [57-62]. From crystallographic protein structures in high resolution, and from previously filtered chemical data banks of varying size and diversity. This process aims to restrict the chemical space of the starting compounds to a list of compounds having most chances to have good results in the experimental tests to avoid unnecessarily testing molecules.

Moreover, a number of marketed medicines come from a rational design

bacteria and reach its intra-cellular target.

based on virtual screening strategies such as [63, 64]:

- Inhibitors of adose reductase: by searching in databases of compounds;
- An inhibitor of a response element of the transactivation of HIV-1 RNA: by rigid docking and search in databases of compounds;
- An inhibitor of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: by docking on combinatorial chemo libraries.

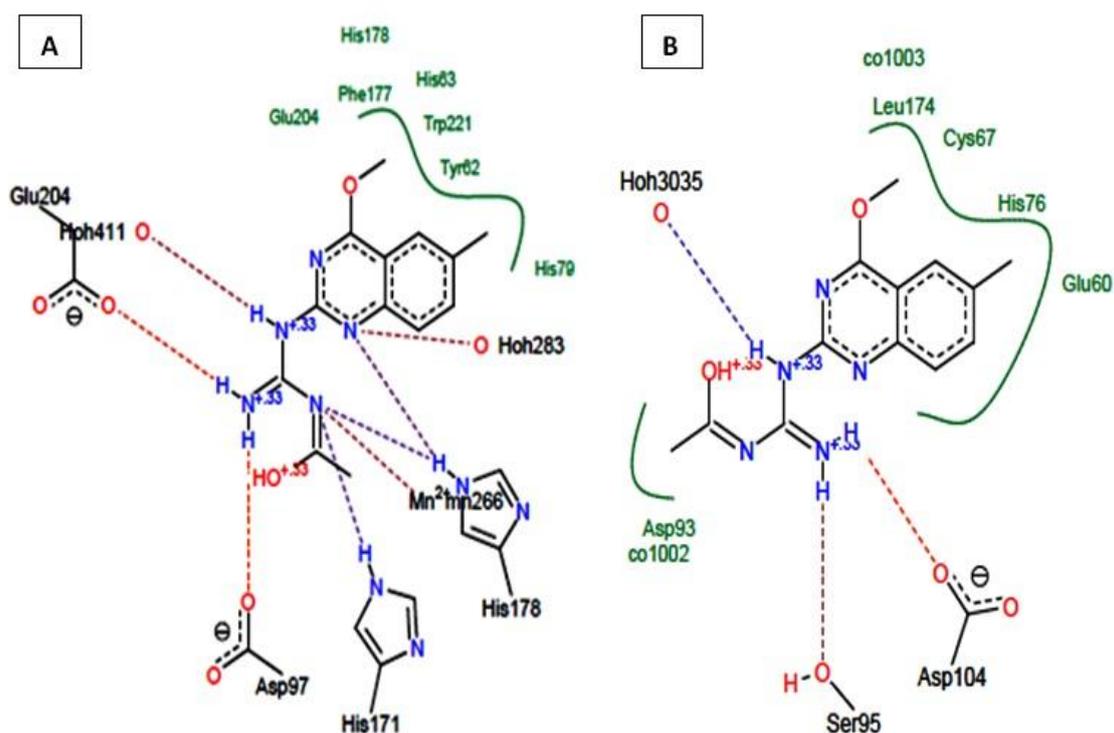


Fig. (5). The docked structure of compound 7 within the binding pocket of MetAP showing their different interactions. **A.** Docking results for compound 7 with *E. coli* MetAP. **B.** Docking results for compound 7 with *S. aureus* MetAP

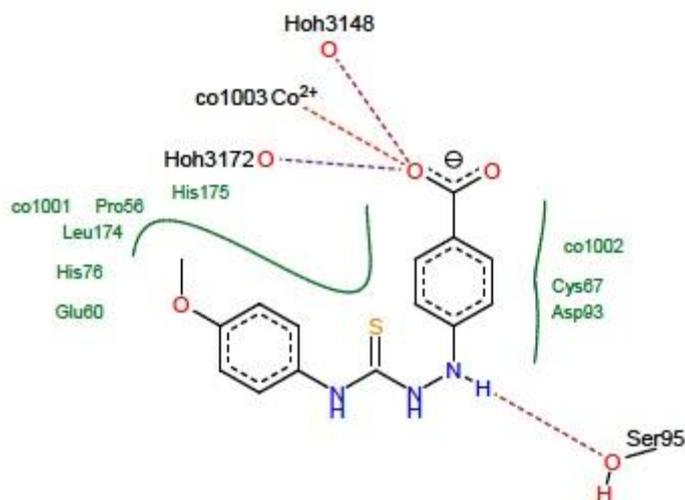


Fig. (6). Binding modes of compound **9** with the active site of *S. aureus* MetAP

CONCLUSION

In this study, we identified two novel potential inhibitors of the bacterial MetAP from the Zinc databank by applying a strategy combining structure-based virtual screening targeting the active site of MetAP and microbiological tests. Thus, these results are particularly encouraging for the development of our approach with possible therapeutic applications for the compounds studied here. Nevertheless, it remains to test these inhibitors directly on our target (MetAP). In this sense, work is currently underway on these two molecules as well as on many other

derivatives, in order to find new antibacterial agents.

ABBREVIATIONS

DMSO Dimethyl Sulfoxide enzyme

E. coli Escherichia coli

MIC Minimal Inhibitory Concentration

MetAP Methionine aminopeptidase

PDB Protein Data Bank

P. aeruginosa Pseudomonas aeruginosa

S aureus Staphylococcus aureus

VS virtual screening

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare they have no conflict of interest.

REFERENCES

[1] Duin, D. V.; Paterson, D. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infect Dis Clin North Am.*, **2016**, 30 (2), 377-390

[2] Jyoti, T.; Shrayanee, D.; Zeeshan, F.; Saif, H. Multidrug Resistance: An Emerging Crisis.

Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases., **2014**, Article ID 541340, 1-7

[3] Colombo, A. L.; Júnior, J. N. ; Guinea, J. Emerging multidrug-resistant Candida species.

Current Opinion in Infectious Diseases. Current Opinion in Infectious Diseases., **2017**, 30 (6), 528-538

[4] Mitra, S.; Job, K. M. ; Meng, L. ; Bennett, B.; Holz, R. C. Analyzing the catalytic role of Asp97 in the methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*. *FEBS Journal.*, **2008**, 275, 6248-6259

[5] Olaleye, O.; Raghunand, T. R.; Bhat, S. ; He, J.; Tyagi, S.; Lamichhane, G. ; Gu, P. ; Zhou, J.; Zhang, Y.; Grosset, J.; Bishai, W. R. ; Liu, J.O. Methionine Aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* as Novel Antimycobacterial Targets. *Chemistry & Biology.*, **2010**, 17, 86-97

[6] Giglione, C.; Boularot, A and Meinel, T. Protein N-terminal methionine excision. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, **2004**, 61, 1455-1474

[7] Chang, S. Y. ; McGary , E. C. ; Chang, S. Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. *Journal of Bacteriology.*, **1989**, 171(7), 4071-4072.

[8] Li, X. ; Chang, Y. H. Amino-terminal protein processing in *Saccharomyces cerevisiae* is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **1995**, 92(26), 12357-12361.

[9] Miller, C. G. ; Kukral, A. M. ; Miller, J. L. ; Movva, N. R. pepM is an essential gene in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology.*, **1989**, 171(9), 5215-5217.

[10] Irwin, J. J. ; Raushel, F. M. ; Shoichet, B. K. Virtual screening against metalloenzymes for inhibitors and substrates. *Biochemistry.*, **2005**, 44, 12316-12328.

[11] Kumar, V.; Krishna, S.; Siddiqi, M. I. Virtual screening strategies: Recent advances

in the identification and design of anti-cancer agents. *Methods.*, **2015**, 71, 64-70

[12] Luciani, R. ; Saxena, P. ; Surade, S. ; Santucci, M. ; Venturelli, A. ; Borsari, C. ; Marverti, G. ; Ponterini, G. ; Ferrari, S. ; Blundell, T. L. ; Costi, M. P. Virtual Screening and X-ray Crystallography Identify Non-Substrate Analog Inhibitors of Flavin-Dependent Thymidylate Synthase. *J Med Chem.*, **2016**, 59(19), 9269-9275.

[13] Xu, Y. ; Tong, X. ; Sun, P. ; Bi, L. ; Lin, K. Virtual screening and biological evaluation of biofilm inhibitors on dual targets in quorum sensing system. *Future Med Chem.*, **2017**, 9(17), 1983-1994.

[14] Spyraakis, F. ; Celenza, G ; Marcocchia, F. ; Santucci, M. ; Cross, S. ; Bellio, P. ; Cendron, L. ; Perilli, M. ; Tondi, D. Structure-Based Virtual Screening for the Discovery of Novel Inhibitors of New Delhi Metallo- β -lactamase-1. *ACS Med Chem Lett.*, **2017**, 9(1), 45-50.

[15] Walters, W. P. ; Stahl, M.T. ; Murcko, M. A. A virtual screening: an overview. *Drug Discov Today.*, **1998**, 3, 160-78.

[16] Shoichet, B. K. Virtual screening of chemical libraries. *Nature.*, **2004**, 432, 862-5.

[17] Ren, J. X. ; Qian, H. L. ; Huang, Y. X.; Zhu, N.Y. ; Si, S. Y. ; Xie, Y. Virtual screening for the identification of novel inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: inhibitors targeting RmlB and RmlC. *Comput Biol Med.*, **2015**, 58, 110-7.

[18] Gupta, P. K. P. ; Sahu, B. Identification of natural compound inhibitors against. peptide deformylase using virtual screening and molecular docking techniques. *Bull.Env. Pharmacol. Life Sci.*, **2015**, 4, 70-80.

[19] Khan, A. U. ; Ali, A.; Danishuddin.; Srivastava, G.; Sharma, A. Potential inhibitors designed against NDM-1 type metallo- β -lactamases: an attempt to enhance efficacies of

antibiotics against multi-drug-resistant bacteria. *Sci Rep.*, **2017**, 7(1), 9207.

[20] Mansuri, R.; Kumar, A.; Rana, S.; Panthi, B.; Ansari, M. Y. ; Das, S.; Dikhit, M. R. ; Sahoo, G. C.; Das, P. *In Vitro* Evaluation of Antileishmanial Activity of Computationally Screened Compounds against Ascorbate Peroxidase To Combat Amphotericin B Drug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, **2017**, 61(7), 1-25.

[21] Cvijetić, I. N. ; Verbić, T. Ž. ; Ernesto de Resende, P. ; Stapleton, P. ; Gibbons, S. ; Juranić, I. O. ; Drakulić, B. J. ; Zloh, M. Design, synthesis and biological evaluation of novel aryldiketo acids with enhanced antibacterial activity against multidrug resistant bacterial strains. *Eur J Med Chem.*, **2018**, 143, 1474-1488.

[22] Fer, M. J. ; Corre, L. L. ; Pietrancosta, N. ; Evrard-Todeschi, N. ; Olatunji, S. ; Bouhss, A. ; Calvet-Vitale, S. ; Gravier-Pelletier, C. Bacterial Transferase MraY, a Source of Inspiration towards New Antibiotics. *Curr Med Chem.*, **2018**, 25.

[23] Hrast, M.; Jukič, M. Patin, D. ; Tod, J.; Dowson, C. G. ; Roper, D. I. ; Barreteau, H.; Gobec, S. In silico identification, synthesis and biological evaluation of novel tetrazole inhibitors of MurB. *Chem Biol Drug Des.*, **2018**, 1-12.

[24] Foik, I. P. ; Tuszynska, I.; Feder, M.; Purta, E. ; Stefaniak, F.; Bujnicki, J. M. Novel inhibitors of the rRNA ErmC' methyltransferase to block resistance to macrolides, lincosamides, streptogramin B antibiotics. *Eur J Med Chem.*, **2018**, 146, 60-67.

[25] Sin, N.; Meng, L.; Wang, M. Q.; Wen, J. J.; Bornmann, W. G.; Crews C. M. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **1997**, 94(12), 6099-103.

[26] Vaughan, M. D. ; Sampson, P. B. ; Honek, J. F. Methionine in and out of proteins: targets for drug design. *Curr Med Chem.*, **2002**, 9, 385-409.

[27] Ye, Q. Z. ; Xie, S. X. ; Huang, M ; Huang, W. J. ; Lu, J. P. ; Ma, Z. Q. Metalloform-selective inhibitors of escherichia coli methionine aminopeptidase and X-ray structure of a Mn(II)-form enzyme complexed with an inhibitor. *J Am Chem Soc.*, **2004**, 126(43), 13940-1.

[28] Douangamath, A. ; Dale, G. E. ; D'Arcy, A. ; Almstetter, M. ; Eckl, R.; Frutos-Hoener, A. ; Henkel, B.; Illgen, K.; Nerdinger, S.; Schulz, H.; Mac Sweeney, A.; Thormann, M.; Tremml, A.; Pierau, S.; Wadman, S.; Oefner, C. Crystal structures of *Staphylococcus aureus* methionine aminopeptidase complexed with keto heterocycle and aminoketone inhibitors reveal the formation of a tetrahedral intermediate. *J Med Chem.*, **2004**, 47(6), 1325-8.

[29] Lu, J.P.; Ye, Q. Z. Methionine excision captured by the structures of a methionine aminopeptidase. **2013**

[30] Hubbard, R. E. 3D structure and the drug-discovery process. *Mol. BioSyst.*, **2005**, 1, 391-406.

[31] Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.*, **2005**, **45** (1), 177-182.

[32] Monge, A. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche “ *in silico* ” de nouveaux composés bioactifs. PhD thesis, University of Orleans: France, Jun **2007**.

[33] Le Guilloux, V. ; Arrault, A. ; Colliandre, L. Mining collections of compounds with Screening Assistant 2. *J Cheminformatics.*, **2012**, 4 : 20.

- [34] Lipinski, C. A. ; Lombardo, F. ; Dominy, B. W. ; Feeney, P. J. *Journal of Computational Chemistry*. **1998**, 19, 1612-22.
- [35] Lipinski, C. A. ; Lombardo, F. ; Dominy, B. W. ; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **2001**, 46, 3-26.
- [36] Veber, D. F. ; Johnson, S. R. ; Cheng, H. Y. ; Smith, B. R. ; Ward, K.W. ; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry.*, **2002**, 45, 2615-2623.
- [37] Chikhi, A. Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase substances antibactériennes à l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. PhD thesis, University of Mentouri Constantine: Algeria, December **2007**.
- [38] Spencer, R. W. Diversity Analysis in high throughput screening. *J. Biomol. Screening.*, **1997**, 2, 69-70
- [39] Natarajan, R. ; Nirdosh, I.; Basak, S. C. ; Mills, D. R. QSAR modeling of flotation collectors using principal components extracted from topological indices. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2002**, 42, 1425-1430.
- [40] Xue, L.; Godden, J.; Gao, H.; Bajorath, J. Identification of a preferred set of molecular descriptors for compound classification based on principal component analysis. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1999**, 39, 699-704.
- [41] Rarey, M. ; Wefing, S.; Lengauer, T. J. Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *Comput. Aided Mol. Des.*, **1996**, 10, 41-54.
- [42] Böhm, H. J. A New Method for the De Novo Design of Enzyme Inhibitors. *J Comput Aided Mol Des.*, **1992**, 6, 61-78.
- [43] Bessadok, M. A. La multiplicité de transport de la P-glycoprotéine : Etudes de modélisation comparative et de docking au sein de la famille des protéines ABC. Ph D Thesis, Pierre and Marie Curie University : France, Jun **2012**.
- [44] Huahg, S. Y. ; Zou, X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, 11, 3016-3030.
- [45] Comité de l'antibiogramme (CA-SFM). Société Française de Microbiologie. **2017**.
- [46] Yves, P.; Elisabetta, L.; Hongliang, Z.; Christophe, M. DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology.*, **2010**, 17, 421-33.
- [47] Vogelman, B.; Craig, W. A. Kinetics of antimicrobial activity. *J Pediatr.*, **1986**, 108(5), 835-840.
- [48] Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 6ème édition **2011**. <http://www.sante.dz/aarn> (Accessed May 23, 2017).
- [49] Archambaud, M. Les Antibiotiques. Mode d'action. Mécanismes de Résistance. Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse., **2009**.
- [50] Mérens, A. ; Delacour, H. ; Plésiat, P. ; Cavallo, G. D. ; Jeanno, K. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance. *Revue Francophone des Laboratoires.*, **2011**, 41(435), 49-62.
- [51] Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev.*, **1992**, 56, 395-411.
- [52] Masi, M. ; Réfrégiers, M. ; Pos, K. M. & Pagès, J. M. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in

Gram-negative bacteria. *Nature Microbiology*., **2017**, 2(3), 17001.

[53] Domalaon, R.; Idowu, T.; Zhanel, G. G. ; Schweizer, F. Antibiotic Hybrids: the Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens? *Clinical Microbiology Reviews*., **2018**, 31(2), 1-45.

[54] Jantová, S.; Stankovský, S.; Špirková, K. In vitro antibacterial activity of ten series of substituted quinazolines. *Biologia, Bratislava*., **2004**, 59(6), 741-752.

[55] Khodarahmi, G.; Jafari, E.; Hakimelahi, G.; Abedi, D.; Rahmani Khajouei, M.; Hassanzadeh, F. Synthesis of Some New Quinazolinone Derivatives and Evaluation of Their Antimicrobial Activities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*., **2012**, 11 (3), 789-797.

[56] Zayed, M. F.; Hassan, M. H. Synthesis and biological evaluation studies of novel quinazolinone derivatives as antibacterial and anti-inflammatory agents. *Saudi Pharmaceutical Journal*., **2014**, 22, 157-162.

[57] Mishra, R.C.; Kumari, R. ; Yadav, S.; Yadav, J.P. Target Based Virtual Screening of New Leads Inhibitor against Bacterial Cell Division Protein FtsZ for the Discovery of Antibacterial Agents. *Med Chem*., **2019**. doi: 10.2174/1573406415666190206233448.

[58] Nastasa, C.; Vodnar, D.C.; Ionu, L.; Stana, A.; Benedec, D.; Tamaian, R. ; Oniga, O and Tiperciuc, B. Antibacterial Evaluation and Virtual Screening of New Thiazolyl-Triazole Schiff Bases as Potential DNA-Gyrase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19, 222,1-18

[59] Helgren, T.R.; Chen, C.; Wangtrakuldee, P.; Edwards, T.E.; Staker, B.L.; Abendroth, J.; Sankaran, B.; Housley, N.A.; Myler, P.J.; Audia, J.P.; Horn, J.R.; Hagen, T.J. Rickettsia prowazekii methionine aminopeptidase as a promising target for the

development of antibacterial agents. *Bioorg Med Chem*. **2017**, 25(3), 813-824.

[60] Kokkonen, P.; Kokkola, T.; Suuronen, T.; Poso, A.; Jarho, E.; Lahtela-Kakkonen M. Virtual screening approach of sirtuin inhibitors results in two new scaffolds. *Eur J Pharm Sci*., **2015**, 76, 27-32.

[61] Petersen, G.O.; Saxena, S.; Renuka, J.; Soni, V., Yogeewari, P.; Santos, D.S.; Bizarro, C.V.; Sriram, D. Structure-based virtual screening as a tool for the identification of novel inhibitors against Mycobacterium tuberculosis 3- dehydroquinase dehydratase, *J Mol Graph Model*., **2015**, 60, 124-131.

[62] Samal, H.B.; Das, J.K.; Mahapatra, R.K.; Suar, M. Molecular modeling, simulation and virtual screening of MurD ligase protein from *Salmonella Typhimurium* LT2. *J Pharmacol Toxicol Methods*., **2015**, 73, 34-41.

[63] Stahl, M. Structure-based library design. In *Virtual Screening for Bioactive Molecules*. Wiley-VCH., **2000**, 229- 264.

[64] Schneider, G.; Böhm, H.-J. Virtual screening and fast automated docking methods. *Drug Discov Today*., **2002**, 7, 64-69.

REVIEW ARTICLE

Virtual Screening and *in vitro* Antibacterial Activity for the Identification of Novel Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Methionine Aminopeptidase

Hanane Boucherit^{a,b,*}, Abdelouahab Chikhi^a, Abderrahmane Bensegueni^a, Amina Merzoug^{a,b} and Denis Tritsch^c

^aLaboratory of Applied Biochemistry, Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Mentouri Brothers University, Constantine 1 - Algeria; ^bAbdelhafid Boussouf University Center, Mila, Algeria; ^cUniversité de Strasbourg, CNRS, Strasbourg, UMR 7177, Institut Le Bel, 4 rue Blaise Pascal, 67081 Strasbourg, France

Abstract: Background: With the increase of resistance rates among many pathogenic bacterial species, this led to a huge public health problem; the ongoing need for the development of new antibiotics that target new pathways is obvious. As such, the MetAP is an attractive target for the development of new antimicrobials, because it is involved in the protein processing in bacteria.

Objective: To screen the potential MetAP of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitor by *in silico* virtual screening of ZINC database and evaluate the best potential lead molecule by *in vitro* studies.

Results and Conclusion: In this research, we used the FlexX program to screen collections of chemical compounds against the protein target. Before performing the molecular docking, FlexX was validated by tow tests to determine the reproducibility of docking program. After the virtual screening, nine chemical compounds of the top hits predicted were purchased and evaluated *in vitro* for their antibacterial activities against *Mycobacterium smegmatis*, using the paper disc diffusion method. Among the studied compounds, only the compound ZINC04785369 inhibited the bacterial growth and could be promising antimycobacterial agents. All these may provide something useful for the development of the potent inhibitors.

ARTICLE HISTORY

Received: April 13, 2018

Revised: June 06, 2018

Accepted: June 19, 2018

DOI:

10.2174/1573408014666180626154016

Keywords: Antimicrobial agents, FlexX, methionine aminopeptidase, molecular docking, RMSD, virtual screening, ZINC database.

1. INTRODUCTION

The emergence of multi-resistant pathogenic microorganisms, due to the abusive and inappropriate use of antibiotics, poses a particularly serious public health problem. In effect, the resistance of bacteria to antibiotics sometimes makes the therapeutic treatment ineffective, and puts the practitioner in difficult situations, especially when the life of the patient is involved [1, 2]. The solution to this problem is therefore urgent and requires a search for new antimicrobial agents.

Today, tuberculosis (TB) is one of the top ten causes of mortality in the world. In 2016, 10.4 million people have contracted the disease and 1.7 million died. More than 95% of deaths due to TB occur in low and middle-income countries [3]. The discovery of anti-tuberculosis agents that target

the

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Applied Biochemistry, Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Mentouri Brothers University, Constantine 1 - Algeria and Abdelhafid.Boussouf University Center, Mila, Algeria; Tel: +213-662-90-84-13; E-mail: h.boucherit@centre-univ-mila.dz

new pathways is crucial for an effective therapy against tuberculosis and will limit the development of resistance [4].

The universal mechanism of protein synthesis requires that all proteins start with methionine. However, this first methionine will most often be cleaved while the protein is still being synthesized. The mechanism responsible for this co-translational modification is that of NME (N-terminal methionine excision). It took place in all cell compartments, where there is a protein synthesis. Two classes of proteases comprise the NME: methionine aminopeptidase (MetAP) and peptide deformylase (PDF). Today, a growing number of studies reported that NME enzymes are targets for compounds with antibiotic, antiparasitic, antifungal or anticancer effects [5]. Despite efforts to characterize the signaling pathways associated with it, few effective NME inhibitors have been discovered, mainly because of our limited

knowledge of physiological function. Here, we review

NME pathway as a potential therapeutic target for infection with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Fig. 1).

Among the two proteases comprise the NME; we will focus more particularly on methionine aminopeptidase (MtMe-

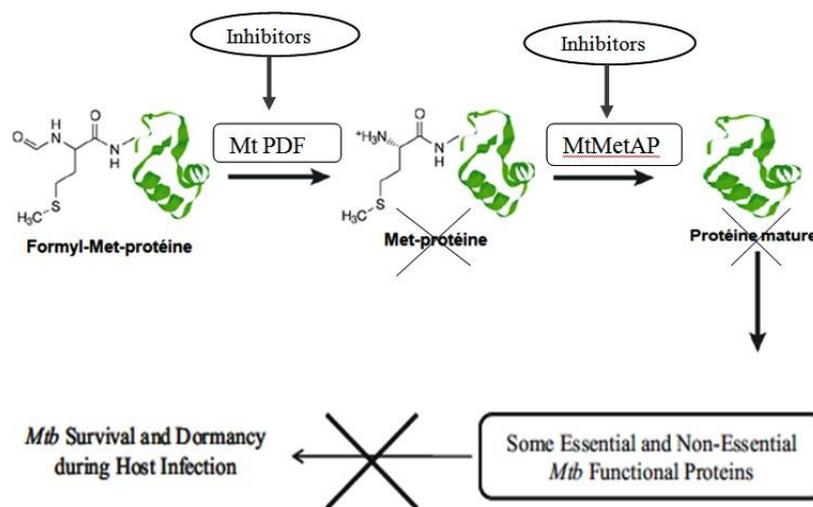


Fig. (1). Inhibition of NME enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*.

tAP); considering the latter as a promising target for developing new antibiotics.

Methionine aminopeptidase (MetAP) is a metalloprotease that hydrolyzes the methionine residue in the N-terminal position during protein synthesis; it is one of the critical steps in protein processing [6]. The lowest and the highest eukaryotes, as well as the bacteria, seem to share the same mechanism for the treatment of proteins, indicating the universality of this system [7, 8]. MtMetAP has less than 48% sequence identity with their human counterpart, HsMetAPI, suggesting that it may be possible to find inhibitors that are selective against the mycobacterial enzyme [4].

The search for new drugs is time-consuming and expensive [9]; any method that speeds up the process is beneficial. Virtual screening (VS) is a computational technique, which is used to screen novel potential active molecules (called hits) from a chemical database. Pharmaceutical companies and many institutions now routinely employ VS as one of the drug discovery methods [10-12]. In order to discover new inhibitors of MtMetAP, we focused our work on the ZINC chemical compound library to perform virtual screening. We selected a set of molecules to be tested *in silico* by molecular docking on the MtMetAP target. Compounds with the highest docking score in the active site of the target would be selected for the biological tests. These inhibitors can later serve as a starting point for a rational design approach in medicinal chemistry.

2. MATERIAL AND METHODS

Ligand Database

The purpose of this work is to identify candidate drugs for the pharmacological target MtMetAP of *Mycobacterium tuberculosis*. We focused our work on the ZINC commercial library (<http://zinc.docking.org>) to screen the collections of chemical compounds against the protein targets. We were interested in molecules called "Lead-Like" in Stock. We selected a set of molecules (1000 compounds) intended to be tested by docking on the MtMetAP target and ready to sell immediately. The Zinc database applies physicochemical

filtering to obtain lead-like compounds. We present below the criteria used. These parameters concerning the properties that a drug can have:

- Molecular weight (g/mol) : 32 - 350 ;
- LogP : -4 - 3.5 ;
- Net charge: -5 - 5 ;
- Rotatable link: 0 - 7 ;
- Polar surface (PSA) A^2 : 0 - 200 ;
- Number of H-link donors: 0 - 5 ;
- Number of H-link acceptors: 0 - 10 ;
- Polar desolvation (kcal/mol) : -400 - 1 ;
- Apolar desolvation (kcal/mol) : -100 - 40.

Flex X Virtual Screening Software

Flex X (<http://www.biosolveit.de>) is a commercial computer program for predicting protein-ligand interactions. For a given protein and a ligand, Flex X predicts the geometry of the complex as well as an estimation of binding strength, the protein is supposed to be rigid [13]. This program uses an incremental approach [14] working without manual intervention. This algorithm is also called fragmentation/reconstruction [15] because at first the ligand is cut into rigid and flexible parts. Between the points where rotations are possible, one or more rigid «ancre» are defined, then the first rigid part is put into interaction with the receiver then, the flexible parts are added successively with an exploration of the torsion angles [16]. In the case of Flex X, the positioning of the first fragment is based not only on surface complementarity but also takes into account hydrogen bonds and hydrophobic interactions that could be formed [15].

Evaluation of the Program

The RMSD

The RMSD corresponds to the average of the deviation of each atom by the report to those of the original molecule.

The best result means that the value of the RMSD between the ligand placement calculated by the software and the confirmation in the experimental complex is as small as possible [17, 18]. The prediction is acceptable if the RMSD value does not exceed 2 Å [19, 20]. The current standard to assess the performance of a docking program is to test from several hundred crystalline protein-ligand complexes [17, 18].

Preparation of the Molecules

The MetAP-inhibitor complex is downloaded from the PDB (Protein Data Bank). The Flex X software requires the 3D structure for both molecules (protein-ligand). In addition, Flex X does not need prior preparation; it uses directly the .pdb format for the enzyme and the .sdf format for the downloaded inhibitor.

Choice of the 3D Structure

Among ten MtMetAP-inhibitor complexes, we have chosen the 3PKA code for our study, because of its good RMSD and resolution (1.25 Å) compared to the other complexes found in the PDB, in addition to, the presence of a co-crystallized inhibitor.

Biological Test

Our budget being very limited, we have chosen to select only nine compounds according to their price and availability in the commercial bank (Table 3). This final set was purchased as a powder from mcule.com Kft. (Budapest, Hungary) and then dissolved at a concentration of 100 mM in DMSO. The codes of the purchased compounds were as follows: ZINC31308822, ZINC15880082, ZINC04139358, ZINC01396580, ZINC05515132, ZINC04785369, ZINC72280453, ZINC03307916 and ZINC15085593. These molecules have been tested *in vitro* for their antibacterial activities on the bacterium *Mycobacterium smegmatis* ATCC19420 in collaboration with Laboratory of Chemistry and Biochemistry of Bioactive Molecules. Faculty of Chemistry, University of Strasbourg (France).

Culture Conditions

Bacteria were grown aerobically at 37°C in a medium liquid containing 0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.2% CaCO₃ and 0.4% D-glucose. They were plated on Petri dishes containing 0.05% yeast extract, 0.05% malt extract, 0.1% CaCO₃ and 0.1% D-glucose and 1.6% agar [21].

The Paper Disc Diffusion Method

Petri dishes were inoculated from 150 µL of a bacterial suspension in logarithmic phase of growth (0.5 Mac Farland corresponding to 10⁶ CFU / mL) in accordance with CASFM recommendations [22]; to obtain a bacterial mat. On each filter paper disc (6 mm in diameter) are applied 8 µL of a solution of the compounds tested. We used Isoniazid (6 µL of a 5mM solution) which is the most effective inhibitor of *M. tuberculosis* growth as a positive control and reference [21]. After an incubation period of 48 hours at 30°C. Using a ruler, the different diameters of the zones of inhibition obtained around the disks are measured twice and photographed.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

Reliability Tests of the Docking Program

The RMSD

The reliability test of the FlexX program by the RMSD was performed on 200 protein-ligand complexes drawn randomly from the PDB (see Annex 01).

The RMSD test allowed us to note that the FlexX software shows a performance to reproduce the experimental poses, indeed, 91% of the RMSD values are less than or equal to 2 Å and that only 09% of the results are greater than 2 Å. Our result confirms the results obtained by Chikhi A and Bensegueni A, (2008) [23] Where the FlexX program has been tested with two other programs, FlexX showed a performance to reproduce the experimental tests with 80.6% of the RMSD values being less than or equal to 2 Å. In accordance with the work of Hioal K S *et al.*, (2012) [24] FlexX gives 55.56% of RMSD values less than or equal to 2Å. This result is also comparable to that reported by Gabb *et al.*, (1997) [25], Vieth *et al.*, (1998) [26], which shows that any docking program is successful when the RMSD is less than 2 Å.

Visual Analysis

For the chosen MetAP-inhibitor complex (3PKA-Y02), the visual analysis shows that the model of the inhibitor simulated by FlexX is correctly placed in the active site of MetAP (Fig. 2). It has a very close spatial conformation or even superimposable to that determined experimentally (colored green).

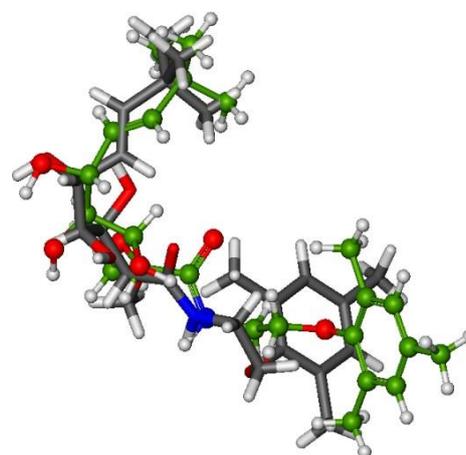


Fig. (2). Superposition of ligand Y02 given by X-ray (colored in green) and by molecular docking with FlexX.

In the light of the results of RMSD test and visual analysis, we can conclude that the FlexX program is working correctly. So we can use it without too much risk of errors to screen the ZINC database for the purpose of discovering new inhibitors of MtMetAP as new therapeutic agents.

Molecular Docking Study

Docking is one of the commonly used computational methods in structure-based drug design [27]. In order to treat the mode of interaction of different inhibitors available at the

Annex 1. List of 200 complexes used to calculate the RMSD with Flex X.

Number	Code	RMSD Å	Number	Code	RMSD Å
1	1A4G	0.518	101	2P98	0.774
2	1A4Q	0.906	102	2PRK	2.066
3	1AQN	1.718	103	2Q92	0.921
4	1B9S	0.953	104	2Q93	0.696
5	1B9T	1.870	105	2Q95	1.174
6	1B9V	0.943	106	2Q96	1.831
7	1C1C	0.841	107	2QT9	1.344
8	1C6X	2.060	108	2QTB	1.574
9	1C23	1.046	109	2QWD	1.182
10	1C27	1.236	110	2QWE	0.664
11	1CP6	1.831	111	2QWF	0.478
12	1E8V	0.964	112	2QWG	0.759
13	1EP4	1.194	113	2QWK	0.599
14	1EUS	0.707	114	2RF2	1.261
15	1EUU	1.904	115	2RGU	0.939
16	1F8B	1.014	116	2RIP	1.842
17	1FK9	0.796	117	2RKI	0.847
18	1FKO	0.795	118	2SIM	0.535
19	1G2A	0.885	119	2SLI	0.663
20	1G27	0.902	120	2VG5	0.403
21	1HNV	1.226	121	2VG6	0.517
22	1INF	1.200	122	2VG7	0.337
23	1ING	1.342	123	2VVZ	0.703
24	1IVD	1.920	124	2VW1	0.735
25	1IX1	1.268	125	2WAJ	0.665
26	1GSO	1.247	126	2WIH	0.986
27	1KJ1	1.365	127	2WON	1.170
28	1KQ0	1.324	128	2ZD1	0.754
29	1L7F	0.581	129	2ZOQ	0.756
30	1L7H	1.077	130	3AH4	2.002
31	1LM4	0.883	131	3B7E	0.506
32	1LOK	1.190	132	3B7R	1.645

(Annex 1) contd.....

Number	Code	RMSD Å	Number	Code	RMSD Å
33	1LQY	1.567	133	3B7U	1.108
34	1LRU	0.957	134	3C6U	1.061
35	1LRY	1.156	135	3C43	2.027
36	1M7G	0.686	136	3CHR	1.483
37	1MT3	1.213	137	3CKZ	0.578
38	1MWE	2.076	138	3CL0	0.639
39	1NN2	1.548	139	3CMD	0.663
40	1O86	1.076	140	3D4L	0.693
41	1QXY	1.285	141	3D27	1.210
42	1R5G	1.796	142	3DLG	0.988
43	1R5H	1.874	143	3DM2	1.476
44	1S1W	2.021	144	3DOK	0.914
45	1S17	0.540	145	3DOL	1.413
46	1SLI	1.025	146	3E3U	1.222
47	1SZZ	2.074	147	3EBH	1.373
48	1TKF	2.001	148	3EBI	1.882
49	1TKH	0.871	149	3EIO	0.872
50	1TKT	0.764	150	3F8S	1.400
51	1TXR	1.705	151	3FFI	1.376
52	1V3C	0.569	152	3FHR	1.460
53	1V3D	0.781	153	3FMM	0.974
54	1VCJ	1.617	154	3G5K	1.350
55	1VEY	2.093	155	3GC7	0.728
56	1W00	1.521	156	3GC8	0.867
57	1W8N	0.915	157	3GCP	0.851
58	1W8O	1.555	158	3GCQ	0.738
59	1WCQ	0.782	159	3GCS	0.523
60	1WS1	1.953	160	3GCU	1.311
61	1X70	2.074	161	3HV6	1.040
62	1XBU	1.428	162	3IU8	1.373
63	1XNZ	0.900	163	3K6L	0.861
64	1XOU	0.739	164	3KED	2.003
65	1XRY	1.833	165	3KWF	1.031

(Annex 1) contd.....

Number	Code	RMSD Å	Number	Code	RMSD Å
66	1YVM	1.731	166	3L03	0.350
67	1YW9	2.005	167	3L8X	0.834
68	2ADU	1.458	168	3LAK	0.663
69	2AI7	1.092	169	3LN1	1.404
70	2AIE	1.079	170	3LQL	0.813
71	2B3L	2.000	171	3MBL	1.427
72	2B5J	1.090	172	3MH3	1.259
73	2BAN	1.934	173	3NNU	2.000
74	2BE2	1.027	174	3O1L	1.135
75	2BER	0.572	175	3OBJ	0.739
76	2BEB	1.215	176	3ONC	0.616
77	2CCV	0.518	177	3PGH	0.908
78	2CGZ	1.764	178	3PTB	0.567
79	2DQM	1.296	179	3RR3	1.742
80	2EK9	1.368	180	3SLI	0.667
81	2EVC	0.567	181	AQWK	0.599
82	2EVM	1.201	182	1BQM	5.277
83	2EW5	1.348	183	1BS4	5.965
84	2EW6	1.167	184	1BSZ	6.739
85	2GBI	0.917	185	1HNI	5.602
86	2GG0	1.596	186	1R58	3.587
87	2GG3	1.801	187	2BB7	4.787
88	2GG5	2.018	188	2EVO	6.897
89	2GG8	2.011	189	2FJP	8.155
90	2GU5	1.189	190	2GG7	6.634
91	2GU6	0.828	191	2GG9	3.058
92	2HHA	1.476	192	2GGB	3.057
93	2HPT	1.540	193	2I3Z	4.773
94	2HT7	1.448	194	2NQ6	4.709
95	2HTQ	0.693	195	2OPH	4.289
96	2HTU	1.314	196	2P9A	4.733
97	2IIV	1.226	197	2Q94	3.164
98	2JID	0.996	198	2QWB	3.828
99	2OKL	1.273	199	2X52	5.307
100	2OS3	1.015	200	2P98	0.774

Table 1. Docking results for MtMetAP.

Ligand	Name	Score kJ/mol	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot	Ref.
Y08	(E,2R,3R,4S,5R)-N-[[[(3S)-1-cyclopropylcarbonylpiperidin-3-yl]methyl]-2-methoxy-8,8-dimethyl-3,4,5-tris(oxidanyl)non-6-enamide	-36.513	-44.667	-14.437	-11.237	8.042	18.200	[28]
Y16	(E,2R,3R,4S,5R)-N-(2-azanyl-2-oxidanylidene-ethyl)-2-methoxy-8,8-dimethyl-3,4,5-tris(oxidanyl)non-6-enamide	-32.263	-41.135	-10.545	-10.124	7.359	16.800	[28]
Y02	(2R,3R,4S,5R,6E)-3,4,5-trihydroxy-2-methoxy-8,8-dimethyl-N-[2-(2,4,6-trimethylphenoxy)ethyl]non-6-enamide	-29.748	-38.328	-16.658	-11.482	11.691	19.600	[28]
FCD	5-(2-CHLOROPHENYL)FURAN-2-CARBOXYLIC ACID	-29.080	-28.582	-5.960	-5.215	5.277	0.000	[29]
HCM	(2S)-2-amino-4-(methylsulfanyl)butanoic acid	-27.279	-36.400	-5.507	-3.979	4.228	8.400	[30]
Y10	(E,2R,3R,4S,5R)-N-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-2-methoxy-8,8-dimethyl-3,4,5-tris(oxidanyl)non-6-enamide	-27.097	-32.666	-13.221	10.309	8.299	15.400	[28]
TO7	5-[(2,4-dichlorobenzyl)sulfanyl]-4H-1,2,4-triazol-3-amine	-22.344	-21.579	-7.574	-5.639	2.847	4.200	[29]
TO3	3-[(4-fluorobenzyl)sulfanyl]-4H-1,2,4-triazole	-17.988	-17.903	-9.713	-2.877	2.905	4.200	[29]

PDB level with the active site of the MetAP enzyme by the molecular docking method, we used the version 2.2.0, 2016 of FlexX program. This version shows the hydrophobic links and the hydrogen bonds, the latter are the most important among the weak bonds.

Interaction MetAP-Inhibitors (PDB)

In the aim of finding new inhibitors of MtMetAP, we study, in the first place, the mechanism of inhibition set up by inhibitors that are already tested by other authors and found at the PDB level. The structures and the results of the simulation by FlexX of these compounds are represented below in Table 1.

The results in Table 1 show that among the 08 docked inhibitors, compound Y08 (score = -36.513 kJ / mol) with the highest score is the most potent inhibitor of MtMetAP. For this reason, we have chosen these compounds as reference models to interpret their different established interactions with the enzyme in question.

Visual Analysis of Interactions « MtMetAP-Y08 »

Fig. (3) shows the active site of MtMetAP complexed with inhibitor Y08. The latter is well centered in the active site of the enzyme. Two hydrophobic pockets stabilize the inhibitor in the binding site of MtMetAP. They are carried out with residues Phe211, Thr94, His114, Cys105, Glu238, His205, His212, Thr203, Val216 and Phe202. In addition, the inhibitor Y08 forms with the active site of MetAP ten hydrogen bonds:

-A hydrogen bridge is observed between the carbonyl of the inhibitor and one of the nitrogen atoms of the cycle of His141 (O₈ H-N_{E2}-His141);

- Two hydrogen bridges are observed between two carbonyl functions of Asp131 with the hydroxyl of the Y08 inhibitor (O-H.....O_{D1}-Asp262) and (O-H... O_{D2}-Asp262);

- A hydrogen bond is observed between the NH group of the inhibitor and the carbonyl of Thr203 (N₁-H... O-Tyr203);

- Two hydrogen bridges are observed on the one hand between the OH group of the inhibitor and on the other hand with the carbonyl of Asp104 (O₅-H.....O_{E1}-Glu238) and (O₅-H... O_{E2}-Glu238);

- Two hydrogen bridges are established between the NH group of His212 and the two carbon atoms of the inhibitor Y08 (O₄.....H- N_{E2}-His212) and (O₆..... H- N_{E2}-His212);

- Two hydrogen bonds are observed between the inhibitor Y08 and the ion Mn²⁺ 286 present in the active site (O₄.....Mn286) and (O₆..... Mn286);

- A hydrogen bridge between the hydroxide of the inhibitor Y08 and the metal ion Mn²⁺ (O₅.....Mn287).

In silico Screening

In order to find new, more potent inhibitors of MtMetAP, we performed a screening of 1000 molecules (annex 2) against MtMetAP on the crystallographic structure 3PKA. These chemical compounds are downloaded from the ZINC database in .sdf format. We have compared the docking score of these inhibitors (ΔG) with the reference inhibitors (Table 2) and proposed the best inhibitors of the MtMetAP enzyme. For this reason, we have selected a total of 100 compounds that represent values below that of the reference inhibitors.

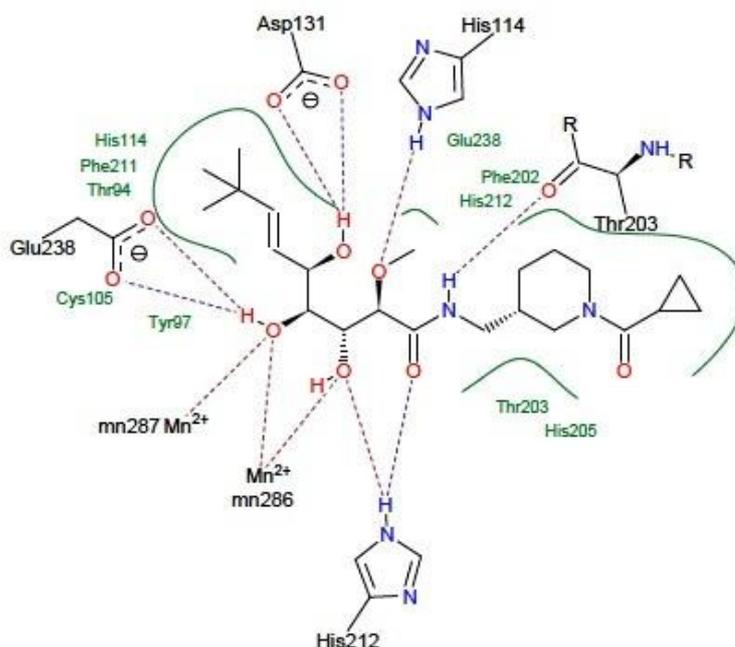


Fig. (3). Representation of the interactions formed by the inhibitor Y08 in the active site of 3PKA.

Annex 2. The codes of 1000 selected compounds.

| Code ZINC |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ZINC18252424 | ZINC32919079 | ZINC57958261 | ZINC44716172 | ZINC05736197 |
| ZINC06276906 | ZINC12989177 | ZINC57968056 | ZINC73708602 | ZINC57153543 |
| ZINC97018373 | ZINC54763507 | ZINC95750605 | ZINC71284265 | ZINC13033286 |
| ZINC53224186 | ZINC78710220 | ZINC57965299 | ZINC71279261 | ZINC83704952 |
| ZINC55200167 | ZINC67868642 | ZINC89851205 | ZINC30692410 | ZINC56488147 |
| ZINC76715845 | ZINC19801170 | ZINC82710021 | ZINC76193770 | ZINC20920611 |
| ZINC73695864 | ZINC10214653 | ZINC82678698 | ZINC11563341 | ZINC41671516 |
| ZINC03443609 | ZINC04978203 | ZINC82705842 | ZINC06962248 | ZINC19775936 |
| ZINC03443609 | ZINC77488970 | ZINC65341520 | ZINC17200993 | ZINC33520966 |
| ZINC71612844 | ZINC04707651 | ZINC82459618 | ZINC09357819 | ZINC76371757 |
| ZINC82459980 | ZINC67292645 | ZINC53702954 | ZINC12049038 | ZINC95933641 |
| ZINC73695864 | ZINC28950516 | ZINC76260092 | ZINC02539067 | ZINC16136699 |
| ZINC54965407 | ZINC05938510 | ZINC72273249 | ZINC11461583 | ZINC04187539 |
| ZINC82459992 | ZINC84500178 | ZINC58508393 | ZINC01705819 | ZINC75817741 |
| ZINC75877664 | ZINC77378043 | ZINC62198901 | ZINC29632256 | ZINC83703660 |
| ZINC73662076 | ZINC65453001 | ZINC77045304 | ZINC50856957 | ZINC82689969 |
| ZINC71782032 | ZINC78710315 | ZINC32507781 | ZINC75946884 | ZINC19273565 |
| ZINC02534098 | ZINC07307121 | ZINC17086806 | ZINC72308507 | ZINC33439422 |
| ZINC07343182 | ZINC65506601 | ZINC65351479 | ZINC82705822 | ZINC00057176 |
| ZINC96153269 | ZINC20733006 | ZINC45951331 | ZINC58021795 | ZINC05011132 |

(Annex 2) contd....

| Code ZINC |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ZINC73696604 | ZINC69519830 | ZINC15223641 | ZINC64936867 | ZINC71443007 |
| ZINC76137373 | ZINC02652839 | ZINC02543626 | ZINC71979019 | ZINC33440581 |
| ZINC67847315 | ZINC72473310 | ZINC04638792 | ZINC62239156 | ZINC19418344 |
| ZINC65355468 | ZINC19148170 | ZINC79100265 | ZINC77505340 | ZINC20259426 |
| ZINC65354376 | ZINC00524548 | ZINC04716418 | ZINC95391862 | ZINC20326064 |
| ZINC76260412 | ZINC06535087 | ZINC83325326 | ZINC20134313 | ZINC97179384 |
| ZINC82710029 | ZINC05043389 | ZINC00114563 | ZINC71777022 | ZINC59489375 |
| ZINC65351459 | ZINC03848521 | ZINC05514183 | ZINC95475561 | ZINC00610054 |
| ZINC71644386 | ZINC75822405 | ZINC67172655 | ZINC04816231 | ZINC67741496 |
| ZINC65347792 | ZINC01561928 | ZINC29729673 | ZINC17043201 | ZINC36291174 |
| ZINC76260660 | ZINC23231315 | ZINC71736637 | ZINC25124221 | ZINC67818734 |
| ZINC65348266 | ZINC55342593 | ZINC03361173 | ZINC12948664 | ZINC90686505 |
| ZINC76260864 | ZINC15884913 | ZINC00056570 | ZINC36087435 | ZINC35084333 |
| ZINC65348680 | ZINC00289296 | ZINC82464579 | ZINC76712800 | ZINC77588596 |
| ZINC17086808 | ZINC22854112 | ZINC05721281 | ZINC04107218 | ZINC76540630 |
| ZINC82585460 | ZINC12545617 | ZINC04713500 | ZINC79051262 | ZINC33882795 |
| ZINC65443832 | ZINC45128510 | ZINC71716679 | ZINC04637211 | ZINC57604359 |
| ZINC36178876 | ZINC11954706 | ZINC75657708 | ZINC64366814 | ZINC83579138 |
| ZINC02943405 | ZINC64871373 | ZINC13143362 | ZINC25612458 | ZINC76376320 |
| ZINC82459923 | ZINC76260812 | ZINC45928625 | ZINC95352414 | ZINC91604866 |
| ZINC72417254 | ZINC44978208 | ZINC82675961 | ZINC02227137 | ZINC73695876 |
| ZINC82463482 | ZINC08540060 | ZINC04785369 | ZINC04811673 | ZINC48449004 |
| ZINC76260350 | ZINC17884895 | ZINC83439647 | ZINC69591343 | ZINC38015586 |
| ZINC44891128 | ZINC09111468 | ZINC22161888 | ZINC56131832 | ZINC95362866 |
| ZINC82460490 | ZINC12346395 | ZINC95369480 | ZINC75950522 | ZINC38022482 |
| ZINC65370217 | ZINC63475785 | ZINC41325434 | ZINC68297157 | ZINC74942835 |
| ZINC04675051 | ZINC71765245 | ZINC13718433 | ZINC40283878 | ZINC01555712 |
| ZINC02538098 | ZINC01417030 | ZINC82707186 | ZINC16662220 | ZINC71888332 |
| ZINC54917891 | ZINC77287490 | ZINC52537254 | ZINC55414181 | ZINC03099361 |
| ZINC49875750 | ZINC69741739 | ZINC82705868 | ZINC76193696 | ZINC51041757 |
| ZINC41410890 | ZINC72166410 | ZINC44290512 | ZINC75878781 | ZINC04758920 |
| ZINC41346919 | ZINC24302310 | ZINC71575572 | ZINC02894461 | ZINC71642775 |
| ZINC71649475 | ZINC00207247 | ZINC95937970 | ZINC65404894 | ZINC72416209 |
| ZINC48264560 | ZINC20349762 | ZINC71278843 | ZINC65532966 | ZINC72240826 |
| ZINC05339306 | ZINC72027909 | ZINC72450761 | ZINC55383607 | ZINC72240833 |
| ZINC33894471 | ZINC75785892 | ZINC20722231 | ZINC05321124 | ZINC82717239 |
| ZINC76137641 | ZINC72430827 | ZINC83263300 | ZINC32362750 | ZINC63749305 |

(Annex 2) contd....

| Code ZINC |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ZINC41410864 | ZINC11735001 | ZINC22151060 | ZINC33414053 | ZINC76137383 |
| ZINC38022512 | ZINC65394313 | ZINC04978483 | ZINC02997862 | ZINC76531883 |
| ZINC76844797 | ZINC67756068 | ZINC05929586 | ZINC05690729 | ZINC20027836 |
| ZINC57634707 | ZINC01427047 | ZINC47114893 | ZINC04332529 | ZINC00086215 |
| ZINC04468845 | ZINC20086057 | ZINC15481733 | ZINC05532063 | ZINC09189524 |
| ZINC35672430 | ZINC00488761 | ZINC71186123 | ZINC00486627 | ZINC05078628 |
| ZINC67850137 | ZINC24999372 | ZINC04139358 | ZINC12061235 | ZINC67474821 |
| ZINC05294660 | ZINC49317328 | ZINC58506991 | ZINC97394407 | ZINC05274681 |
| ZINC01742588 | ZINC06501832 | ZINC10254176 | ZINC65425967 | ZINC08381095 |
| ZINC83254310 | ZINC54080529 | ZINC38186411 | ZINC72407035 | ZINC04107221 |
| ZINC67821626 | ZINC03306284 | ZINC04240618 | ZINC77470503 | ZINC91365380 |
| ZINC00320776 | ZINC44551006 | ZINC76170970 | ZINC76094704 | ZINC04107228 |
| ZINC75934812 | ZINC71791616 | ZINC71700261 | ZINC07614305 | ZINC05400141 |
| ZINC16527176 | ZINC03263669 | ZINC82316725 | ZINC00271834 | ZINC65214780 |
| ZINC01396580 | ZINC81747741 | ZINC73647918 | ZINC03056554 | ZINC01293347 |
| ZINC75935048 | ZINC12535207 | ZINC05674873 | ZINC00352957 | ZINC85346626 |
| ZINC49454425 | ZINC18181873 | ZINC19435728 | ZINC78640071 | ZINC73698002 |
| ZINC95973308 | ZINC67773470 | ZINC13521893 | ZINC72287261 | ZINC44548371 |
| ZINC44668070 | ZINC71905544 | ZINC95956892 | ZINC40655044 | ZINC73698124 |
| ZINC19462163 | ZINC72142182 | ZINC05457342 | ZINC72163783 | ZINC01776061 |
| ZINC16310398 | ZINC32923485 | ZINC62668769 | ZINC76326984 | ZINC09074367 |
| ZINC70452225 | ZINC71870001 | ZINC72240780 | ZINC97080105 | ZINC01712810 |
| ZINC72364877 | ZINC57866988 | ZINC69736903 | ZINC05360895 | ZINC01532216 |
| ZINC77520453 | ZINC71467260 | ZINC04690000 | ZINC72255990 | ZINC19481635 |
| ZINC72367082 | ZINC14518098 | ZINC72196745 | ZINC05603841 | ZINC19732289 |
| ZINC72367149 | ZINC08134882 | ZINC82316115 | ZINC08655641 | ZINC77253215 |
| ZINC72360753 | ZINC24735613 | ZINC05541419 | ZINC72453471 | ZINC01384777 |
| ZINC76062915 | ZINC11735003 | ZINC06792631 | ZINC06658266 | ZINC01780152 |
| ZINC72365531 | ZINC47690847 | ZINC49469612 | ZINC71911937 | ZINC40174389 |
| ZINC72438406 | ZINC55107981 | ZINC72196754 | ZINC00361559 | ZINC76136373 |
| ZINC77506087 | ZINC95474449 | ZINC59453182 | ZINC18088205 | ZINC72434831 |
| ZINC72481572 | ZINC72156453 | ZINC65436916 | ZINC71860013 | ZINC76135800 |
| ZINC82729813 | ZINC71869295 | ZINC33307673 | ZINC96341909 | ZINC82619703 |
| ZINC96140810 | ZINC68075335 | ZINC03301986 | ZINC33119402 | ZINC67642364 |
| ZINC03394950 | ZINC04176407 | ZINC06627235 | ZINC03250514 | ZINC35084195 |
| ZINC31945244 | ZINC72366222 | ZINC05123929 | ZINC40510808 | ZINC76360096 |
| ZINC31945264 | ZINC01884473 | ZINC41462647 | ZINC20523379 | ZINC57957926 |

(Annex 2) contd....

| Code ZINC |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ZINC71747253 | ZINC32934925 | ZINC00309259 | ZINC71912178 | ZINC08649701 |
| ZINC67840490 | ZINC76193193 | ZINC11030638 | ZINC06575068 | ZINC19502889 |
| ZINC91893775 | ZINC76193201 | ZINC09019506 | ZINC04340080 | ZINC57957922 |
| ZINC72168750 | ZINC71196118 | ZINC83422462 | ZINC17162374 | ZINC03306928 |
| ZINC14962724 | ZINC05279160 | ZINC13118854 | ZINC01595050 | ZINC04976329 |
| ZINC97038155 | ZINC12575465 | ZINC97048207 | ZINC01577090 | ZINC15587719 |
| ZINC73709178 | ZINC77322114 | ZINC55327328 | ZINC83702252 | ZINC20268356 |
| ZINC18193878 | ZINC48798750 | ZINC73307862 | ZINC03856312 | ZINC38534984 |
| ZINC08622420 | ZINC00273746 | ZINC67351021 | ZINC00610459 | ZINC82698840 |
| ZINC06363163 | ZINC36559228 | ZINC02166100 | ZINC00128014 | ZINC41607686 |
| ZINC13741968 | ZINC04099018 | ZINC22176802 | ZINC03233374 | ZINC19470059 |
| ZINC32577550 | ZINC95970055 | ZINC38033096 | ZINC15961611 | ZINC01697328 |
| ZINC16940803 | ZINC65406542 | ZINC72056717 | ZINC75880121 | ZINC83996128 |
| ZINC76271409 | ZINC12324067 | ZINC11334357 | ZINC97162115 | ZINC55131886 |
| ZINC05515132 | ZINC15081728 | ZINC03307916 | ZINC95418819 | ZINC38009063 |
| ZINC31964207 | ZINC69526194 | ZINC00377285 | ZINC08436210 | ZINC06252090 |
| ZINC19981929 | ZINC91943779 | ZINC19419587 | ZINC72365679 | ZINC35683959 |
| ZINC00041354 | ZINC58551615 | ZINC03136249 | ZINC95366420 | ZINC40803906 |
| ZINC76260218 | ZINC72130904 | ZINC05483816 | ZINC72367071 | ZINC20916421 |
| ZINC41479057 | ZINC38034625 | ZINC83318270 | ZINC32560966 | ZINC19774944 |
| ZINC15927291 | ZINC35021915 | ZINC64290192 | ZINC72418123 | ZINC13343043 |
| ZINC01328093 | ZINC77905926 | ZINC73696722 | ZINC71763887 | ZINC70666540 |
| ZINC76255395 | ZINC17304838 | ZINC77588623 | ZINC72365523 | ZINC25105808 |
| ZINC41670622 | ZINC16276060 | ZINC04715493 | ZINC76260930 | ZINC38008835 |
| ZINC13264873 | ZINC67674071 | ZINC04507945 | ZINC71631778 | ZINC17288732 |
| ZINC14095606 | ZINC67473025 | ZINC27660621 | ZINC72282322 | ZINC07556665 |
| ZINC19473762 | ZINC13730752 | ZINC00398474 | ZINC32149811 | ZINC76674325 |
| ZINC00374062 | ZINC00123611 | ZINC65594332 | ZINC72364669 | ZINC77255834 |
| ZINC11246208 | ZINC71755381 | ZINC76826387 | ZINC95500920 | ZINC76855521 |
| ZINC38008898 | ZINC44979119 | ZINC46122129 | ZINC69841186 | ZINC49457628 |
| ZINC09186269 | ZINC65454468 | ZINC16156483 | ZINC51245756 | ZINC72478225 |
| ZINC01429472 | ZINC77009885 | ZINC71495140 | ZINC44901809 | ZINC57548135 |
| ZINC02568642 | ZINC31803266 | ZINC00384458 | ZINC82676140 | ZINC83318897 |
| ZINC00062410 | ZINC58138690 | ZINC76566828 | ZINC97019628 | ZINC48310829 |
| ZINC19519047 | ZINC72304826 | ZINC74427831 | ZINC71853940 | ZINC05818072 |
| ZINC03870990 | ZINC01921996 | ZINC77433423 | ZINC12972915 | ZINC19980086 |
| ZINC82700050 | ZINC03122014 | ZINC31308822 | ZINC19560633 | ZINC22018907 |

(Annex 2) contd....

| Code ZINC |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ZINC71471816 | ZINC58355257 | ZINC13404027 | ZINC31538605 | ZINC95510009 |
| ZINC96141568 | ZINC96013650 | ZINC76370800 | ZINC32071925 | ZINC02579587 |
| ZINC43034805 | ZINC58324010 | ZINC03220519 | ZINC38003617 | ZINC83433699 |
| ZINC00275883 | ZINC41150198 | ZINC41607665 | ZINC77588615 | ZINC35185427 |
| ZINC69604895 | ZINC76260380 | ZINC82316164 | ZINC15769062 | ZINC08702247 |
| ZINC58365863 | ZINC06829898 | ZINC41308149 | ZINC04852056 | ZINC00079676 |
| ZINC49891053 | ZINC77453015 | ZINC75818268 | ZINC15769062 | ZINC13497637 |
| ZINC58479060 | ZINC40555048 | ZINC00198354 | ZINC05937567 | ZINC67434467 |
| ZINC57752185 | ZINC78869234 | ZINC04701078 | ZINC04855023 | ZINC97047349 |
| ZINC00462499 | ZINC71791177 | ZINC82115142 | ZINC95425475 | ZINC44868464 |
| ZINC36777956 | ZINC00370212 | ZINC62666204 | ZINC05731673 | ZINC15880082 |
| ZINC76566671 | ZINC04803982 | ZINC73698761 | ZINC00350917 | ZINC25195805 |
| ZINC71614663 | ZINC77976195 | ZINC00476134 | ZINC89858087 | ZINC38006880 |
| ZINC77597647 | ZINC00234168 | ZINC62203168 | ZINC11991034 | ZINC72151573 |
| ZINC21478941 | ZINC77597612 | ZINC77048900 | ZINC04163185 | ZINC06847420 |
| ZINC01399047 | ZINC95080776 | ZINC08429111 | ZINC75141430 | ZINC42848366 |
| ZINC82585512 | ZINC49882275 | ZINC77065279 | ZINC71632074 | ZINC72157736 |
| ZINC77597498 | ZINC67714374 | ZINC17015453 | ZINC73417187 | ZINC69879574 |
| ZINC77597680 | ZINC72161491 | ZINC31973324 | ZINC04614609 | ZINC32902169 |
| ZINC03572403 | ZINC67540569 | ZINC73706049 | ZINC04030352 | ZINC71777172 |
| ZINC83579227 | ZINC67489944 | ZINC12985549 | ZINC04851984 | ZINC67654172 |
| ZINC83543530 | ZINC67850474 | ZINC20827573 | ZINC39126700 | ZINC72411104 |
| ZINC31935621 | ZINC67934620 | ZINC95429020 | ZINC06222561 | ZINC49454371 |
| ZINC32069604 | ZINC67879816 | ZINC32202830 | ZINC44979131 | ZINC67691885 |
| ZINC97038161 | ZINC82674657 | ZINC28256733 | ZINC82575521 | ZINC71747222 |
| ZINC00247905 | ZINC67881756 | ZINC38008838 | ZINC04811349 | ZINC65356116 |
| ZINC00064261 | ZINC05014179 | ZINC69588850 | ZINC12981367 | ZINC65349078 |
| ZINC38010144 | ZINC67541287 | ZINC40418314 | ZINC82623455 | ZINC65355410 |
| ZINC36367175 | ZINC82518012 | ZINC03776904 | ZINC76568629 | ZINC67743560 |
| ZINC04901375 | ZINC71643661 | ZINC75572974 | ZINC19843664 | ZINC67771784 |
| ZINC26330961 | ZINC00202657 | ZINC02535611 | ZINC95517227 | ZINC72423997 |
| ZINC25157213 | ZINC67847542 | ZINC76081749 | ZINC05982203 | ZINC72433380 |
| ZINC08702271 | ZINC67739597 | ZINC02535614 | ZINC79464015 | ZINC75776788 |
| ZINC19836702 | ZINC72119463 | ZINC02568605 | ZINC73699978 | ZINC95393214 |
| ZINC04275777 | ZINC72150649 | ZINC95958695 | ZINC90686502 | ZINC78393944 |
| ZINC13171610 | ZINC82518031 | ZINC82575290 | ZINC16769922 | ZINC83296430 |
| ZINC16526031 | ZINC78593749 | ZINC45952347 | ZINC75817590 | ZINC05457426 |

(Annex 2) contd....

Code ZINC	Code ZINC	Code ZINC	Code ZINC	Code ZINC
ZINC06084590	ZINC02593096	ZINC76831520	ZINC00443079	ZINC82674590
ZINC41150210	ZINC00429681	ZINC02560707	ZINC77092664	ZINC67817703
ZINC19689994	ZINC05663879	ZINC71791519	ZINC77091808	ZINC67850975
ZINC75489306	ZINC77072345	ZINC28297202	ZINC95349436	ZINC14075041
ZINC01577004	ZINC65433327	ZINC72280453	ZINC71287514	ZINC21742127
ZINC76866766	ZINC05695643	ZINC72388389	ZINC62318428	ZINC40763013
ZINC04550136	ZINC89484088	ZINC00240267	ZINC57757294	ZINC17724471
ZINC44548373	ZINC12892714	ZINC12923308	ZINC32903076	ZINC07990641
ZINC19414482	ZINC06506773	ZINC72435539	ZINC09604104	ZINC77056200
ZINC49402358	ZINC00310454	ZINC03014796	ZINC46641848	ZINC72275314
ZINC73698286	ZINC23188557	ZINC00214020	ZINC06789845	ZINC83237864
ZINC58231607	ZINC95502800	ZINC05731459	ZINC95392983	ZINC72286390
ZINC40630626	ZINC76578828	ZINC96153023	ZINC72167174	ZINC76420701
ZINC40475678	ZINC95955814	ZINC72467703	ZINC14962055	ZINC08469970
ZINC02402606	ZINC09048115	ZINC72467704	ZINC58009516	ZINC71575448
ZINC69520758	ZINC57631728	ZINC36222674	ZINC07137156	ZINC20255109
ZINC65469112	ZINC04882676	ZINC00521858	ZINC335354783	ZINC82826314
ZINC16942967	ZINC65490988	ZINC43754969	ZINC17052444	ZINC82826312
ZINC00207973	ZINC23142857	ZINC72387491	ZINC06719698	ZINC71256274
ZINC79014548	ZINC00431265	ZINC69815737	ZINC10028011	ZINC15085593
ZINC58267413	ZINC06816130	ZINC53187851	ZINC40497671	ZINC82810991
ZINC77522369	ZINC78814004	ZINC71467671	ZINC16577163	ZINC82824032
ZINC72367069	ZINC72296667	ZINC71754087	ZINC13598312	ZINC82826218
ZINC72360487	ZINC12145909	ZINC33285606	ZINC04852056	ZINC82826320
ZINC72388409	ZINC36649917	ZINC63876826	ZINC00504162	ZINC76190895
ZINC04121440	ZINC40394793	ZINC06671766	ZINC65865625	ZINC76191031
ZINC95970710	ZINC15078637	ZINC04722109	ZINC78796764	ZINC76255361
ZINC72410400	ZINC77505278	ZINC02660292	ZINC97199787	ZINC06604307
ZINC72168891	ZINC40177411	ZINC05749090	ZINC71754087	ZINC76190997
ZINC96010809	ZINC77389084	ZINC13123133	ZINC06671766	ZINC82810750
ZINC96136141	ZINC05875133	ZINC82810785	ZINC38478142	ZINC13971226

Annex 3. FlexX high score of inhibitors in MtMetAP active site.

N	Code	Score Kj/mol	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot
1	ZINC 17911777	-50.583	-50.190	-10.211	-7.185	10.203	1.400
2	ZINC 31308822	-48.642	-47.250	-4.877	-6.018	4.104	0.000

(Annex 3) contd....

N	Code	Score Kj/mol	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot
3	ZINC 75935048	-48.324	-46.604	-10.100	-8.258	7.039	4.200
4	ZINC 22176802	-46.602	-47.385	-12.387	-6.268	5.639	8.400
5	ZINC 76135800	-46.166	-48.387	-8.109	-7.839	7.168	5.600
6	ZINC 95750605	-45.934	-52.756	-9.668	-5.345	9.435	7.000
7	ZINC 15880082	-45.336	-42.053	-9.517	-9.151	5.785	4.200
8	ZINC 62666204	-45.155	-43.058	-7.830	-7.910	5.484	2.800
9	ZINC 59453182	-44.993	-41.348	-9.180	-8.556	5.891	2.800
10	ZINC 54965407	-44.785	-47.428	-10.886	-7.537	4.466	11.200
11	ZINC 04139358	-44.207	-46.460	-11.144	-9.157	7.356	9.800
12	ZINC 75657708	-43.849	-46.197	-6.475	-7.475	-7.377	6.601
13	ZINC 02534098	-43.477	-47.742	-9.472	-7.488	7.426	8.400
14	ZINC 19470059	-43.266	-40.344	-11.371	-6.100	3.549	5.600
15	ZINC 22854112	-43.229	-39.080	-12.678	-8.933	5.063	7.000
16	ZINC 82810750	-43.128	-42.109	-6.888	-7.747	8.217	0.000
17	ZINC 44551006	-42.924	-35.954	-10.218	-8.306	3.355	2.800
18	ZINC 40803906	-42.824	-43.026	-11.500	-6.176	9.680	2.800
19	ZINC 76866766	-42.770	-42.590	-10.665	-6.555	6.040	5.600
20	ZINC 11461583	-42.685	-36.510	-13.642	-8.470	6.338	4.200
21	ZINC 72240833	-42.538	-37.126	-6.552	-6.991	2.731	0.000
22	ZINC 03220519	-42.462	-44.345	-6.499	-7.111	5.893	4.200
23	ZINC 19435728	-42.320	-40.585	-7.564	-7.904	5.533	2.800
24	ZINC 72423997	-42.219	-45.774	-11.003	-7.781	8.541	8.400
25	ZINC 04811349	-41.981	-38.780	-12.483	-5.564	8.048	1.400
26	ZINC 55414181	-41.710	-42.371	-6.182	-9.613	6.857	4.200
27	ZINC 65354376	-41.698	-35.999	-9.889	-6.459	3.849	1.400
28	ZINC 32069604	-41.465	-37.001	-6.369	-7.308	2.413	1.400
29	ZINC 65351459	-41.298	-34.219	-8.320	-7.250	3.092	0.000
30	ZINC 04946329	-41.265	-41.618	-10.609	-6.376	4.938	7.000
31	ZINC 95973308	-41.104	-43.847	-8.119	-8.377	8.241	5.600
32	ZINC 38534984	-41.035	-36.780	-6.208	-6.857	3.410	0.000
33	ZINC 65351479	-40.951	-35.647	-10.828	-7.081	5.833	1.400
34	ZINC 06792631	-40.431	-31.170	-10.906	-5.284	1.529	0.000
35	ZINC 75878781	-40.416	-37.899	-7.049	-6.917	6.050	0.000
36	ZINC 72168750	-40.387	-32.776	-10.360	-10.253	3.403	4.200
37	ZINC 32560966	-40.322	-39.791	-8.376	-5.782	5.428	2.800
38	ZINC 12397457	-40.194	-42.258	-6.446	-6.309	6.620	2.800
39	ZINC 95349436	-40.062	-41.337	-10.637	-6.673	10.384	2.800

(Annex 3) contd....

N	Code	Score Kj/mol	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot
40	ZINC 01396580	-40.049	-40.078	-8.899	-5.711	5.039	4.200
41	ZINC 64871373	-40.013	-29.438	-14.642	-9.835	8.502	0.000
42	ZINC 76568629	-39.984	-41.475	-10.389	-5.224	4.705	7.000
43	ZINC 75934812	-39.887	-37.562	-10.546	-7.594	6.216	4.200
44	ZINC 04638792	-39.774	-41.284	-12.586	-8.848	9.145	8.400
45	ZINC 70009850	-39.644	-39.018	-8.444	-6.407	7.426	1.400
46	ZINC 05695643	-39.559	-31.224	-12.028	-5.075	3.369	0.000
47	ZINC 67474821	-39.494	-34.714	-9.303	-6.775	5.898	0.000
48	ZINC 82585512	-39.429	-43.520	-10.325	-6.506	9.923	5.600
49	ZINC 05937567	-39.288	-35.924	-8.803	-9.606	6.846	2.800
50	ZINC 67789158	-39.247	-38.940	-10.079	-7.029	5.801	5.600
51	ZINC 72433380	-39.221	-39.605	-7.549	-8.912	5.844	5.600
52	ZINC 03099361	-39.185	-40.410	-7.527	-8.776	3.729	8.400
53	ZINC 41607665	-39.161	-40.341	-11.164	-7.765	7.710	7.000
54	ZINC 33882795	-39.149	-40.700	-12.174	-7.279	10.001	5.600
55	ZINC 32071925	-39.111	-38.157	-4.630	-6.664	4.940	0.000
56	ZINC 13741968	-39.000	-39.401	-7.826	-8.702	5.930	5.600
57	ZINC38034625	-38.981	-38.411	-9.854	-7.463	2.948	8.400
58	ZINC 00234168	-38.849	-37.322	-7.281	-6.744	7.098	0.000
59	ZINC 51041757	-38.734	-33.940	-7.664	-6.860	4.331	0.000
60	ZINC 49469612	-38.689	-35.154	-10.220	-6.292	6.177	1.400
61	ZINC 73698002	-38.620	-43.057	-4.339	-6.656	5.833	4.200
62	ZINC 71287514	-38.597	-34.043	-7.627	-7.686	5.359	0.000
63	ZINC 08381095	-38.471	-35.172	-8.753	-6.086	3.340	2.800
64	ZINC 71642775	-38.453	-36.903	-5.811	-7.858	6.719	0.000
65	ZINC 31945244	-38.360	-39.002	-7.720	-7.243	6.006	4.200
66	ZINC 05123929	-38.188	-37.085	-9.827	-6.574	9.899	0.000
67	ZINC 44868664	-38.040	-41.853	-10.599	-7.460	5.267	11.200
68	ZINC 76566828	-37.997	-39.673	-10.746	-7.725	7.748	7.000
69	ZINC 77740503	-37.903	-36.762	-7.845	-6.517	3.621	4.200
70	ZINC 72411104	-37.845	-36.169	-7.656	-7.909	4.289	4.200
71	ZINC 01697328	-37.797	-39.172	-6.460	-7.492	7.127	2.800
72	ZINC 06847420	-37.796	-33.223	-8.166	-9.575	3.569	4.200
73	ZINC 67840490	-37.780	-38.651	-7.933	-5.705	6.309	2.800
74	ZINC 15587719	-37.719	-37.228	-8.794	-8.302	6.999	4.200
75	ZINC 71853940	-37.707	-32.729	-9.499	-8.473	4.794	2.800
76	ZINC 73695864	-37.700	-43.554	-7.380	-6.954	6.389	8.400

(Annex 3) contd....

N	Code	Score Kj/mol	Match	Lipo	Ambig	Clash	Rot
77	ZINC 44716172	-37.684	-34.207	-7.350	-6.538	5.012	0.000
78	ZINC 15927291	-37.680	-30.064	-11.257	-6.728	4.971	0.000
79	ZINC 82459618	-37.647	-38.357	-6.090	-8.670	5.869	4.200
80	ZINC 05515132	-37.034	-29.307	-10.420	-6.408	3.701	0.000
81	ZINC 38022482	-37.022	-38.162	-7.031	-7.794	4.966	5.600
82	ZINC 04785369	-37.004	-35.992	-5.659	-5.873	3.720	1.400
83	ZINC 04707651	-36.684	-27.542	-13.040	-7.706	4.805	1.400
84	ZINC 01742588	-36.630	-40.350	-9.011	-7.051	7.383	7.000
85	ZINC 72280453	-36.488	-32.459	-10.088	-6.410	4.270	2.800
86	ZINC 00462499	-35.959	-41.002	-8.267	-5.974	8.283	5.600
87	ZINC 03361173	-34.960	-36.769	-4.688	-6.101	2.999	4.200
88	ZINC 10254176	-33.747	-33.302	-9.608	-7.030	5.193	5.600
89	ZINC 73647918	-33.552	-32.418	-7.292	-10.137	8.096	2.800
90	ZINC 04855023	-33.143	-26.529	-7.348	-6.963	2.297	0.000
91	ZINC 03307916	-32.362	-28.120	-5.785	-6.632	1.374	1.400
92	ZINC 77048900	-32.275	-27.994	-5.114	-5.841	1.275	0.000
93	ZINC 71278843	-32.154	-29.590	-11.104	-6.756	5.696	4.200
94	ZINC 12535207	-32.036	-31.078	-8.013	-7.806	8.061	1.400
95	ZINC 67714374	-31.984	-32.752	-7.034	-6.624	3.426	5.600
96	ZINC 76371757	-31.885	-36.664	-4.471	-5.161	4.811	4.200
97	ZINC 76371757	-31.873	-25.0912	-11.890	-4.396	4.919	0.000
98	ZINC 07556665	-31.807	-25.303	-8.019	-9.139	2.455	2.800
99	ZINC 69519830	-31.757	-22.551	-5.579	-11.742	2.715	0.000
100	ZINC 15085593	-31.732	-36.719	-6.215	-6.733	6.936	5.600

The codes and results of the FlexX simulation of these compounds are shown in Annex 3.

Molecules Selected as Candidates

Nine of the best chemical compounds of the previous study were evaluated *in vitro* for their antibacterial activities against the bacterial strain *Mycobacterium smegmatis*. The MtMetAP inhibitors tested are shown in the following table.

Bacterial Growth Inhibition

The antimicrobial activity of the nine selected compounds and Isoniazid (INH) was determined using the paper disc diffusion method (Fig. 4). *M. smegmatis* react differently to the tested compounds. The results of the microbialsensitivity test are grouped in Table 3. The values shown are the average of two measures.

According to Table 3, the average of the inhibition zones varied from 6.5 to 19 mm. Among the tested compound, only inhibitor ZINC04785369 was able to inhibit the growth

of *M. smegmatis*. On the other hand, the other compounds had no significant inhibitory effect or the diameters of inhibition did not exceed 7 mm for the tested species. The majority of these compounds were most probably unable to cross the bacterial wall of *M. smegmatis* [31, 32]. Mycobacterium species were unique among Gram-positive bacteria in producing a complex cell wall that contained remarkable lipids and functioned as a permeability barrier. Lipids in the cell wall were hypothesized to form a bilayer or outer membrane that would prevent the entry of chemotherapeutic agents [33].

The active product of the previous study was tested to confirm the obtained results. The same antibiogram was repeated for the compound N7, with increasing deposition (2, 4, 6 and 8 μ l). The diameters of the inhibition zone are given with respect to the amount of inhibitor deposited on the disc (Table 4).

According to the results obtained, it is clear that the compound ZINC04785369 is at the origin of significant areas of inhibition against *M. smegmatis* where diameters vary between 10 and 18 mm (Fig. 5). We note that the antibacterial

Table 2. Molecules selected as candidates.

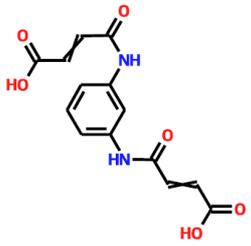
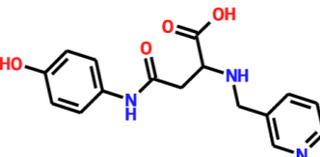
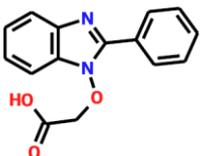
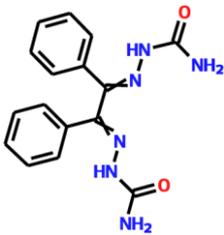
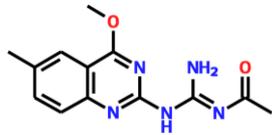
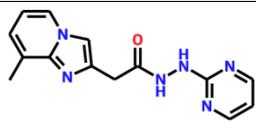
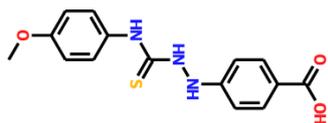
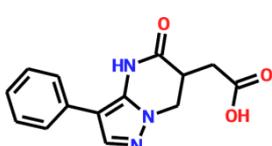
Code	Structure	Name	Score kj/mol
ZINC 3130 8822		(Z)-4-[3-[[[(Z)-4-hydroxy-4-oxo-but-2-enoyl]amino]anilino]-4-oxo-but-2-enoic	-48.642
ZINC 1588 0082		N-[2-oxo-2-[N'-(2-oxoindol-3-yl)hydrazino]ethyl]pyridine-2-carboxamide	-45.336
ZINC 0413 9358		4-(4-hydroxyphenyl)amino-4-oxo-2-(3-pyridylmethylamino)butanoic	-44.207
ZINC 0139 6580		2-[(2-phenyl-1H-1,3-benzimidazol-1-yl)oxy]acetic acid	-40.049
ZINC 0551 5132		(1,2-diphenyl-2-ureidoimino-ethylidene)aminourea	-37.034
ZINC 0478 5369		N-[amino-(4-methoxy-6-methyl-quinazolin-2-yl)amino-methylene]acetamide	-37.004
ZINC 7228 0453		2-(8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)-N'-pyrimidin-2-yl-acetohydrazide	-36.488
ZINC 0330 7916		4-[N'-(4-methoxyphenyl)thiocarbamoyl]hydrazino]benzoate	-32.362
ZINC 1508 5593		(5-oxo-3-phenyl-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)acetic acid	-31.732

Table 3. Growth inhibition of *Mycobacterium smegmatis*.

Tested Compound	Amount of Compound/disc (100mM/8µl) (500nmole/disc)	Diameter of the Growth Inhibition Zone (mm)
1	ZINC15880082	-
2	ZINC15085593	-
3	ZINC04139358	-
4	ZINC05515132	-
5	ZINC01396580	07± 0.5
6	ZINC31308822	6.5± 0.5
7	ZINC04785369	19± 0.5
8	ZINC72280453	-
9	ZINC03307916	-
10	Isoniazide (5mM/ 6 µl)	35± 0.5

- No activity

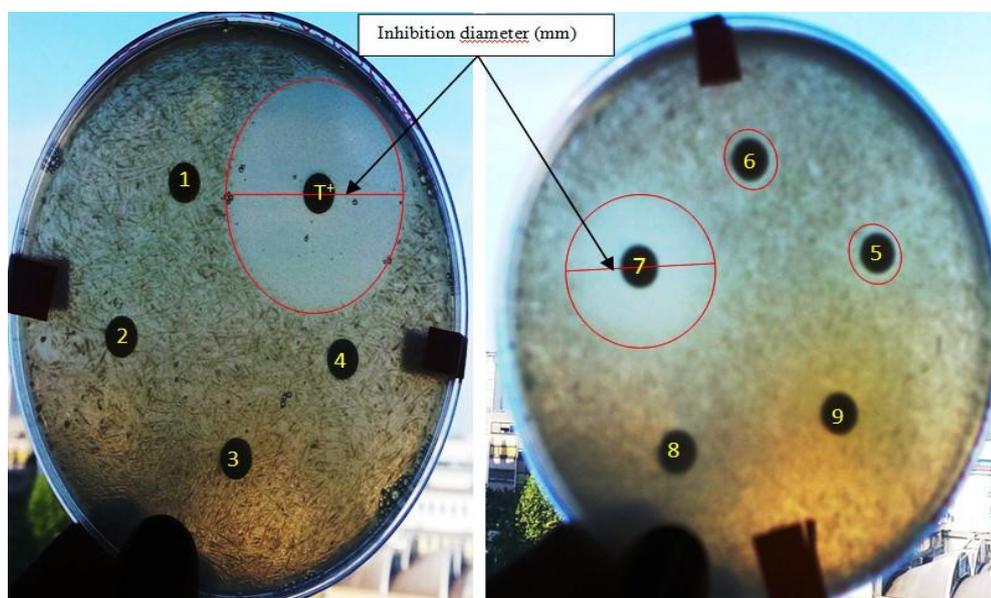


Fig. (4). Photographs of the inhibitory zone of the compounds tested on the bacterial strain.

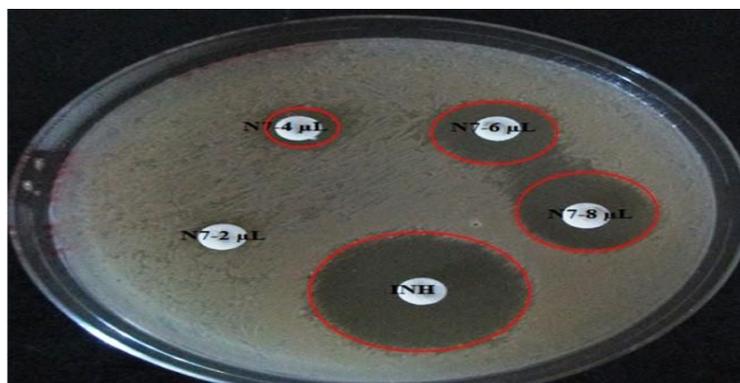


Fig. (5). Diameter of the inhibition zones for the inhibitor ZINC04785369.

Table 4. *M. smegmatis* growth inhibition with compound ZINC04785369.

Compound ZINC04785369	Diameter of the Growth Inhibition Zone (mm)				Isoniazide (6µl/disque) (4 µg/disque)
	(2µl/disque) (55 µg/disque)	(4µl/disque) (109 µg/disque)	(6µl/disque) (164 µg/disque)	(8µl/disque) (218 µg/disque)	
<i>M. smegmatis</i>	-	10± 0.5	16± 0.5	18± 0.5	27± 1

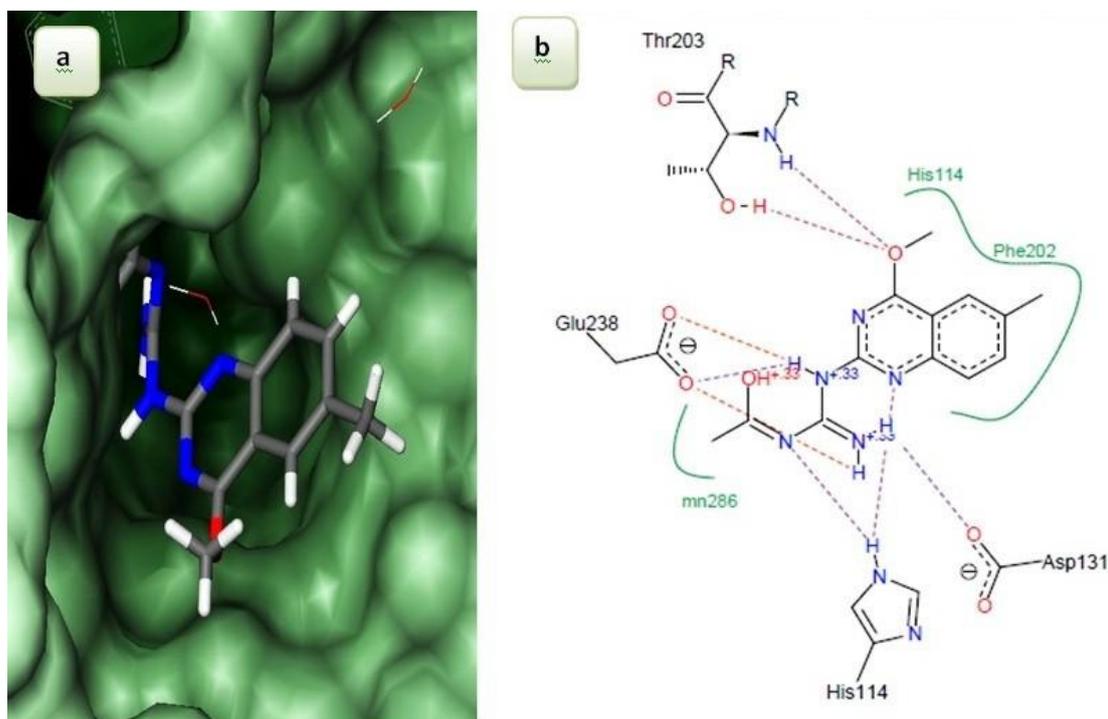


Fig. (6). Docking the inhibitor ZINC04785369 in the active site of MtMetAP. (a). Active site representation of the MtMetAP in complex with ZINC04785369. (b). Representation of the interactions formed by the inhibitor ZINC04785369.

test activity of compound increased with the increase of its concentration. Compound N7 (derivative of quinazoline) is an effective inhibitor of *M. smegmatis* growth.

These results are reliable with *in silico* observations. Inhibitor ZINC04785369 showed good binding interactions at the active site of the MtMetAP enzyme. The docking result is shown visually by the establishment of numerous hydrophobic and hydrophilic interactions between the enzyme and the inhibitor. A visual analysis is summarized in Fig. (6). This compound could, therefore, serve as a lead molecule for further modification to obtain clinically useful antibacterial agents.

CONCLUSION

This study aimed to search *in silico* new chemical structures acting as very potent inhibitors of MtMetAP in the purpose to discover new antimicrobial agents. In order to achieve this objective, we went through several stages.

Firstly, we tested the reliability of the Flex X program according to the following criteria: the RMSD test, which

makes it possible to compare the deviation between the structure simulated by Flex X and that obtained by crystallography. Among the 200 complexes arbitrarily taken from the PDB, 91% had an RMSD less than or equal to 2. The second test allowed us to visually check the results of the RMSD. These tests permitted to conclude that FlexX is very reliable software that can be used with confidence in order to model the interactions of inhibitors tested with the active site of MtMetAP. In a second step, the virtual screening of the ZINC database allowed us to select a total of 100 compounds that represented the best inhibitors of MtMetAP. In a third step, nine of the best compounds of the previous study were evaluated *in vitro* for their antibacterial activities against the bacterial strain *Mycobacterium smegmatis*. Among the 9 compounds tested using the paper disc diffusion method, only ZINC04785369 had a strong inhibitory potential on the growth of *M. smegmatis*. This result is very interesting, because the growth of mycobacteria, including *M. tuberculosis*, responsible for tuberculosis, is the most well-known and very difficult to inhibit due to the presence within these bacteria of a very thick bacterial wall, thus difficult to cross.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Pr Catherine GROSDÉMANGE- BILLIARD and Dr Denis TRITSCH, laboratory of Chemistry and Biochemistry of Molecules Bioactives. University of Strasbourg (France); for helping to make this work.

REFERENCES

- [1] Elhani, D. L'émergence de la résistance aux antibiotiques annonce-t-elle le retour des âges sombres ? *Ann Biol Clin.*, **2011**, 69 (6), 637-46.
- [2] Carle, S. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! *Pharmaceut.*, **2009**, 42, 6-21.
- [3] *Organisation mondiale de la santé (OMS)*. <http://www.who.int>
- [4] Addlagatta, A.; Quillin, M.L.; Omotoso, O.; Liu, J.O.; Matthews, B.W. Identification of an SH3-Binding Motif in a New Class of Methionine Aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* Suggests a Mode of Interaction with the Ribosome. *Biochemistry.*, **2005**, 44, 7166-7174.
- [5] Olaleye, O.A.; Bishaie, W.R.; Liu, J.O. Targeting the role of N-terminal methionine processing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.*, **2009**, S1 (89), S55- S59.
- [6] Olaleye, O.; Raghunand, T.R.; Bhat, S.; He, J.; Tyagi, S.; Lamichane, G.; Gu, P.; Zhou, J.; Zhang, Y.; Grosset, J.; Bishai, W.R.; Liu, J.O. Methionine Aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* as Novel Antimycobacterial Targets. *Chemistry & Biology.*, **2010**, 17, 86-97.
- [7] Nonato, M.C.; Widom, J.; Clardy, J. Human methionine aminopeptidase type 2 in complex with L- and D-methionine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **2006**, 16, 2580-2583.
- [8] Giglione, C.; Serero, A.; Pierre, M.; Boisson, B.; Meinel, T. Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *EMBO Journal.*, **2000**, 19, 5916-5929.
- [9] DiMasi, J.A.; Hansen, R.W.; Grabowski, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics.*, **2003**, 22, 151-185.
- [10] Shoichet, B.K. Virtual screening of chemical libraries. *Nature.*, **2004**, 432, 862-865.
- [11] Stahura, F.L.; Bajorath, J. Virtual screening methods that complement HTS. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening.*, **2004**, 7 (4), 259-269.
- [12] Kumar, V.; Krishna, S.; Siddiqi, M.I. Virtual screening strategies: recent advances in the identification and design of anti-cancer agents. *Methods.*, **2015**, 71, 64-70.
- [13] Rarey, M.; Wefing, S.; Lengauer, T. Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **1996**, 10, 41-54.
- [14] Böhm, H.J. The Computer Program LUDI: A New Method for the De Novo Design of Enzyme Inhibitors. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **1992**, 6, 61-78.
- [15] Bessadok, M.A. (2011). La multiplicité de transport de la P-glycoprotéine : Etudes de modélisation comparative et de docking au sein de la famille des protéines ABC. Thèse de doctorat d'université : Bioinformatique Structurale. Paris : université pierre et marie curie. France. 189p
- [16] Huang, S.Y.; Zou, X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, 11, 3016-3030.
- [17] Kramer, B.; Rarey, M.; Lengauer, T. Evaluation of the FlexX Incremental Construction Algorithm for Protein-Ligand Docking. *Proteins: Structure, Function, and Genetics.*, **1999**, 37, 228-241.
- [18] Kellenberger, E.; Rodrigo, J.; Müller, P.; Rognan, D. Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening Accuracy. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.*, **2004**, 57, 225-242.
- [19] Vieth, M.; Hirst, J.D.; Kolinski, A.; Brooks, C.L. Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.*, **1998**, 19, 1612-1622.
- [20] Chikhi, A.; Bensegueni, A. Docking Efficiency Comparison of Surflex, a Commercial Package and Arguslab, a Licensable Free-war. *J. Comp. Sci. Syst Biol.*, **2008**, 1, 081-086.
- [21] Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Growth inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by prodrugs of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase inhibitors, promising anti-mycobacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, **2012**, 51, 277-285.
- [22] Comité de l'antibiogramme (CA-SFM). Société Française de Microbiologie. **2017**.
- [23] Chikhi, A.; Bensegueni, A. Comparative Study of the Efficiency of Three Protein-Ligand Docking Programs. *Journal of*

- Proteomics and Bioinformatics.*, **2008**, 1, 161-165.
- [24] Hioual, K.S.; Chikhi, A.; Bensegueni, A.; Merzoug, A.; Boucherit, H. Comparative Data on Docking Algorithms: Keeping the Update in the Field Knowledge. *International Journal of Applied Information Systems.*, **2012**, 2, 2249-0868.
- [25] Gabb, J.; Jackson, R.M.; Sternberg, M.J.E. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.*, **1997**, 272, 106-120.
- [26] Vieth, M.; Hirst, J.D.; Kolinski, A.; Brooks, C.L. Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.*, **1998**, 19, 1612-1634.
- [27] Meng, X.Y.; Zhang, H.X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.*, **2011**, 7, 146-57.
- [28] Lu, J.P.; Yuan, X.H.; Yuan, H.; Wang, W.L.; Wan, B.; Franzblau, S.G.; Ye, Q.Z. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Methionine Aminopeptidases by Bengamide Derivatives. *Chemmedchem.*, **2011**, 6, 1041-1048.
- [29] Lu, J.P.; Chai, S.C.; Ye, Q.Z. Catalysis and Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Methionine Aminopeptidase. *J. Med. Chem.*, 2010, 53, 1329-1337.
- [30] Reddi, R.; Arya, T.; Kishor, C.; Gumpena, R.; Ganji, R.J.; Bhukya, S.; Addlagatta, A. Selective targeting of the conserved active site cysteine of Mycobacterium tuberculosis methionine aminopeptidase with electrophilic reagents. *Febs J.*, **2014**, 281, 4240-4248.
- [31] Jackson, M. The Mycobacterial Cell Envelope-Lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, **2014**, 4 (10), a021105.
- [32] Daffé, M.; Draper, P. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity. *Advances in microbial physiology.*, **1998**, 39, 131-203.
- [33] Bansal-Mutalik, R.; Nikaido, H. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2014, 111(13), 4958-4963.

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences**Filière : biochimie Appliquée****Thème : Recherche *in silico* de nouveaux composés bioactifs et applications à l'inhibition de la méthionine aminopeptidase****Résumé**

L'émergence de microorganismes pathogènes multi-résistants, due à l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques, pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant. En effet, la résistance des bactéries aux antibiotiques rend quelque fois le traitement thérapeutique inefficace, et met le praticien dans des situations délicates, surtout lorsque la vie du malade est en cause. La solution de ce problème s'avère donc urgente et impose la recherche de nouveaux agents antimicrobiens. A ce titre, la méthionine aminopeptidase (MetAP) est utilisée comme une cible attrayante pour développer de nouveaux antibiotiques car elle est essentielle à la survie bactérienne. La MetAP est une métalloprotéase qui assure le clivage de la méthionine N-terminale au cours de la synthèse de protéines, une des étapes critiques dans la maturation des protéines.

Ce travail est axé sur le criblage virtuel *in silico* de la chimiothèque commerciale ZINC dans le but de découvrir des molécules à activité inhibitrice plus élevée contre la MetAP bactérienne. Deux opérations de filtrage à partir de la base de données ZINC ont permis de retenir 200 000 composés, parmi les 3.700.000 structures proposées, pour un criblage virtuel par FlexX. Après ce criblage, neuf composés chimiques des meilleurs hits prédits ont été achetés et évalués *in vitro*. L'activité antimicrobienne de chaque inhibiteur de la MetAP a été testée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé contre deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium smegmatis*) et deux bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Parmi les composés étudiés, les inhibiteurs ZINC04785369 et ZINC03307916 ont montré une bonne activité antibactérienne. Pour caractériser davantage leur efficacité, la concentration minimale inhibitrice a été déterminée pour chaque composé par la méthode de microdilution et a donné des résultats significatifs. Ces résultats suggèrent que les composés ZINC04785369 et ZINC03307916 sont des molécules prometteuses pour le développement de nouveaux inhibiteurs de la MetAP bactérienne.

Mots clés: Criblage virtuel, FlexX, chimiothèque ZINC, méthionine aminopeptidase, agents antimicrobiens.

Devant le jury :

Président: M. BENSEGUENI Abderrahmane Professeur U. Frères Mentouri - Constantine 1

Directeur de thèse : M. CHIKHI Abdelouahab Professeur U. Frères Mentouri - Constantine 1

Examineurs : M. LAHOUAL Mesbah Professeur U. M.S. Benyahia - Jijel

M. BOUBENDIR Abdelhafid Maître de conférences A Univ. A. Boussouf - Mila

M. DEMS Mohamed Abd Essalem Maître de recherche - CRBt - Constantine

Mlle. MOSBAH Asma Maître de conférences A U. Frères Mentouri - Constantine 1