

Université Ibn Khaldoun, Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

en

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.
Filière : Sciences Biologiques.
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présenté par :

DAHMANE Sabah

Intitulé

**Recherche des inhibiteurs naturels de l'enzyme bêta-lactamase (BlaC)
à l'origine de l'antibiorésistance chez *Mycobacterium tuberculosis*,
agent responsable de la tuberculose : approche par modélisation
biologique.**

Soutenu le 22 novembre 2020 à 13h

Devant les membres de jury :

Président	Dr. ACHIR M.	MCB
Examineur	Dr. LOUACINI B.	MCA
Examineur	M. SOUANA K.	MAA
Encadrant	Dr. TAIBI K.	MCA
Co-encadrant	Dr. AIT ABDERRAHIM L.	MCA

Année universitaire 2019-2020

الملخص

يتمثل العمل الحالي في البحث عن الجزيئات النشطة المشتقة من المنتجات الطبيعية التي يمكن أن تشكل مثبطات محتملة لإنزيمات بيتا لاكتاماز (BlaC) المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية لبكتيريا المتفطرة السلية المسؤولة عن مرض السل من خلال نهج النمذجة البيولوجية.

كانت النتائج المتحصل عليها قادرة على تسليط الضوء على جدوى البحث واستخدام الجزيئات النشطة ذات الأصل الطبيعي لمواجهة مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية. تم إثبات أن السيفتازيديم هو مضاد حيوي بيتا لاكتام مع أعلى درجة ارتباط مع بيتا لاكتاماز (BlaC) مقارنة بالمضادات الحيوية التسعة الأخرى المعروفة. ومع ذلك ، من بين الجزيئات الحيوية الطبيعية العشرة التي تم اختبارها والتي يمكن أن تمارس تثبيطاً محتملاً للإنزيم BlaC، أظهر الديوسجينين تقارباً أفضل للموقع النشط لـ BlaC مقارنةً بالمضاد الحيوي المرجعي السيفتازيديم. بالإضافة إلى ذلك، أظهر الكاربيين والكاتشين والبربرين أيضاً تثبيطاً محتملاً لهذا الإنزيم ، ولكن بدرجة أقل.

أظهرت الجزيئات النشطة بيولوجياً التي تم تحديدها في هذه الدراسة نتائج واعدة جداً في بيانات السيليكو كمثبطات محتملة لـ BlaC وبالتالي مقاومة المضادات الحيوية. لذلك من المتوقع أن تعمل المثبطات المحددة كنقطة انطلاق أفضل للدراسات التجريبية التي تهدف إلى تصميم واكتشاف مثبطات BlaC. بالإضافة إلى ذلك، فإن التجارب في المختبر وفي الجسم الحي ضرورية لتأكيد القدرة التثبيطية لهذه الجزيئات من أجل تعزيزها كعوامل مضادة للجراثيم.

الكلمات الدالة

السل، المتفطرة السلية ، مقاومة المضادات الحيوية ، بيتا لاكتاماز، بيتا لاكتام، النمذجة البيولوجية، السيليكو، المنتجات الطبيعية.

Résumé

Le présent travail consiste en une recherche des molécules actives issues de produits naturels pouvant constituer de potentiels inhibiteurs des enzymes β -lactamases (BlaC) responsables de l'antibiorésistance bactérienne chez *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose, via une approche de modélisation biologique.

Les résultats obtenus ont pu mettre en évidence la faisabilité de la recherche et d'emploi des molécules actives d'origine naturelle pour contrebalancer l'antibiorésistance bactérienne. Il s'est avéré que la ceftazidime est l'antibiotique bêta-lactamine qui présente une affinité de liaison maximale à la bêta-lactamase (BlaC) par rapport aux autres neuf antibiotiques reconnus. Cependant, parmi les dix biomolécules naturelles testées qui pourraient exercer une potentielle inhibition de l'enzyme BlaC, la diosgénine a présenté une meilleure affinité avec le site actif de BlaC par rapport à l'antibiotique de référence la ceftazidime. De plus, la carpaine, la catéchine et la berbérine ont présenté également une potentielle inhibition de cette enzyme mais à moindre degré.

Les molécules bioactives identifiées dans la présente étude ont montré des résultats *in silico* très intéressants comme de potentiels inhibiteurs de la BlaC et par conséquent de l'antibiorésistance. Il est donc envisagé que les inhibiteurs identifiés serviront de meilleur point de départ pour les études expérimentales visant la conception et la découverte des inhibiteurs de BlaC. De plus, des expériences *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires afin de confirmer le potentiel inhibiteur de ces molécules afin de les promouvoir comme agents antibactériens.

Mots clés

Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, antibiorésistance, β -lactamase, β -lactamines, modélisation biologique, *in silico*, produits naturels.

Abstract

The present work consists of a search for active molecules derived from natural products that can constitute potential inhibitors of β -lactamase (BlaC) enzymes responsible for bacterial antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, responsible for tuberculosis, via a biological modeling approach.

The obtained results were able to highlight the feasibility of research and use of active molecules of natural origin to counteract bacterial antibiotic resistance. Ceftazidime has been shown to be the beta-lactam antibiotic with the highest binding affinity for beta-lactamase (BlaC) compared to the other nine recognized antibiotics. However, among the ten tested natural biomolecules that could exert a potential inhibition of the enzyme BlaC, diosgenin exhibited a better affinity for the active site of BlaC compared to the reference antibiotic ceftazidime. In addition, carpain, catechin and berberine showed also potential inhibition of this enzyme, but to a lesser degree.

The bioactive molecules identified in the present study have shown very interesting *in silico* results as potential inhibitors of BlaC and therefore antibiotic resistance. It is therefore expected that the identified inhibitors will serve as a better starting point for experimental studies aimed at the design and discovery of BlaC inhibitors. In addition, *in vitro* and *in vivo* experiments are necessary to confirm the inhibitory potential of these molecules in order to promote them as antibacterial agents.

Keywords

Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, antibiotic resistance, β -lactamase, β -lactams, biological modeling, *in silico*, natural products.

Remerciements

Ce travail est l'aboutissement d'un dur labeur et de sacrifices, mes remerciements vont d'abord à dieu de m'avoir donné cette opportunité.

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à **Monsieur Taïbi Khaled** qui a toujours été plus qu'un simple professeur ou un encadrant, mais une inspiration constante et un soutien exceptionnel dans mon cas.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Madame Ait Abderrahim Leila** pour sa disponibilité constante et son intérêt et sincérité.*

*Je tiens à remercier mon collègue **Benhoucine Youcef** de m'avoir accompagné pas à pas lors de la réalisation de ce travail ; pour m'avoir motivé et m'empêcher d'abandonner.*

*Je remercie également les membres de jury **MM. ACHIR Mohamed, Louacini Brahim** et **SOUANA Kada** pour leur participation et l'évaluation de ce travail, et toute l'équipe de la spécialité **Biologie moléculaire et cellulaire** pour son honnêteté et ses efforts exceptionnels.*

Je remercie mes parents qui ont toujours été là pour moi, leur soutien inconditionnel et leurs encouragements ont été d'une grande aide.

Enfin, que toutes les personnes qui ont permis que ce travail voie le jour soient assurées de ma profonde reconnaissance.

Liste des figures

Figure 1. La paroi cellulaire mycobactérienne.....	5
Figure 2. Fenêtre de visualisation AutoDock Tools	10
Figure 3. Fenêtre de visualisation Discovery Studio Visualizer	11
Figure 4. Interface graphique de Chimera	12
Figure 5. Interface du site web PDB	13
Figure 6. Interface du site web PubChem	13
Figure 7. Superposition de l'amoxicilline simulée par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (vert). RMSD 1.5 Å. Image générée par Discovery Studio	20
Figure 8. Superposition de l'ampicilline simulée par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (vert). RMSD 1.7 Å. Image générée par Discovery Studio	21
Figure 9. Superposition du mecillinam simulée par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (vert). RMSD 1.7 Å. Image générée par Discovery Studio.....	21
Figure 10. Mode de liaison de BlaC avec la ceftazidime amarrée. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : ceftazidime. Image générée par Discovery Studio Visualizer .	23
Figure 11. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la ceftazidime. Les résidus en vert et en vert clair impliquent les liaisons hydrogènes et de van der Waals respectivement. Le résidu en orange montre la liaison de soufre	23
Figure 12. Emplacement de la ceftazidime dans le site catalytique de la bêta-lactamase. Image générée par Discovery Studio Visualizer	24
Figure 13. Mode de liaison de la BlaC avec la diosgénine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : diosgénine	25
Figure 14. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la diosgénine	25
Figure 15. Emplacement de la diosgénine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.....	26
Figure 16. Mode de liaison de la BlaC avec la carpaine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : carpaine.....	26
Figure 17. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la carpaine	27
Figure 18. Emplacement de la carpaine dans le site catalytique de la bêta-lactamase	27
Figure 19. Mode de liaison de la BlaC avec la catéchine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : catéchine	28

Figure 20. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la catéchine	28
Figure 21. Emplacement de la catéchine dans le site catalytique de la bêta-lactamase	29
Figure 22. Mode de liaison de la BlaC avec la berbérine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : berbérine	29
Figure 23. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la berbérine	30
Figure 24. Emplacement de la berbérine dans le site catalytique de la bêta-lactamase	30
Figure 25. Mode de liaison de la BlaC avec la curcumine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : curcumine	31
Figure 26. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la curcumine	31
Figure 27. Emplacement de la curcumine dans le site catalytique de la bêta-lactamase	32
Figure 28. Mode de liaison de la BlaC avec l'acide rosmarinique. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : l'acide rosmarinique	32
Figure 29. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et l'acide rosmarinique	33
Figure 30. Emplacement de l'acide rosmarinique dans le site catalytique de la bêta-lactamase	33
Figure 31. Mode de liaison de la BlaC avec l'artémisinine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : l'artémisinine	34
Figure 32. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et l'artémisinine	34
Figure 33. Emplacement de l'artémisinine dans le site catalytique de la bêta-lactamase	35
Figure 34. Mode de liaison de la BlaC avec l'harmaline. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : l'harmaline	35
Figure 35. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et l'harmaline	36
Figure 36. Emplacement de l'harmaline dans le site catalytique de la bêta-lactamase	36
Figure 37. Mode de liaison de la BlaC avec l'acide férulique. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : l'acide férulique	37
Figure 38. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et l'acide férulique	37
Figure 39. Emplacement de l'acide férulique dans le site catalytique de la bêta-lactamase	38
Figure 40. Mode de liaison de la BlaC avec le menthol. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : le menthol	38

Figure 41. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et le menthol39

Figure 42. Emplacement du menthol dans le site catalytique de la bêta-lactamase.....39

Liste des Tableaux

Tableau 1. Représentation des structures 2D et les formules des antibiotiques testés	15
Tableau 2. Représentation des structures 2D et les formules des produits naturels testés.....	16
Tableau 3. Représentation des structures 2D et les formules des produits naturels testés.....	20
Tableau 4. Energie moyenne de liaison des antibiotiques et de l'inhibiteur avec la BlaC (3NC8) utilisée dans l'étude de docking	22
Tableau 5. Energie moyenne de liaison des différents produits naturels enregistrée avec la BlaC par AutoDock Vina en opposition à la ceftazidime	24
Tableau 6. Tableau récapitulatif des diverses interactions du BlaC : β -lactamase avec l'antibiotique de référence et les composés naturels choisis.....	39

Table des matières

Résumé	
Abstract	
.....الملخص	
-Liste des figures	
-Liste des tableaux	
-Table des matières	

Etat de l'art

1. Vue d'ensemble	1
2. Objectif	8

Matériel et méthodes

1. Approche <i>in silico</i> pour la recherche des inhibiteurs des enzymes bêta-lactamases	9
2. Matériel	10
2.1.1. Microordinateur	10
2.1.2. Software	10
a. AutoDock Vina	10
b. Discovery Studio Visualizer	10
c. UCSF Chimera	10
2.1.3. Banques de données	12
a. <i>Protein Data Bank</i> (PDB)	12
b. PubChem	13
3. Méthodes	14
3.1. Choix du récepteur	14
3.2. Choix des antibiotiques et des composés naturels inhibiteurs.....	14
3.3. Protocole du docking moléculaire	18
a. Préparation du récepteur et des ligands	18
b. Exécution de AutoDock Vina	19
c. Validation du docking moléculaire	19

Résultats

1. Validation du protocole de docking moléculaire	20
a. Test RMSD	20
b. Analyse visuelle	20
2. Docking des différentes molécules sur le récepteur BlaC (3NC8)	21
2.1. Identification de l'antibiotique qui se lie avec précision avec BlaC.....	21
2.2. Nature de interactions du complexe 'BlaC : ceftazidime'	22
2.3. Amarrage des produits naturels à la BlaC	24
2.4. Nature des interactions du complexe 'BlaC : diosgénine'	25
2.5. Nature des interactions du complexe 'BlaC : carpaine'	26
2.6. Nature de interactions du complexe 'BlaC : catéchine'	27
2.7. Nature des interactions du complexe 'BlaC : berbérine'	29
2.8. Nature des interactions du complexe 'BlaC : curcumine'.....	30
2.9. Nature des interactions du complexe 'BlaC : acide rosmarinique'	32
2.10. Nature des interactions du complexe 'BlaC : artémisinine'	33
2.11. Nature des interactions du complexe 'BlaC : harmaline'	35
2.12. Nature des interactions du complexe 'BlaC : acide férulique'	36
2.13. Nature des interactions du complexe 'BlaC : menthol'	38
Discussion	41
Conclusion et perspectives	44
Références bibliographiques	45

Etat de l'art

Etat de l'art

1. Vue d'ensemble

Le lait est un biofluide constitué de 70 % d'eau et 13 % de solides. Il contient presque tous les composants d'importance nutritionnelle pour l'homme (Pajewska-Szmyt et al., 2019). Le lait a mis des années à obtenir sa formule actuelle et pour cette raison, la très variable composition chimique du lait et des produits laitiers, qui comprennent des centaines à des milliers de substances bioactives, continue d'être un sujet d'étude actif (Miguel et Alonso-Amelot, 2018). Le lait est particulièrement précieux pour ses protéines de haute qualité et son calcium facilement assimilable en plus de son contenu en vitamines (A, D, C, thiamine (B1), riboflavine (B2), vitamine B6 et B12) et en minéraux (calcium, phosphore, fer, magnésium, zinc). Il contient également divers composés bioactifs tels que les anticorps, les oligosaccharides et les nucléotides.

Selon la législation de l'Union européenne (UE), le « lait cru » est identifié comme étant le lait produit par la sécrétion de la glande mammaire d'animaux d'élevage qui n'a pas été chauffé à plus de 40 °C ou soumis à un traitement ayant un effet équivalent. Il peut être transformé en un certain nombre de produits laitiers par exemple ; du yaourt, du fromage, de la crème et du beurre. Il a été établi que la consommation quotidienne de lait et de produits laitiers est associée à une diminution du risque d'ostéoporose, d'hypertension, de cancer du côlon, d'obésité, du syndrome de résistance à l'insuline, du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires (MCV) (de Verse et al., 2010 ; Arturo et al., 2017), y compris l'amélioration de digestion du lactose en même temps que les micro-organismes probiotiques qui peuvent prévenir ou retarder l'apparition de certains cancers en particulier le cancer du côlon (Tavan et al., 2000).

Les effets bénéfiques des composés bioactifs du lait comprennent le développement fonctionnel, physique et intellectuel de tout l'organisme, en considérant aussi que le lait peut agir comme agent de transfection en activant les voies de signalisation vitales basées sur les cytokines pour la fonction et la croissance des cellules du tractus gastro-intestinal des enfants.

La chimie du lait change selon la période de lactation, l'âge et les caractéristiques individuelles de la mère, la saison de traite, la quantité et la qualité de la nourriture, le score de santé, l'altération des motifs microbiologiques du rumen par des antibiotiques et d'autres composants de l'alimentation animale, la race de bétail, le statut génétique individuel et la consommation de l'eau. En outre des centaines de produits non animaux créés par des bactéries, des protozoaires et des champignons interviennent pour enrichir la composition du lait et des produits laitiers et améliorer ou gâcher le produit, et en tant que liquide sécrété, le lait transporte

un nombre important de substances organiques d'origine environnementale ou modifiées par l'homme ou de métabolites absorbés par les animaux en lactation (Miguel et Alonso-Amelot, 2018).

Par ailleurs, l'intégrité génétique de la population humaine est compromise par l'exposition à des agents génotoxiques. Plusieurs facteurs tels que le mode de vie et les traitements médicaux pourraient influencer ou induire des dommages au matériel génétique, de même par le biais de produits chimiques nocifs présents dans l'air, le sol, les aliments et l'eau (Belinda et al., 2016).

Il existe trois sources fondamentales de composés xénobiotiques dans le lait et les produits laitiers ; (1) le métabolisme microbien des bactéries lactiques typiques et des agents pathogènes affectant la glande mammaire et/ou insérée dans la chaîne alimentaire ; (2) chez les ruminants, des composés organiques formés de novo par une croissance altérée du biome ruminal conduisant à des pathologies digestives ; (3) les composés organiques étrangers retrouvés dans l'environnement consommés par la mère allaitante qui sont transférés au lait. À leur tour, ces derniers comprennent les composés anthropiques tels que les antibiotiques et les médicaments, les additifs alimentaires, les compléments alimentaires et les polluants industriels ou les composés organiques étrangers diététiques essentiellement des produits et composés naturels végétaux. En effet, les herbivores sont aussi exposés à un grand nombre de composés organiques étrangers engendrés naturellement dans les plantes fourragères et leurs champignons parasites ou endophytes. Un microcosme d'agents pathogènes se développe dans le lait cru de ces espèces animales bien avant que le lait quitte la mamelle. La sécrétion de protéolytiques, de lipolytiques et des enzymes lécithinases par plusieurs de ces espèces explique leur implication dans les aliments et l'altération des produits laitiers en plus de leur potentiel effet toxicogène.

Le microbiome du lait est la principale cause d'altération et de toxicogénèse des produits laitiers, son succès est facilité par l'adaptation bactérienne à des nutriments dans ce fluide et la capacité de plusieurs bactéries à créer des biofilms dans les tuyaux, les joints, les vannes, les réservoirs en acier inoxydable, les crevasses et autres pièces d'équipement de traitement du lait. Par conséquent, la contamination microbienne du lait et des produits laitiers et leur contribution à la chimie du lait semble presque impossible à contrôler à 100 % (Miguel et Alonso-Amelot, 2018).

Les différents types de contaminants chimiques qui peuvent être trouvés dans le lait sont les résidus de pesticides, les organismes polluants persistants, les métaux lourds, les radionucléides, les médicaments vétérinaires, les antibiotiques, les aflatoxines, les mycotoxines, les nitrites, les nitrates, les détergents et les désinfectants (Nag, 2010). Ceux-ci sont utilisés à grande échelle sur les animaux ou leur environnement et sont évacués via le lait (Green et al., 1980). La

pasteurisation n'affecte pas la présence de la plupart de ces produits chimiques (Hartle et al., 2018).

Diverses activités industrielles entraînent une pollution de l'environnement par les métaux lourds toxiques comme l'arsenic (As), le plomb (Pb), le chrome (Cr), le cadmium (Cd) et le cuivre (Cu) qui sont classés comme cancérigènes pour l'homme et qui entrent dans la chaîne alimentaire des vaches laitières par l'eau et l'alimentation notamment les plantes provenant de terres irriguées avec de l'eau contaminée, elles permettent aux métaux lourds de passer dans l'atmosphère, la terre, l'eau et ensuite dans l'alimentation animale. Ces métaux lourds sont transférés dans le lait puis ils contaminent les produits alimentaires dérivés de ces animaux pour atteindre enfin la chaîne alimentaire et l'accumulation dans le corps humain par la voie plante-animal-humain ou eau-animal-humain.

Un grand nombre de médicaments et certains polluants industriels ont été soumis à un examen systématique du rapport lait/plasma(L/P) depuis les années 1980. Plusieurs d'entre eux apparaissent plus concentrés dans le lait que dans le sang de la mère (L/P >1). Les antibiotiques, en particulier, présentent un intérêt en raison de leur éventuelle disposition dans le lait qui affecte le microbiote intestinal des receveurs et renforce la résistance microbienne (Miguel et Alonso-Amelot, 2018).

La présence de résidus d'antibiotiques dans le lait est un problème de longue date dans l'industrie laitière. Les d'antibiotiques proviennent des bovins en lactation infectés par des mammites bactériennes ou sont ajoutés au lait cru pour empêcher la croissance bactérienne (Wang et al., 2013). Malheureusement, la plupart des traitements thermiques utilisés dans la transformation du lait ne garantissent pas leur inactivation particulièrement les dérivés lactamines (pénicillines et céphalosporines) qui sont fréquemment utilisés en médecine vétérinaire (Zorraquino et al., 2008).

La présence de ces antibiotiques ainsi que leurs métabolites et/ou produits issus de traitements ultérieurs auxquels le lait est soumis peut-être responsable d'une résistance bactérienne (Junaza et al., 2014). Au cours des dernières années, l'incidence de la résistance à plusieurs médicaments chez les bactéries à Gram-positives, Gram-négatives et d'autres bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis*, a été signalée dans le monde entier (Konaté et al., 2012).

Les animaux d'élevage sont désormais considérés comme un réservoir de gènes résistants aux antibiotiques qui pourraient se propager à la flore humaine commensale via les aliments d'origine animale, par exemple la contamination du lait cru par la microflore environnementale peut se produire lors de la collecte du lait et peut être une source d'infection pour les humains qui consomment du lait et des produits laitiers. Le lait pasteurisé conduit par définition à des produits exempts de bactéries végétatives pathogènes, mais certains groupes bactériens

pourraient survivre au processus de pasteurisation et dans ce contexte la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques responsables de maladies infectieuses dans le lait pasteurisé a été détectée (Perrin-Guyomard et al., 2004).

La tuberculose (TB) est une maladie ancienne qui a de graves implications pour la santé publique aujourd'hui (Ferguson et Rhoads, 2009). Elle est causée par *Mycobacterium tuberculosis* et reste un problème de santé majeur dans le monde (Gonzalez et al., 2018). Elle est aéroportée et affecte généralement les poumons entraînant une toux sévère, de la fièvre et des douleurs thoraciques (Fogel, 2019). La tuberculose multirésistante (MDR-TB) est associée à un taux de mortalité élevé (50-80 %) s'étendant sur une période relativement courte (4-16 semaines) entre le diagnostic et le décès (Hemaiswarya et al., 2008), ce qui la rend la maladie infectieuse la plus mortelle (Miotto et al., 2018).

Cette maladie cause plus d'un million de morts humaines et 50 milliards de dollars de dommages économiques chaque année. Elle constitue une menace permanente pour la santé publique en raison de l'émergence de souches extrêmement résistantes aux médicaments, notamment *Mycobacterium tuberculosis*. Cette dernière possède deux mécanismes majeurs de résistance intrinsèque : une bêta-lactamase hautement active et une membrane externe peu perméable (Wivagg et al., 2014). La paroi cellulaire mycobactérienne est beaucoup plus complexe que celle des autres bactéries et se compose de plusieurs couches (Figure 1). La capacité de traverser les couches complexes de la paroi cellulaire de *M. tuberculosis* est l'une des principales conditions préalables pour que les agents soient efficaces contre ce pathogène (Kurz et Bonomo, 2012). Il a été démontré expérimentalement que, bien que la pénétration des antibiotiques bêta-lactamines dans une cellule de *Mycobacterium* soit lente (Sagar et al., 2017), le mécanisme important de la résistance aux bêta-lactamines est la production de bêta-lactamase (Yang et al., 2009).

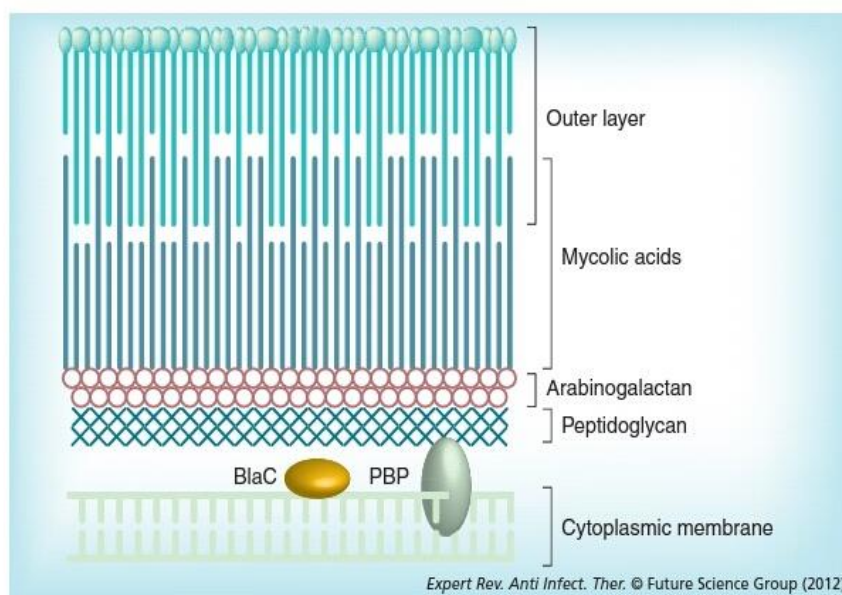


Figure 1. La paroi cellulaire mycobactérienne.

La résistance aux antimicrobiens est définie comme la résistance des micro-organismes à un agent antimicrobien auquel ils étaient initialement sensibles. Il existe de nombreux mécanismes de résistance chez les bactéries. Parmi ceux-ci, cinq sont les plus fréquemment observés, il s'agit de l'inhibition enzymatique, des modifications de la protéine de liaison à la pénicilline, des mutations de la porine, des pompes d'efflux et des changements de cible et le mécanisme de résistance le plus courant est l'inhibition enzymatique (de Sousa et al., 2016). La résistance de *M. tuberculosis* aux médicaments est médiée par des mutations et des réarrangements dans son unique chromosome circulaire (Koch et Mizrahi, 2018) et une observation intéressante qui se dégage d'une étude a montré qu'il existe plus de 100 locus génétiques qui semblent être associés à la résistance aux médicaments, cela a conduit à suggérer que la résistance aux médicaments pourrait être plus complexe qu'on ne le pensait auparavant (Zhang et Yew, 2018).

Les antibiotiques sont des composés qui ciblent les bactéries et sont donc destinés à traiter et à prévenir les infections bactériennes. Ils sont classiquement regroupés en 2 grandes catégories en fonction de leur effet *in vitro* sur les bactéries ; bactéricides et bactériostatiques. Les bactéricides à leur tour comprennent plusieurs classes : les aminoglycosides, les bêta-lactamines, les fluoroquinolones, les glycopeptides, les lipopeptides cycliques et les nitroimidazoles (Calhoun et al., 2020). Chaque nouvelle classe de bêta-lactamine a été développée soit pour augmenter le spectre d'activité afin d'inclure des espèces bactériennes supplémentaires, soit pour s'attaquer aux mécanismes de résistance spécifiques qui sont apparus dans la population bactérienne ciblée (Silver et Bush, 2016).

Les bêta-lactamines constituent le groupe d'antibiotiques le plus important et toujours le plus efficace (Tehrani et Martin, 2018). Cette classe d'antibiotiques a montré une bonne activité

bactériostatique contre les infections bactériennes à Gram négatif et à Gram positif, tandis que *M. tuberculosis* est naturellement résistante à la plupart de ces antibiotiques *in vitro*. Il a été alors démontré que l'association de β -lactamines et d'inhibiteurs de β -lactamase a une puissante activité contre les isolats de tuberculose multirésistante (MDRTB) *in vitro* et *in vivo*. Les inhibiteurs de la β -lactamase actuellement approuvés pour un usage clinique sont: l'acide clavulanique, le sulbactam, le tazobactam et l'avibactam (Zhang et al., 2015).

Les bêta-lactamases constituent un groupe d'enzymes de plus en plus diversifié avec près de 2800 variantes uniques caractérisées à ce jour. La classification moléculaire d'Ambler utilise l'homologie des séquences d'acides aminés pour classer les bêta-lactamases (Crass et Pai, 2019). Quatre classes (A, B, C et D) peuvent être classées en deux groupes principaux, Les β -lactamases de classe B sont des métalloenzymes de zinc, tandis que les β -lactamases de classe A, C et D sont des sérine β -lactamases. BlaC est une β -lactamase de classe A (Moural et al., 2019) à large spectre, capable de convertir une large gamme d'antibiotiques bêta-lactamines (Elings et al., 2019). Cette enzyme est la cause de la résistance intrinsèque aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* (Tremblay et al., 2019).

Les antibactériens d'origine végétale sont toujours une source de nouvelles thérapies. Un rapide coup d'œil sur la façon dont la nature en particulier les plantes s'attaque au problème de l'infection permettra de mieux comprendre la méthodologie qui doit être adoptée pour la conception et le développement de nouveaux agents anti-infectieux hautement efficaces en général et d'antimycobactériens en particulier. La rareté des maladies infectieuses chez les plantes sauvages est en soi une indication du succès des mécanismes de défense qu'elles ont développés. Les plantes sont connues pour produire une énorme variété de petites molécules antibiotiques généralement classées comme « phytoalexines ». Leur espace structurel est diversifié et comporte des terpénoïdes, des glycostéroïdes, des flavonoïdes et des polyphénols. Tandis que le mode d'action de la combinaison des antibiotiques et des extraits de plantes diffère sensiblement de celui des mêmes médicaments agissant individuellement ; plusieurs extraits de plantes ont présenté une activité synergique contre les micro-organismes standard (Hemaiswarya et al., 2008) ainsi que contre les bactéries résistantes aux médicaments (Yang et al., 2009).

Les produits naturels et leurs dérivés ont toujours été inestimables en tant que sources d'agents thérapeutiques. En outre, les structures de produits naturels ont une diversité chimique élevée, une spécificité biochimique et d'autres propriétés moléculaires qui les rendent plus favorables en tant que composés principaux pour la découverte de médicaments (Kwofie et al., 2020).

La mise en place de nouvelles drogues pour contrecarrer l'émergence des diverses maladies nécessite une étape d'essais cliniques *in vivo* et *in vitro*, généralement appliquée sur des modèles

animaux. Il a été admis que l'expérimentation animale devait être réduite, affinée ou remplacée, ce qui a conduit à un recours accru à des approches alternatives. On met en évidence notamment les méthodes *in silico* de la biologie computationnelle qui peuvent être en mesure d'offrir des résultats prédictifs pour aider à combler les lacunes de données dans les évaluations de la sécurité des substances chimiques. Les résultats de la modélisation prédictive *in silico* sont produits à partir d'une série de logiciels de toxicologie computationnelle (Arturo et al., 2017).

Actuellement, plusieurs techniques de modélisation sont disponibles pour faciliter les tâches de découverte de médicaments, la plupart d'entre elles étant classées en approches basées sur la structure et sur les ligands. Les méthodes basées sur la structure s'appuient sur les informations tirées de la connaissance de la structure 3D d'une cible d'intérêt et ils permettent de classer les bases de données de molécules en fonction de la complémentarité structurelle et électronique des ligands par rapport à une cible donnée. Dans ce contexte, le docking moléculaire est l'une des méthodes *in silico* basées sur les structures les plus populaires et les plus réussies qui aident à prédire les interactions entre les molécules et les cibles biologiques ; ce processus est généralement accompli en prédisant d'abord l'orientation moléculaire d'un ligand dans un récepteur, puis en estimant leur complémentarité par l'utilisation d'une fonction de notation (Pinzi et Rastelli, 2019).

C'est une méthode *in silico* rapide et efficace pour l'analyse de la liaison entre un modèle de récepteur de protéine et un ligand et qui permet d'améliorer considérablement l'expérimentation complémentaire en fournissant un aperçu des interactions moléculaires importantes au sein du système d'intérêt pour ainsi guider la conception de nouveaux ligands candidats basés sur les motifs de liaison et l'énergie observés (King et al., 2015).

Le docking moléculaire explore le comportement des petites molécules dans le site de liaison d'une protéine cible, lorsque les structures protéiques sont déterminées expérimentalement par cristallographie aux rayons X ou spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), les programmes de docking effectuent un algorithme de recherche dans lequel la conformation du ligand est évaluée de manière récursive jusqu'à ce que la convergence vers l'énergie minimale soit atteinte (Pagadala et al., 2017). L'objectif du docking protéine-ligand est de prédire le(s) mode(s) de liaison prédominant(s) d'un ligand avec une protéine de structure tridimensionnelle connue (Morris et Lim-Wilby, 2008).

Divers programmes de simulation de docking moléculaire sont disponibles tels que GRAMM, Hex, ZDOCK, HADDOCK, PatchDock, NPDock, AutoDockTools, AutoDock et en particulier AutoDock Vina qui est un outil d'arrimage moléculaire open-source, qui se compose de potentiels basés sur la connaissance et de fonctions de pointage empirique ; il a été établi comme une meilleure version d'AutoDock, avec une vitesse d'amarrage, une précision et des

performances améliorées en 2010. Ce programme calcule les cartes quadrillées et les clusters pour produire des résultats rapidement et automatiquement. En termes de puissance, AutoDock Vina est parmi les meilleures de toutes les méthodes de docking (Navien et al., 2020).

2. Objectif

Le présent travail a pour objectif de tester le potentiel inhibiteur des substances bioactives dérivées de produits naturels contre l'enzyme BlaC (bêta-lactamase) qui est à l'origine de l'antibiorésistance chez *Mycobacterium tuberculosis*, agent responsable de la tuberculose, à travers une approche de modélisation biologique via l'étude *in silico*.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Les antibiotiques sont largement présents dans l'environnement ce qui peut mener malheureusement au développement des gènes de résistance aux antibiotiques parmi les microorganismes. Ils présentent des risques sanitaires graves, d'autant plus qu'ils peuvent se concentrer dans les chaînes alimentaires, et le lait n'est pas une exception.

Ce travail vise à résoudre l'un des problèmes liés aux pathologies associées à la consommation du lait telle que la tuberculose via une approche d'amarrage moléculaire. Le but est de chercher des biomolécules issues de produits naturels capables d'inhiber l'enzyme β -lactamase (BlaC), l'agent responsable de l'antibiorésistance chez les *Mycobacterium tuberculosis*, afin de permettre l'action des antibiotiques contre la tuberculose ou bien développer de nouveaux médicaments à base de métabolites secondaires.

1. Approche *in silico* pour la recherche des inhibiteurs des enzymes β -lactamases (BlaC)

Les médicaments vétérinaires (antibiotiques et anti-inflammatoires) sont largement utilisés dans la prévention des maladies et pour assurer le bien-être des troupeaux. Particulièrement, les β -lactames sont parmi les antibiotiques les plus couramment utilisés chez les bovins laitiers. L'ingestion de quantités excessives de ces substances est préoccupante, car elles peuvent avoir des conséquences graves, telles que des réactions allergiques et toxiques, ainsi qu'une augmentation de la résistance bactérienne. En outre, ces résidus peuvent être détectés dans le lait de ces bovins, et lorsqu'ils sont au-dessus des limites maximales établies, c'est inquiétant car ils peuvent avoir des conséquences sur la santé humaine (Teixeira et al., 2020).

Cette partie du travail comprend l'incorporation de la biologie computationnelle à notre étude tout en proposant une approche de modélisation, qui peut ménager avec une certaine précision les travaux *in vitro* et *in vivo*, pour la recherche des inhibiteurs des enzymes responsables à l'antibiorésistance notamment les β -lactamases chez les *Mycobacterium tuberculosis* agent responsable de la tuberculose.

L'amarrage ou le docking moléculaire est une procédure de calcul qui tente de prédire efficacement la liaison non covalente de macromolécules ou, plus fréquemment, d'une macromolécule (récepteur ou enzyme) et d'une petite molécule (ligand).

L'objectif est de prédire les conformations liées et l'affinité de liaison (Trott et Olson, 2009). Ce processus comporte deux grandes étapes, la première est un algorithme de recherche et la

seconde est une fonction de scoring (classement). L'algorithme de recherche peut différencier les changements de conformation du ligand. Les fonctions de scoring classifient généralement les différentes formes extraites par l'algorithme de recherche. Une fonction de score efficace peut facilement mettre en évidence la structure obtenue expérimentalement à partir d'autres structures prédites récupérées par l'algorithme de recherche (Banaganapalli et al., 2019).

2. Matériel

2.1. Microordinateur

Un ordinateur portable doté d'un processeur Intel® Core™ i5-2430M CPU @ 2.40 GHz 2.40 GHz avec une mémoire installée (RAM) de 6.00 Go et une carte graphique Intel® HD Graphics 3000 sous Windows 10, système d'exploitation 64 bits a été utilisé pour l'exécution du programme.

2.2. Software

a. AutoDock Vina

AutoDock Vina est un nouveau programme pour l'arrimage moléculaire et le criblage virtuel qui succède à AutoDock. Le programme utilise une méthode d'optimisation de gradient sophistiquée dans sa procédure d'optimisation locale (Trott et Olson, 2009). AutoDockTools (ADT) est un programme d'ancrage ligand-récepteur basé sur une grille pour comprendre le mécanisme de liaison du ligand-récepteur. ADT joue un rôle préliminaire en tant que frontal graphique pour la configuration et l'exécution d'AutoDock Vina (Navien et al., 2020)

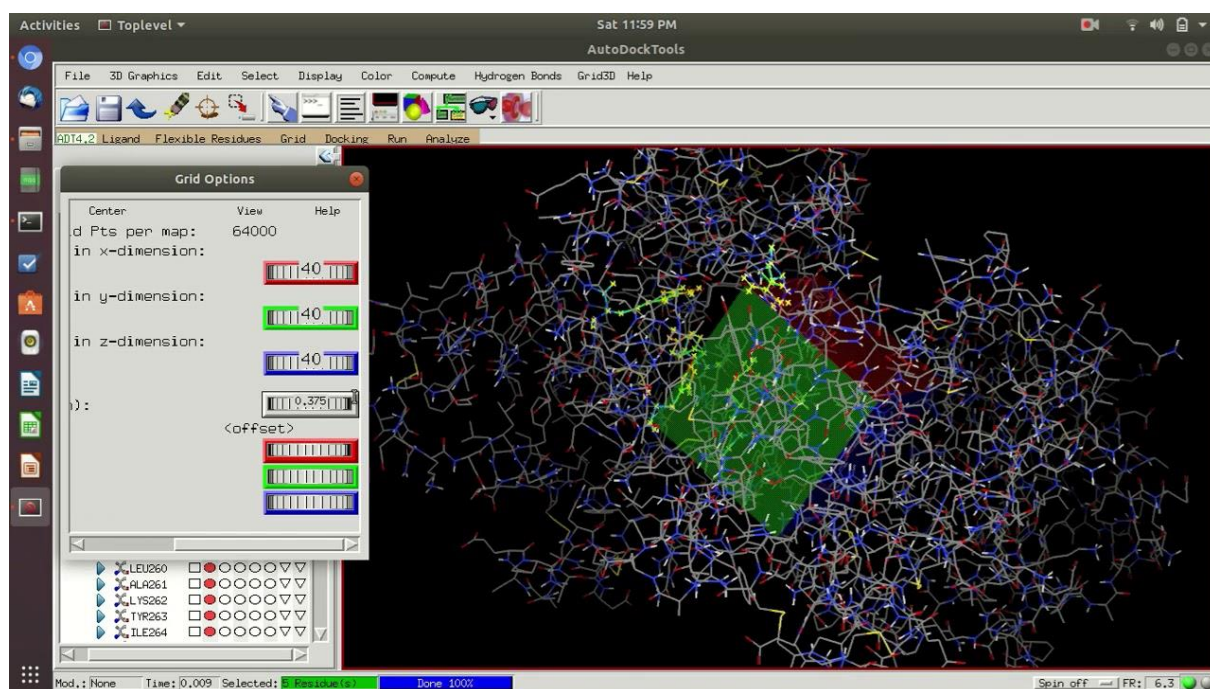


Figure 2. Fenêtre de visualisation AutoDock Tools.

b. *Discovery Studio Visualizer*

Discovery Studio Visualizer (v20. 1.0. 19295) est une suite logicielle complète pour l'analyse et la modélisation des structures moléculaires, des séquences et d'autres données pertinentes. Ce produit peut être utilisé pour ouvrir les données générées par d'autres logiciels et il comprend des fonctionnalités de visualisation et d'édition des données ainsi que des outils permettant d'effectuer des analyses de données de base, une gamme d'options de visualisation 3D (afficher/cacher les atomes, les résidus, les molécules d'eau, les ligands etc.), une capacité de mesurer et afficher les distances et les angles de torsion et de montrer les liaisons hydrogène. L'application fonctionne sous Windows et Linux et constitue un environnement de bureau entièrement intégré qui donne accès aux fonctions standard du système d'exploitation (BIOVIA, 2020).

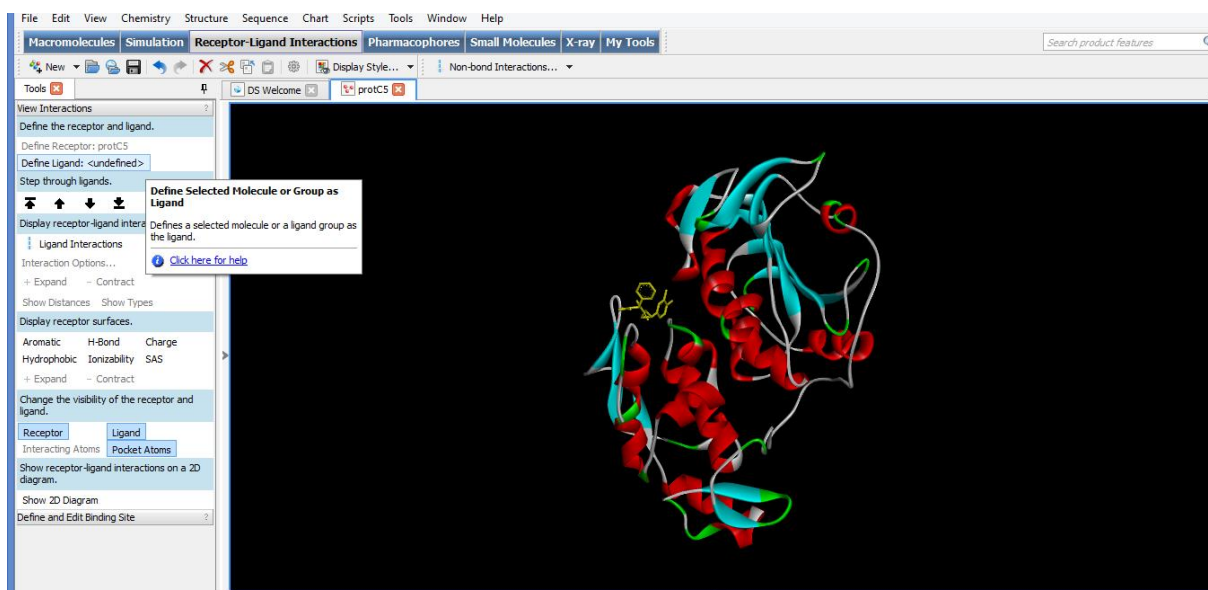


Figure 3. Fenêtre de visualisation *Discovery Studio Visualizer*.

c. UCSF Chimera

UCSF Chimera est un programme de visualisation et d'analyse interactive des structures moléculaires et des données associées, y compris les plans de densité, les trajectoires et les alignements de séquences. Des images et des animations de haute qualité peuvent être générées. Le développement de Chimera a été soutenu par les *National Institutes of Health* (Pettersen et al., 2004).

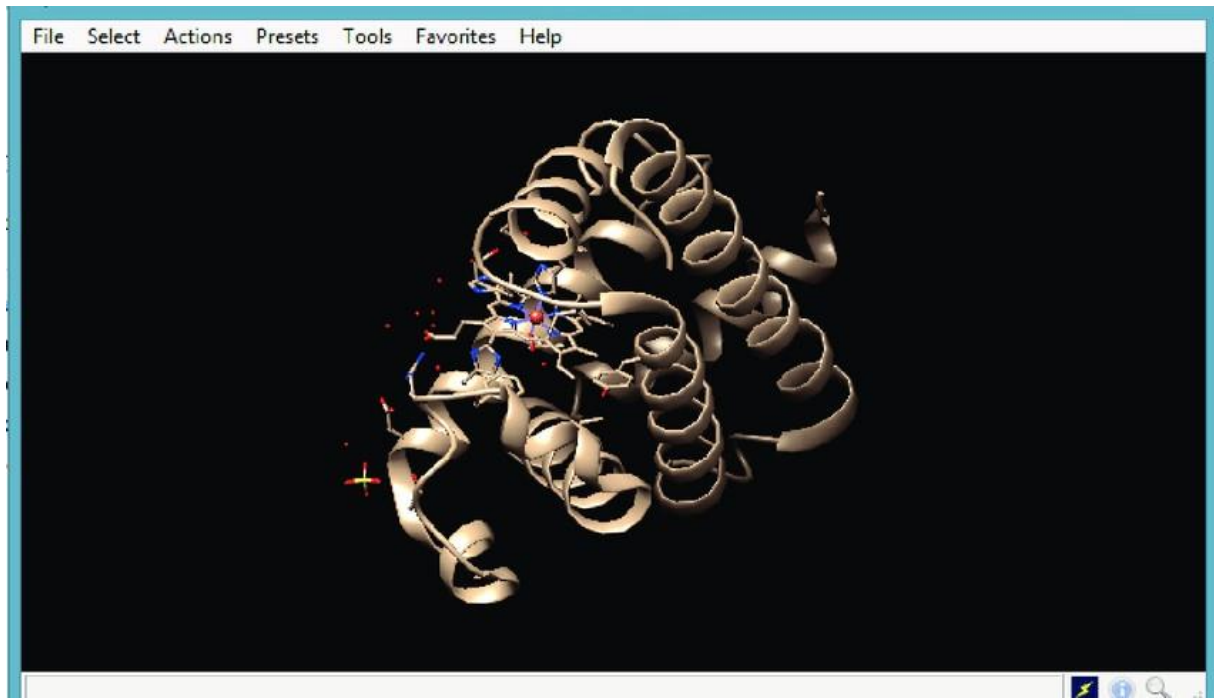


Figure 3. Interface graphique de Chimera.

2.3. Banques de données

a. Banque de données protéiques (PDB)

La Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) est le référentiel mondial unique de structures 3D déterminées expérimentalement de macromolécules biologiques et de leurs complexes (Burley et al., 2017). La fonction principale de cette base de données est d'organiser les données structurelles 3-D de grandes molécules biologiques, y compris les protéines et les acides nucléiques de tous les organismes, y compris les bactéries, les levures, les plantes, les mouches, les autres animaux et les humains. Les structures tridimensionnelles des données de macromolécules biologiques disponibles avec PDB sont déterminées par des méthodes expérimentales telles que la cristallographie aux rayons X, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire et la microscopie électronique (Parasuraman, 2012).

RCSB PDB 170968 Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education

Enter search term(s)

Advanced Search | Browse Annotations

Welcome

Deposit

Search

Visualize

Analyze

Download

Learn

A Structural View of Biology

This resource is powered by the Protein Data Bank archive—information about the 3D shapes of proteins, nucleic acids, and complex assemblies that helps students and researchers understand all aspects of biomedicine and agriculture, from protein synthesis to health and disease.

As a member of the wwPDB, the RCSB PDB curates and annotates PDB data.

The RCSB PDB builds upon the data by creating tools and resources for research and education in molecular biology, structural biology, computational biology, and beyond.

COVID-19 CORONAVIRUS Resources

November Molecule of the Month

Figure 5. Interface du site web PDB.

b. PubChem

Pubchem est une ressource publique d'information sur les produits chimiques, développée et maintenue par le National Center for Biotechnology Information (NCBI). Il recueille les descriptions des substances chimiques et leurs activités biologiques à partir de plus de 500 sources de données et les diffuse gratuitement au public. Elle est disponible sur l'url <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Kim et al., 2018).

NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information

PubChem About Blog Submit Contact

PubChemRDF 1.7β has been released >

Explore Chemistry

Quickly find chemical information from authoritative sources

Browse COVID-19 data available in PubChem X

Try aspirin EGFR C9H8O4 57-27-2 C1=CC=C(C=C1)C=O InChI=1S/C3H6O/c1-3(2)4/h1-2H3

Use Entrez Compounds Substances BioAssays

Figure 6. Interface du site web PubChem.

3. Méthodes

3.1. Choix du récepteur

L'émergence rapide de bactéries résistantes se produit dans le monde entier, mettant en danger l'efficacité des antibiotiques, qui ont transformé la médecine et sauvé des millions de vies. La crise de résistance aux antibiotiques a été attribuée à la surutilisation et à la mauvaise utilisation de ces médicaments (Ventola, 2015).

À l'heure actuelle, l'émergence de la tuberculose multirésistante (MDR-TB) et de la tuberculose ultrarésistante (XDR-TB) a attiré l'attention pour parvenir à une prévention efficace, une guérison durable et un traitement des problèmes distendus de la tuberculose (Khusro et al., 2017).

Les antibiotiques β -lactames sont extrêmement efficaces pour perturber la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cependant, ils sont inefficaces contre *Mycobacterium tuberculosis*, en raison de la production d'une enzyme β -lactamase codée sur le chromosome de *M. tuberculosis* qui dégrade ces antibiotiques. En effet, des études récentes ont démontré que la suppression du gène blaC, le seul gène codant pour une β -lactamase chez *M. tuberculosis*, ou l'inhibition de l'enzyme codée entraînait une sensibilité significativement accrue aux antibiotiques β -lactames (Wang et al., 2006).

La structure de l'enzyme BlaC beta lactamase dans cette étude est téléchargée de la base de données PDB.

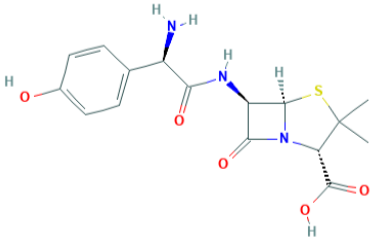
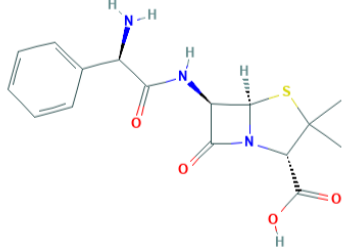
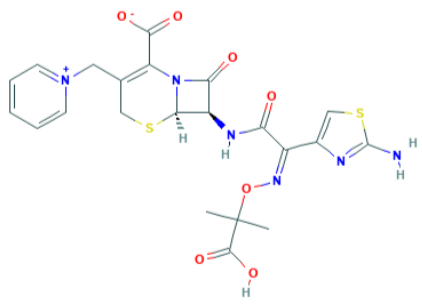
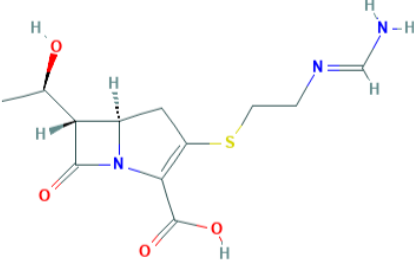
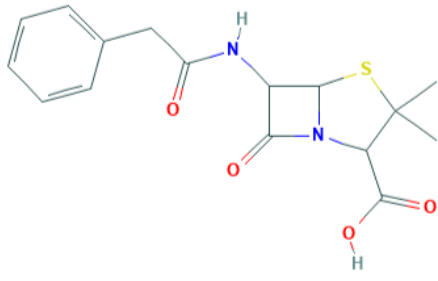
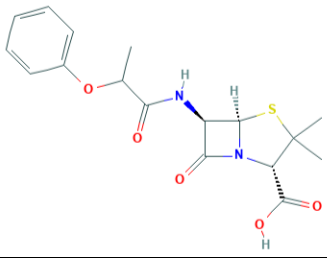
3.2. Choix des antibiotiques et des composés naturels inhibiteurs

Ces dernières années, l'attention s'est portée de plus en plus sur les antimicrobiens d'origine végétale comme alternative aux antibiotiques, pour leur efficacité. En outre, il a été constaté que certains produits naturels pouvaient renforcer l'activité d'antibiotiques courants présentant un effet synergique. Outre leur efficacité, un avantage important serait que les bactéries seraient moins prédisposées à développer une résistance, car les composés naturels pourraient s'attaquer simultanément à plusieurs cibles bactériennes (Martelli et Giacomini, 2018).

Dans le sillage de ce grave problème de résistance aux antibiotiques, il devient impératif de trouver des inhibiteurs qui peuvent rendre les antibiotiques actuels fonctionnels et utiles. Dans la présente étude, nous avons sélectionné une série de différents composés naturels pour trouver des inhibiteurs potentiels appropriés de la NDM-1.

Un ensemble de 10 antibiotiques bêta-lactamines comprenant différentes sous-familles comme l'amoxicilline, les pénicillines, les céftazidimes, les impénemes.

Tableau 2. Représentation des structures 2D et les formules des antibiotiques testés.

Antibiotique	Structure deux dimensionnelle	Formule moléculaire
Amoxicilline		C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S
Ampicilline		C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S
Ceftazidime		C ₂₂ H ₂₂ N ₆ O ₇ S ₂
Imipénem		C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₄ S
Pénicilline		C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S
Phénéticilline		C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S

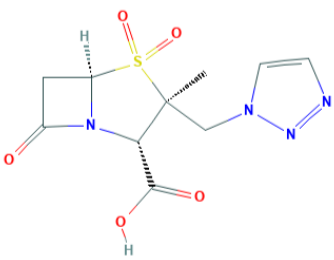
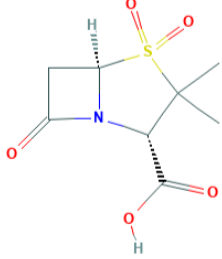
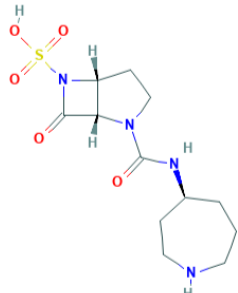
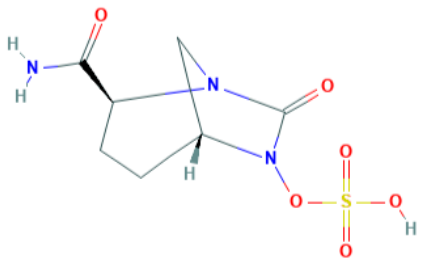
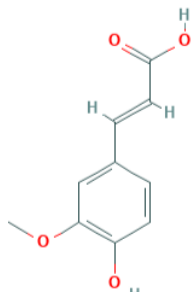
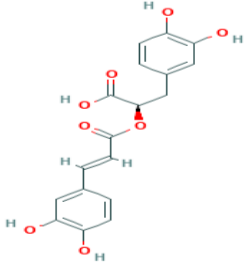
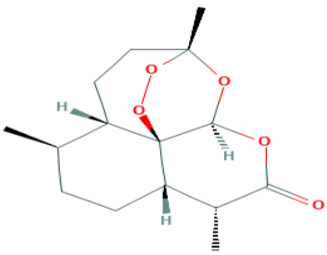
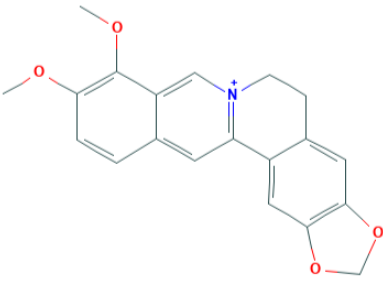
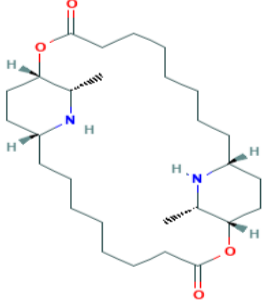
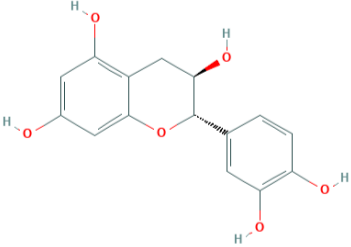
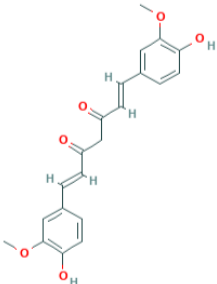
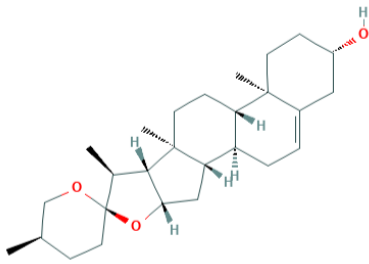
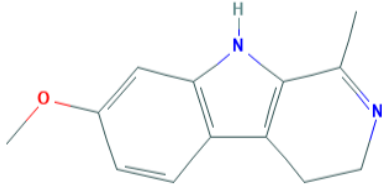
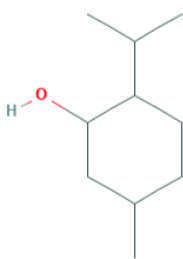
Tazobactam (inhibiteur)		C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅ S
Sulbactam (inhibiteur)		C ₈ H ₁₁ NO ₅ S
mk-8712 (inhibiteur)		C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₅ S
Avibactam (inhibiteur)		C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₆ S

Tableau 3. Représentation des structures 2D et les formules des produits naturels testés.

Produit naturel	Structure deux dimensionnelle	Formule moléculaire
Acide férulique		C ₁₀ H ₁₀ O ₄

Acide rosmarinique	 <p>The structure shows a central 1,3-butadiene core. The first carbon is substituted with a 3,4-dihydroxyphenyl group. The second carbon is substituted with a propenoic acid chain. The third carbon is substituted with a 3,4-dihydroxyphenyl group. The fourth carbon is substituted with a propenoic acid chain.</p>	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
Artémisinine	 <p>The structure is a complex polycyclic peroxide. It features a bicyclic core with a peroxide bridge, a lactone ring, and several methyl groups. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	C ₁₅ H ₂₂ O ₅
Berbérine	 <p>The structure is a complex polycyclic alkaloid. It consists of a quinoline ring system fused to a piperidine ring, which is further fused to a benzene ring. There are two methoxy groups on the quinoline ring and a piperidine ring fused to a benzene ring.</p>	C ₂₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ +
Carpaine	 <p>The structure is a complex polycyclic alkaloid. It features a long chain with two piperidine rings and two amide groups. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	C ₂₈ H ₅₀ N ₂ O ₄
Catéchine	 <p>The structure is a flavan-3-ol. It consists of a chromane ring system with two hydroxyl groups on the A ring and a catechol group on the C ring.</p>	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Curcumine	 <p>The structure is a polyphenolic compound. It consists of a central 1,5-diketone chain with two 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups attached to the carbonyl carbons.</p>	C ₂₁ H ₂₀ O ₆

Diosgénine		C ₂₇ H ₄₂ O ₃
Harmaline		C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O
Menthol		C ₁₀ H ₂₀ O

3.3. Protocole du docking moléculaire

a. Préparation du récepteur et des ligands

Le monomère de la protéine a été préparé pour l'amarrage moléculaire en dissociant les deux structures de l'enzyme (chaîne A et B) et les molécules d'eau (les molécules H₂O peuvent assurer une liaison avec le ligand et ainsi créer des liaisons hydrogènes). Les différentes coordonnées du site de fixation du ligand (antibiotique) avec le récepteur (enzyme) à savoir les valeurs x, y et z en 3D (*grid box*) sont d'abord déterminées pour procéder à la libération du site de fixation et la réalisation du docking (les ligands qui occupent le site de fixation doivent être éliminés pour effectuer le docking). Ensuite, la charge totale du monomère protéique est calculée après l'addition des molécules hydrogènes à ce monomère via le logiciel Chimera.

Le docking est effectué par la suite avec le programme AutoDock Tools. Les coordonnées du centre de la *Grid Box* ont été fixées à 2.55 Å, 48.67 Å, 107.03 Å pour les axes x, y et z respectivement avec un espacement de 0.375 Å. Une fois le monomère est préparé, les ligands sélectionnés sont testés pour leur compatibilité successivement.

b. Exécution de AutoDock Vina

Afin de permettre à AutoDock Vina de fonctionner et exécuter ses fonctions de score, un document texte de configuration comportant les entrées est préparé avant l'exécution en mode invite de commande.

La procédure du docking par AutoDock Vina s'exécute généralement entre 2 à 10 minutes. Les résultats du docking sont présentés sous formes de plusieurs fichiers pouvant être visualisés sur AutoDock Tools ou Discovery Studio Visualiser.

- Les fichiers contenant les informations sur l'enzyme et le ligand initialisés (protéine.pdbqt et ligand.pdbqt).
- Le fichier contenant des informations sur les scores des différentes poses ou tentatives d'arrimage réalisées entre le récepteur et le ligand (log.txt). Les poses sont classées par ordre énergétique de liaison. La conformation ayant l'énergie la plus réduite est placée en premier.
- Le fichier contenant le ligand docké à la protéine avec toutes les conformations réalisées (complexe.pdbqt).
- Les fichiers contenant le ligand docké à la protéine qui sont affichés séparément (complexe1_ligand1.pdbqt, complexe1_ligand2.pdbqt etc.).

c. Validation du docking moléculaire

Afin de proposer de nouveaux inhibiteurs de la cible enzymatique étudiée, il est indispensable, dans un premier temps, de tester la fiabilité du programme de docking utilisé dans cette étude via deux tests.

Le premier consiste à calculer les écarts quadratiques moyens ou RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre la position du ligand simulée par le logiciel et celle déterminée expérimentalement. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugée au moyen de la déviation quadratique moyenne (RMSD) entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par le programme de docking. Un seuil maximal de 2 Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne d'une mauvaise position.

Quant au deuxième test, il consiste en l'analyse visuelle pour confirmer les résultats du test RMSD. Elle permet de montrer si la pose simulée d'un ligand se superpose avec celle de référence. Ce test conforte davantage la conclusion tirée suite au test de fiabilité par RMSD et confirme la performance du modèle.

Résultats

Résultats

1. Validation du protocole de docking moléculaire

a. Test RMSD

Avant d'entamer l'étude de la potentielle inhibition des β -lactamases par les molécules bioactives, le protocole d'arrimage a été validé en conduisant un redocking des ligands cocrystallisés avec la protéine BlaC et en comparant la valeur RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) entre les ligands du complexe cristallographique avec ceux qui sont amarrés par le programme du docking et le modèle a pu simuler avec précision les interactions, avec des valeurs de RMSD inférieures à 2 Å (Tableau 4).

Tableau 4. Valeurs de RMSD des trois complexes NDM-1 étudiés.

Ligand cocrystallisé	RMSD (Å)
Amoxicilline	1.5
Ampicilline	1.7
Mecillinam	1.7

Cette constatation valide donc le programme de docking moléculaire en reproduisant pratiquement la même orientation du ligand et la même forme de liaison que celle trouvée dans la structure déterminée expérimentalement.

b. Analyse visuelle

Une autre étape indispensable pour confirmer les résultats du RMSD est celle de l'analyse visuelle. Elle permet de déterminer la superposition du ligand simulé par le logiciel avec celui qui est cocrystallisé.

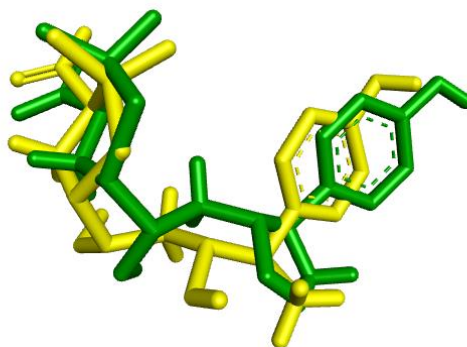


Figure 7. Superposition de l'amoxicilline simulée par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (vert). RMSD 1.5 Å. Image générée par *Discovery Studio*.

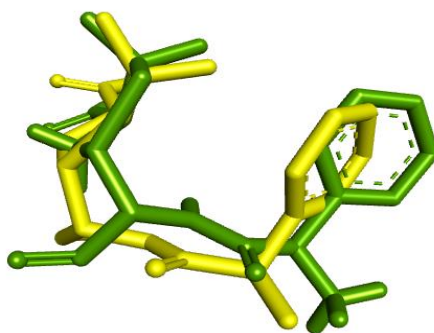


Figure 8. Superposition de l'ampicilline simulée par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (vert). RMSD 1.7 Å. Image générée par *Discovery Studio*.

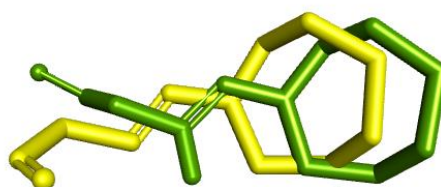


Figure 9. Superposition du mecillinam simulée par cristallographie aux rayons X (jaune) et par docking avec AutoDock Vina (vert). RMSD 1.7 Å. Image générée par *Discovery Studio*.

Le test RMSD et l'analyse visuelle ont démontré que le programme du docking a correctement simulé les structures des ligands placées dans le site actif de la BlaC et des conformations pratiquement superposables à celles résolues par cristallographie aux rayons X.

2. Docking des différentes molécules sur le récepteur BlaC

2.1. Identification de l'antibiotique qui se lie avec précision avec BlaC (3NC8)

Une série de 10 antibiotiques β -lactames comprenant différentes sous-familles comme les pénicillines, les ceftazidimes, les amoxicillines et des inhibiteurs cliniques standard ont été amarrés au récepteur pour trouver le composant présentant l'énergie de liaison moyenne la plus faible.

La Ceftazidimes s'est mieux comporté que les divers antibiotiques et inhibiteur, puisque l'énergie de liaison observée a été de -7.1 kcal/mol après l'amarrage (Tableau 5). C'est pourquoi elle a été choisie comme principal filtre en termes d'énergie de liaison pour cribler tous les composés naturels en vue de la sélection finale des ligands.

Tableau 5. Energie moyenne de liaison des antibiotiques et de l'inhibiteur avec la BlaC (3NC8) utilisée dans l'étude de docking.

Antibiotique/inhibiteur	ID PubChem	Energie de liaison (kcal/mol)
Ceftazidime (antibiotique)	5481173	-7.1
Phénéticilline (antibiotique)	272833	-6.4
Amoxicilline (antibiotique)	33613	-6.0
MK-8712 (inhibiteur)	24763066	-6.0
Pénicilline g (antibiotique)	5904	-6.0
Ampicilline (antibiotique)	6249	-5.8
Imipénem (antibiotique)	104838	-5.6
Avibactam (inhibiteur)	9835049	-5.2
Tazobactam (inhibiteur)	123630	-5.1
Sulbactam (inhibiteur)	130313	-4.8

2.2. Nature des interactions du complexe 'BlaC : ceftazidime'

Le programme *Discovery Studio Visualiser* a permis de définir les interactions qui ont eu lieu entre le site catalytique de la β -lactamase et la ceftazidime.

Les figures 10, 11 et 12 montrent le mode de liaison et les interactions des résidus de la protéine dans son site actif avec la ceftazidime.

Les résidus acide glutamique (GLU 289) et (GLU 292) ont été impliqués dans la formation de liaisons hydrogène alors que Leucine (LEU 294), arginine (ARG 291) et (ARG 236), lysine (LYS 235), proline (PRO 290), glycine (GLY 254), isoleucine (ILE 117), phosphate (PO 43) et thréonine (THR 253) ont été responsables des forces de van Der Waals. Les liaisons formées étaient comprises entre 1.33 et 3.39 Å.

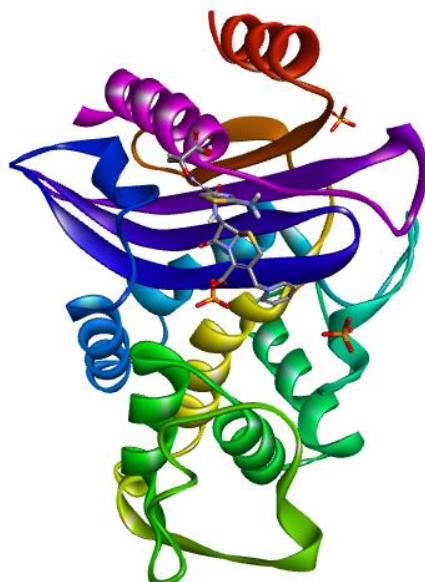


Figure 10. Mode de liaison de BlaC avec la ceftazidime amarrée. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : ceftazidime. Image générée par *Discovery Studio Visualizer*.

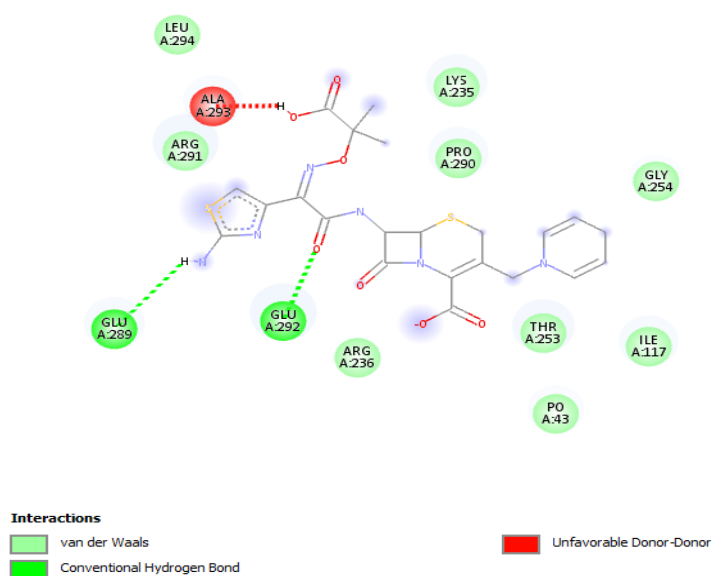


Figure 11. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la ceftazidime. Les résidus en vert et en vert clair impliquent les liaisons hydrogènes et de van der Waals respectivement. Le résidu en orange montre la liaison de soufre.

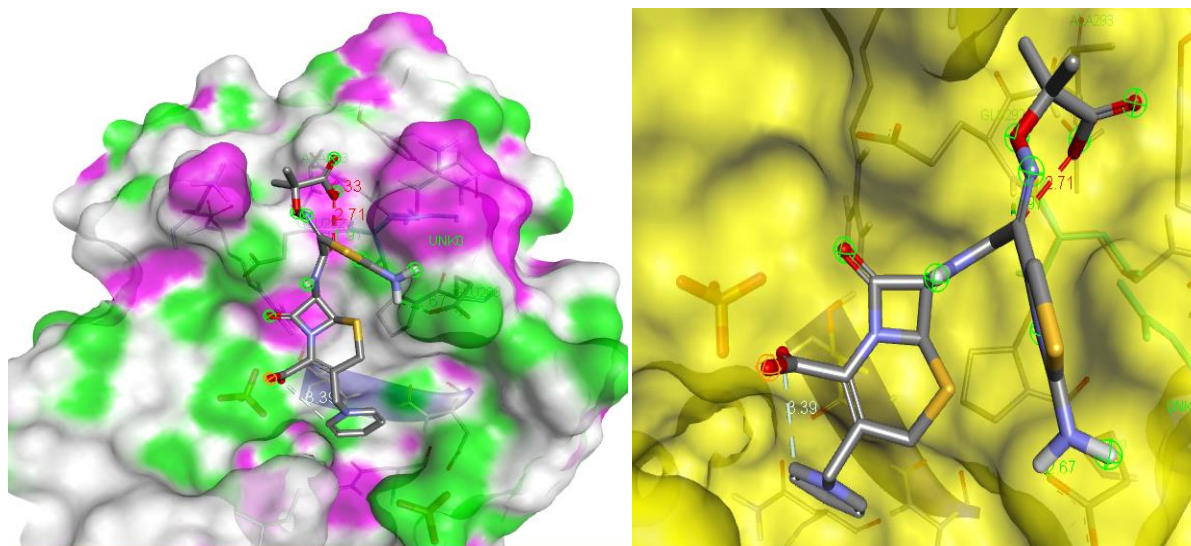


Figure 12. Emplacement de la ceftazidime dans le site catalytique de la bêta-lactamase. Image générée par *Discovery Studio Visualizer*.

2.3. Amarrage des biomolécules actives à la BlaC

Un échantillon de 10 composés naturels a été soumis au docking moléculaire avec la BlaC (3NC8). Les résultats obtenus ont montré que la majorité des éléments testés ont manifestés une énergie d'interaction proche ou supérieure à celle du ligand de référence (ceftazidime) (Tableau 6). Notamment, la Diosgénine a montré un score excellent (énergie de liaison) de -7.5 kcal/mol.

La fixation de ces biomolécules dans le site catalytique de la bêta-lactamase n'a fait que renforcer les hypothèses formulées dans le cadre de l'activité inhibitrice potentielle de ces derniers.

Tableau 6. Energie moyenne de liaison des différents produits naturels enregistrée avec la BlaC par AutoDock Vina en opposition à la ceftazidime.

Molécule	Affinité (kcal/mol)
Ceftazidime (antibiotique de référence)	-7.1
Diosgénine	-7.5
Carpaine	-6.7
Catéchine	-6.7
Berbérine	-6.6
Curcumine	-6.4
Acide rosmarinique	-6.1
Artémisinine	-6.0
Harmaline	-5.5
Acide férulique	-4.9
Menthol	-4.4

2.4. Nature des interactions du complexe 'BlaC : diosgénine'

En effet, le résidu arginine (ARG 291) a été impliqué dans la mise en place de pont hydrogène, proline (PRO 290) et alanine (ALA 293) dans la formation des liaisons hydrophobiques et enfin, (GLU 292), (ARG 236), (THR 253), (ILE 117), (phosphate PO 41), (LYS 235), (TYR 55) dans les liaisons de van Der Waals. Les interactions formées ont été comprise dans un périmètre de 2.14 à 5.17 Å.

Les figures 13, 14 et 15 montrent le mode de liaison et les interactions des résidus de la protéine dans son site actif avec la diosgénine.

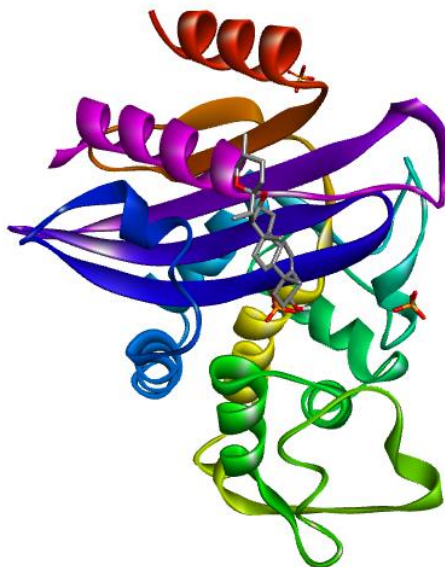


Figure 13. Mode de liaison de la BlaC avec la diosgénine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : diosgénine.

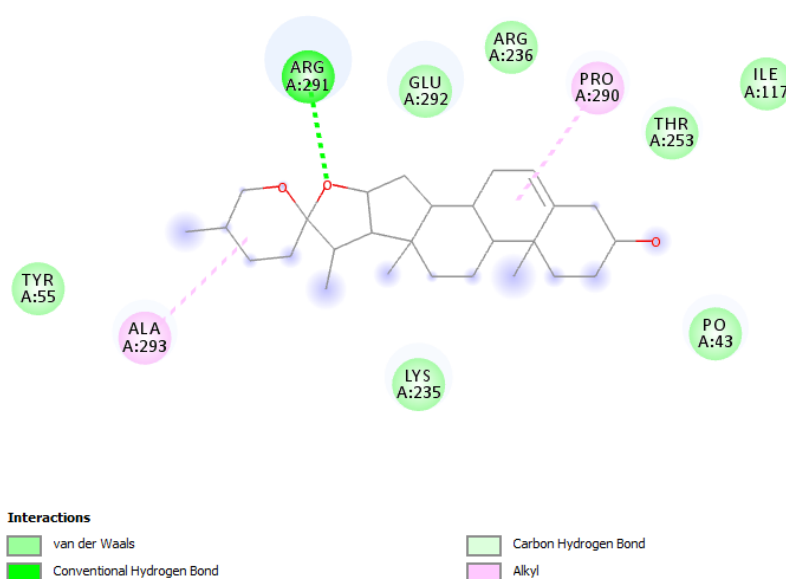


Figure 14. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la diosgénine.

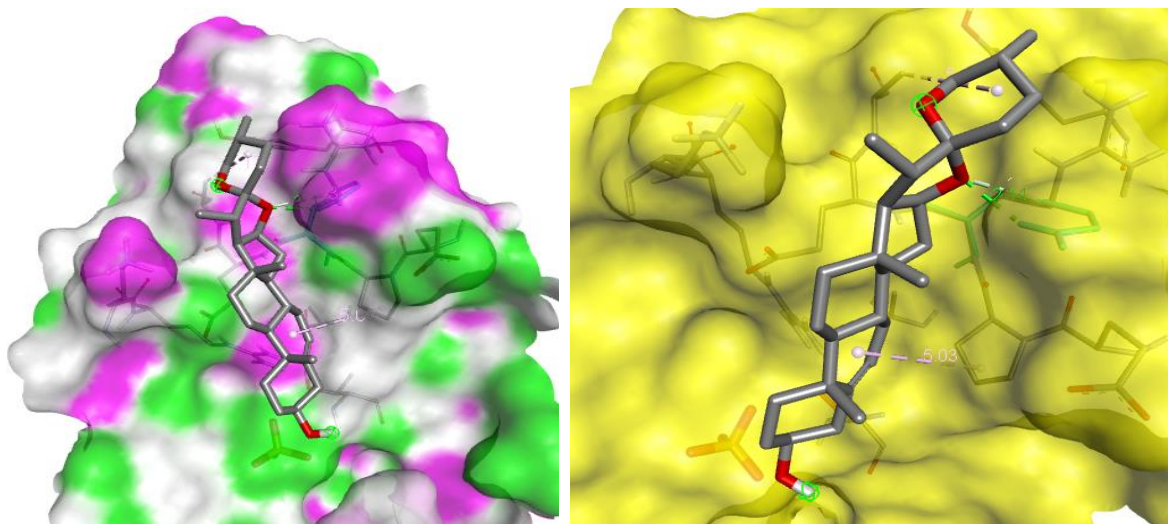


Figure 15. Emplacement de la diosgénine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.5. Nature des interactions du complexe ‘BlaC : carpaine’

Les résidus (ASP 255) et (Phosphate PO 41) sont impliqués dans la formation d’une liaison carbon-hydrogène. (PO 43), (ILE 117), (GLU 289), (THR 253), (PRO 290), (GLY 254), (TYR 286) et (ASP 287) ont mis des liaisons de van Der Waals. Ces interactions sont comprises dans un périmètre compris entre 3.42 et 3.79 Å.

Les figures 16, 17 et 18 montrent le mode de liaison et les interactions des résidus de la protéine dans son site actif avec la carpaine.

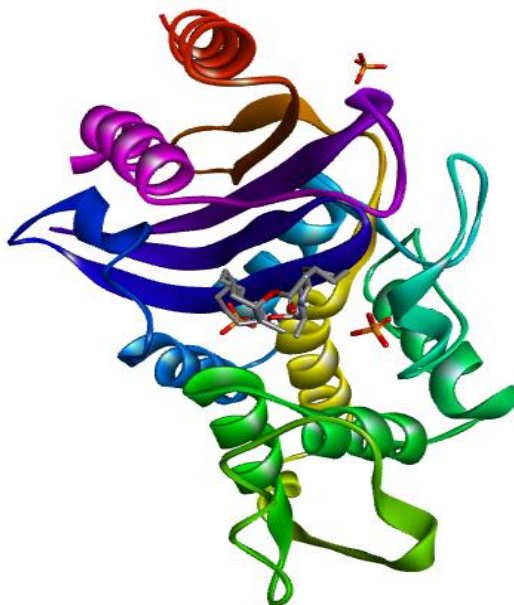


Figure 16. Mode de liaison de la BlaC avec la carpaine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : carpaine.

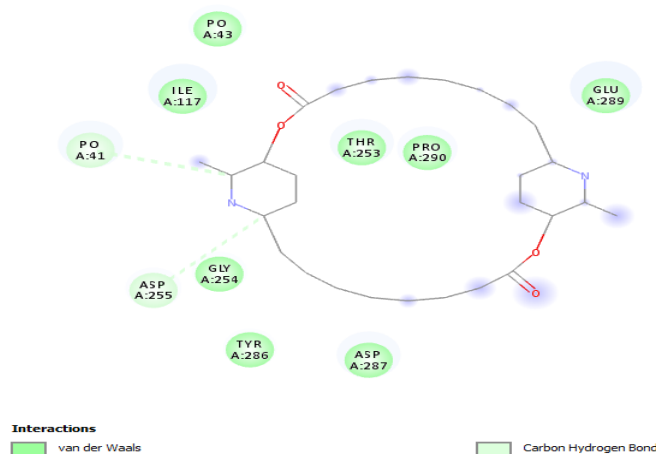


Figure 17. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la carpaine.

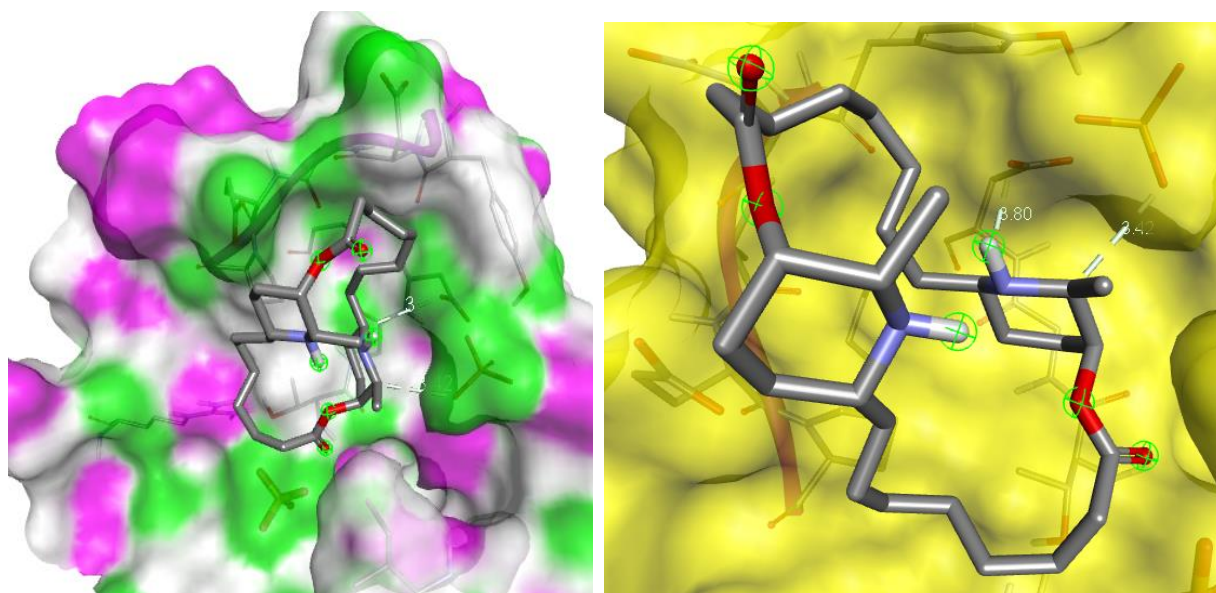


Figure 18. Emplacement de la carpaine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.6. Nature des interactions du complexe ‘BlaC : catéchine’

Les acides aminés (ASP 56), (ARG 75), (ARG 58) se sont impliqués dans la formation de deux liaisons hydrogènes avec le ligand. Cependant, les forces de van Der Waals ont été établies par (GLY 191), (PRO 190), (ARG 281), (GLY 283), (ALA 57) et (GLU 52) alors que les liaisons hydrophobiques sont constituées de (ALA 282) et (ARG 58). Ces interactions ont été comprise dans un périmètre de 2.53 et 5.18 Å.

Les figures 19, 20 et 21 montrent le mode d’interaction de la catéchine dans le site catalytique de la BlaC.

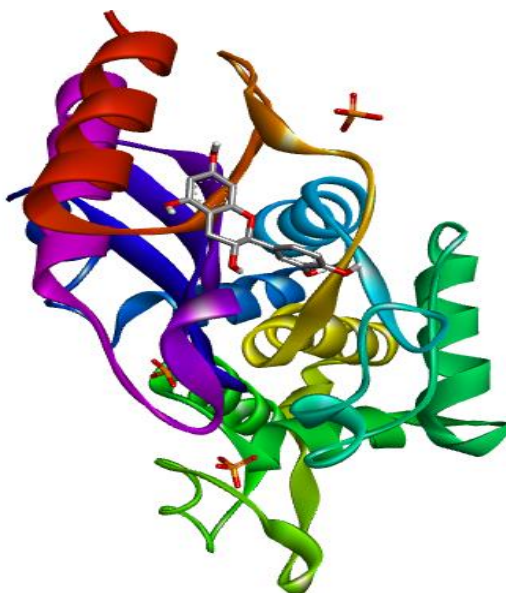


Figure 19. Mode de liaison de la BlaC avec la catéchine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : catéchine.

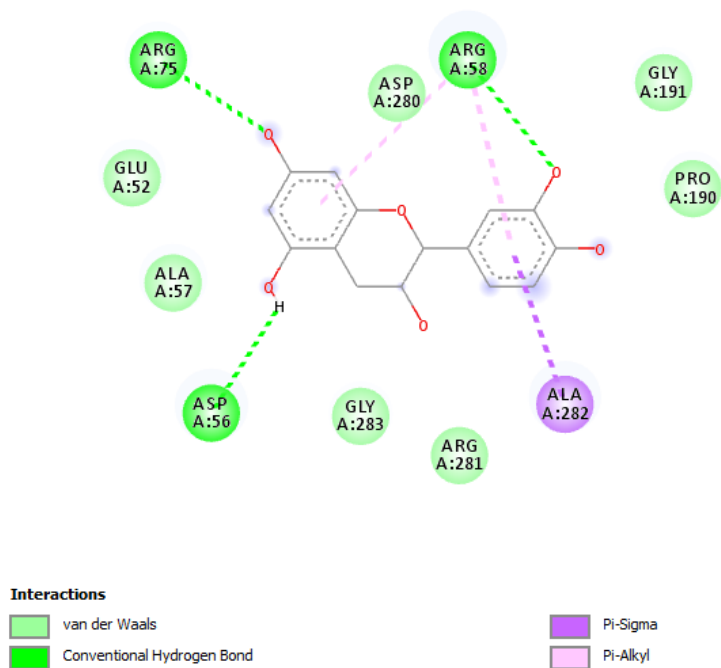


Figure 20. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la catéchine.

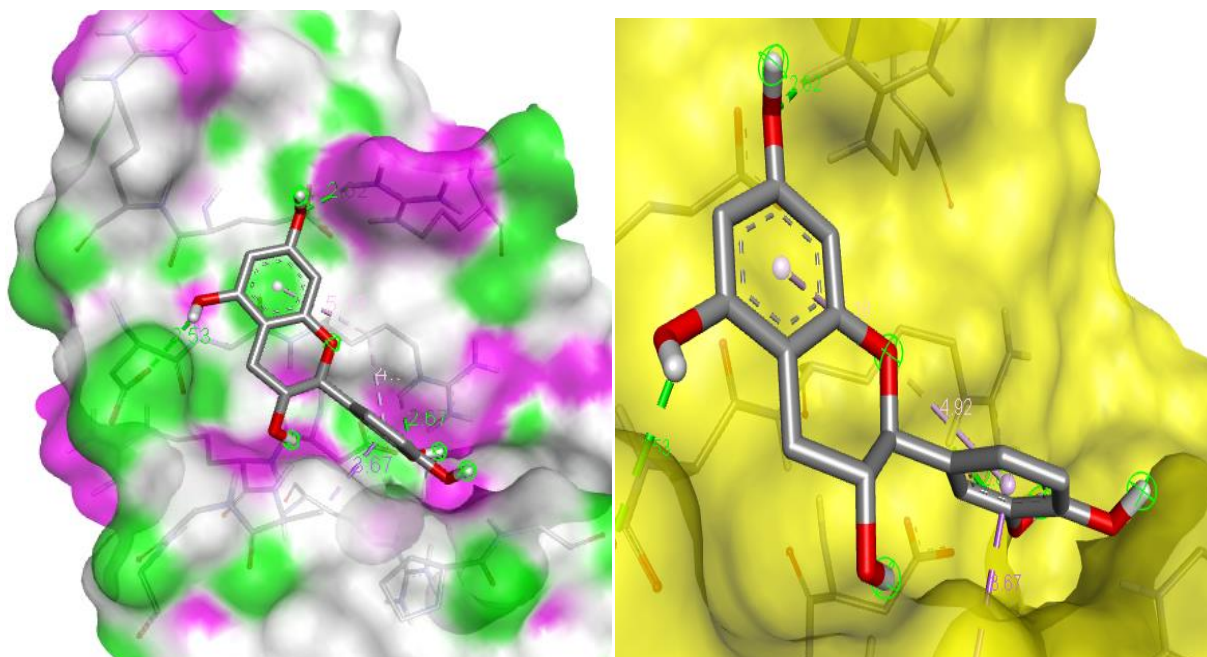


Figure 21. Emplacement de la catéchine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.7. Nature des interactions du complexe ‘BlaC : berbérine’

Un seul acide aminé (ARG 194) a été impliqué dans la formation d’une liaison hydrogène. Les force de van Der Waals sont composés de (GLU 184), (PRO 189) et (TYR 256) alors que les liaisons hydrophobiques (ARG 187), (TYR 286) (2) et (ALA 180). L’acide aminé (ASP 188) forme ainsi une liaison électrostatique. La distance observée a été comprise entre 2.05 et 4.85 Å.

Les figures 22, 23 et 24 illustrent le système d’interactions entre le récepteur et le ligand.

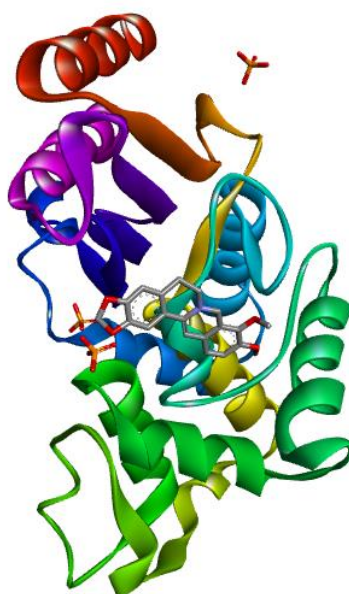


Figure 22. Mode de liaison de la BlaC avec la berbérine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : berbérine.

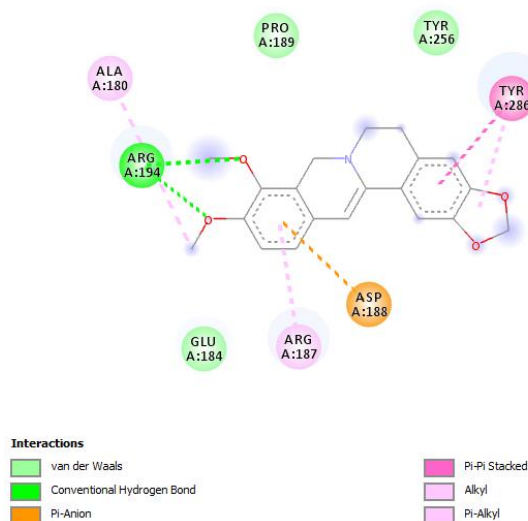


Figure 23. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la berbérine.

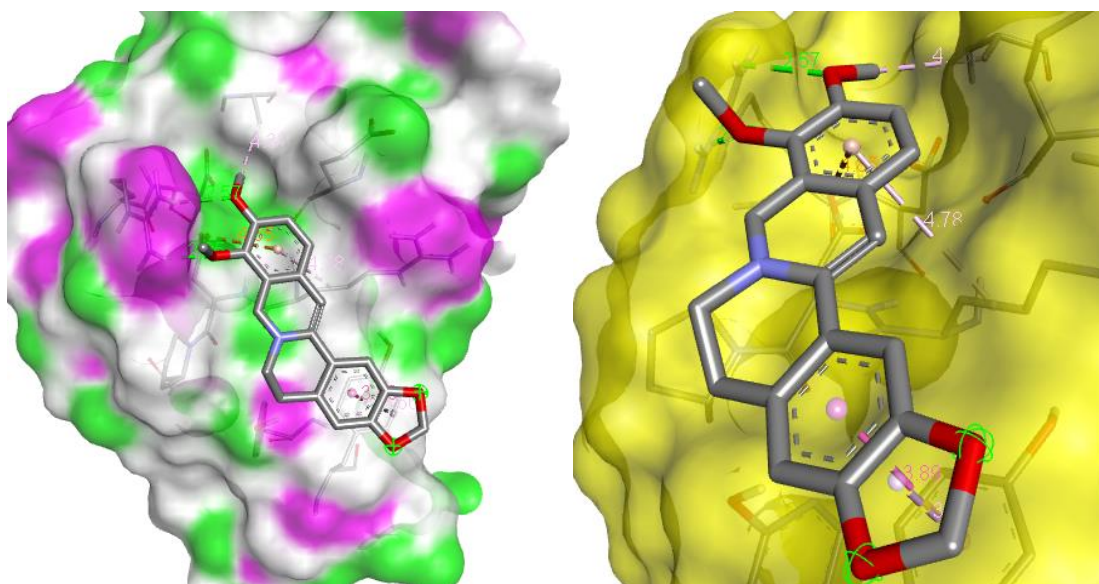


Figure 24. Emplacement de la berbérine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.8. Nature des interactions du complexe ‘BlaC : curcumine’

Les résidus (ASP 255), (LYS 235) et (ARG 236) ont participé à l’élaboration des liaisons hydrogènes alors que (ASP 255) et (ALA 288) participent dans la formation des liaisons carbon-hydrogène. De plus, les forces de van Der Waals sont assurées par (ASP 287), (GLY 257), (THR 253), (PO 41), (GLY 254) et (GLU 292). Cependant, les liaisons hydrophobiques sont assurées par (ALA 293) et (PRO 290) (2) alors que (ARG 291) forme une liaison électrostatique. Ces liaisons sont comprises dans un périmètre de 2.31 à 5.19 Å.

Les figures 25, 26 et 27 illustrent le mode de liaison de la bêta-lactamase et la curcumine.

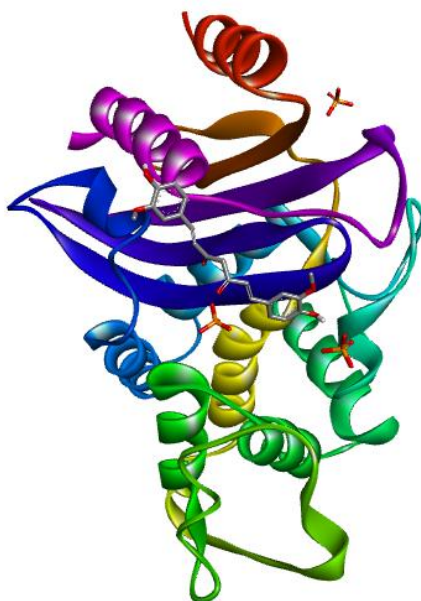


Figure 25. Mode de liaison de la BlaC avec la curcumine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : curcumine.

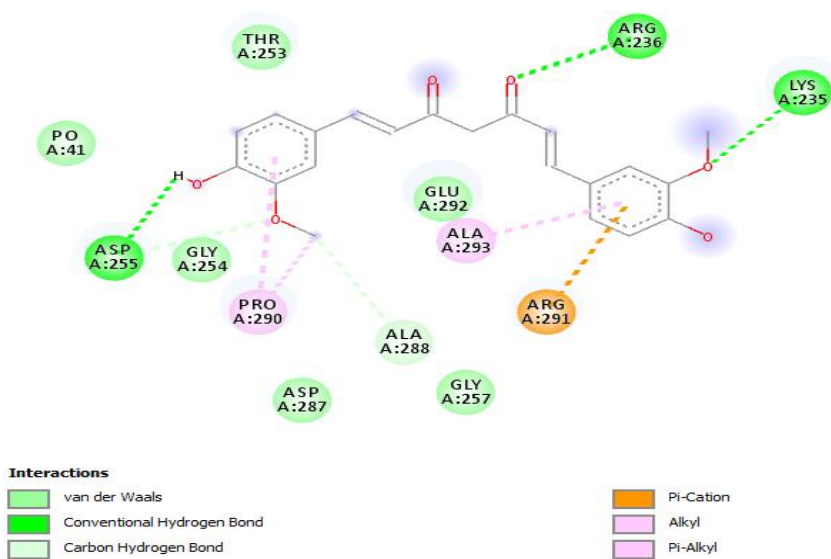


Figure 26. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et la curcumine.

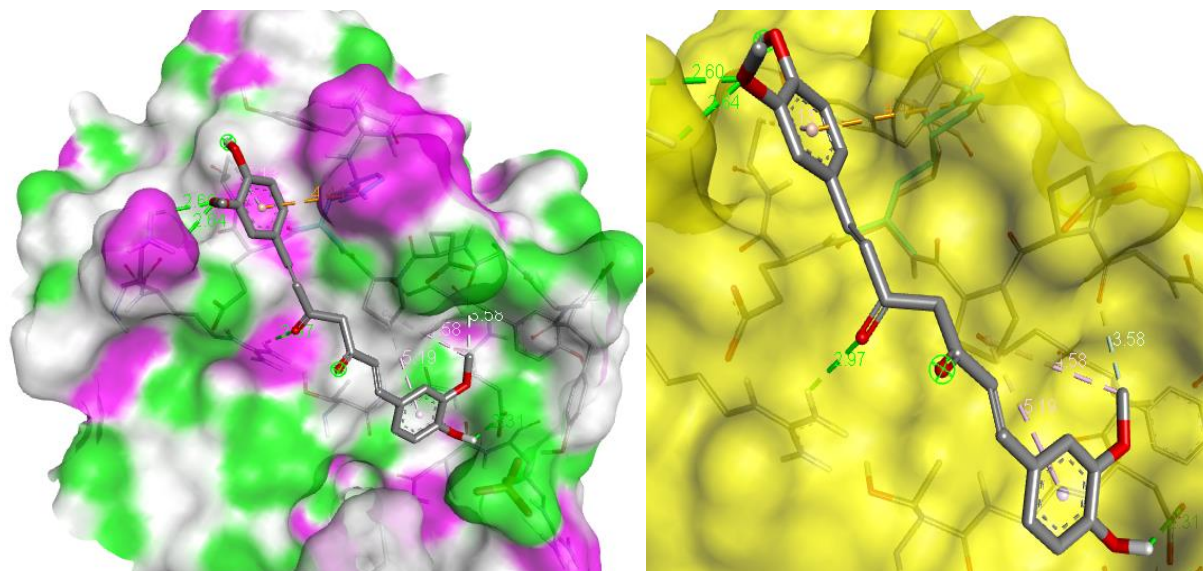


Figure 27. Emplacement de la curcumine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.9. Nature des interactions du complexe ‘BlaC : acide rosmarinique’

L’acide aminé GLU 52 a participé à la formation d’une liaison électrostatique alors que (ARG 58), (GLY 283), (ASP 56), (ALA 57) et (GLU 52) forment des liaisons hydrogènes tandis que (GLU 78), (ARG 75), (ARG 53), (ASP 280) et (ARG 281) sont responsables des forces de van Der Waals. Les liaisons hydrophobiques sont maintenues par (ARG 58) et (ALA 282). Les liaisons réalisées sont comprises entre 1.13 et 5.13 Å.

Les figures 28, 29 et 30 montrent le mode d’interaction entre la β -lactamase et l’acide rosmarinique.

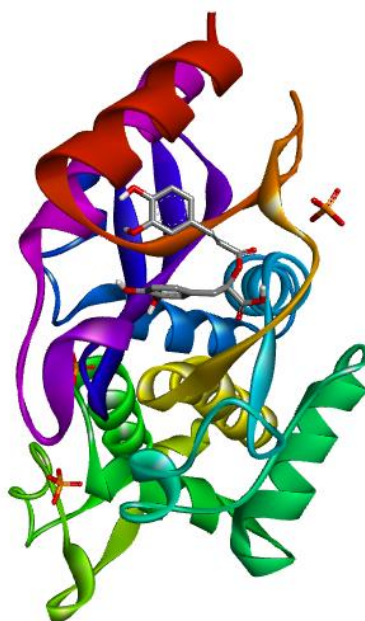


Figure 28. Mode de liaison de la BlaC avec l’acide rosmarinique. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : l’acide rosmarinique.

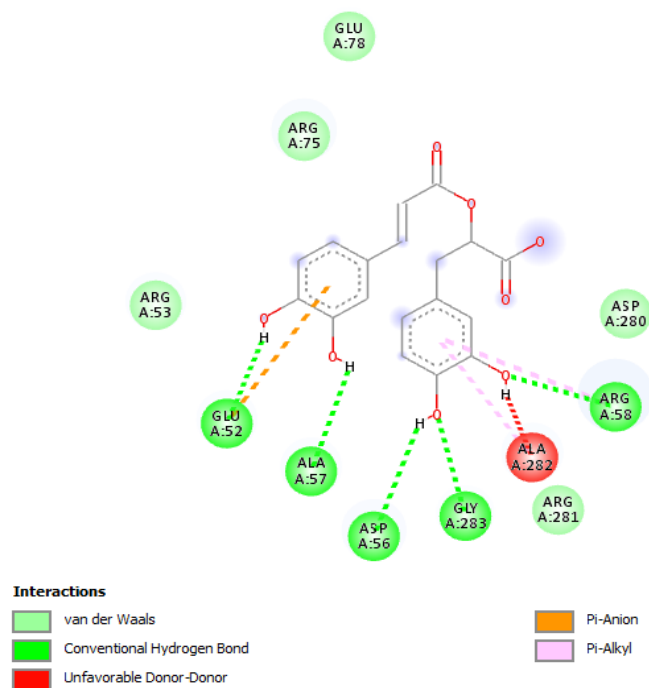


Figure 29. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et l'acide rosmarinique.

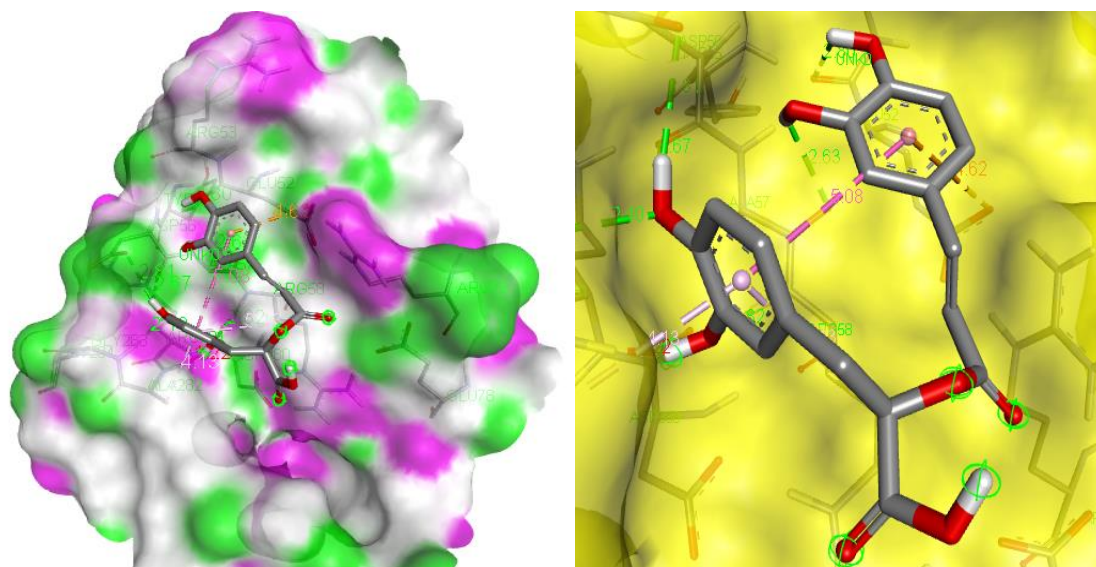


Figure 30. Emplacement de l'acide rosmarinique dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.10. Nature des interactions du complexe 'BlaC : artémisinine'

L'acide aminé ARG 58 a participé à la formation d'une liaison hydrophobique alors que (ALA 282), (ARG 281), (ASP 56), (GLY 283), (ALA 57), (GLU 52), (ARG 75) et (GLU 78) sont responsables des forces de van Der Waals. Les liaisons sont réalisées dans une distance de 4.31 Å.

Les figures 31, 32 et 33 montrent le mode d'interaction entre la β-lactamase et l'artémisinine.

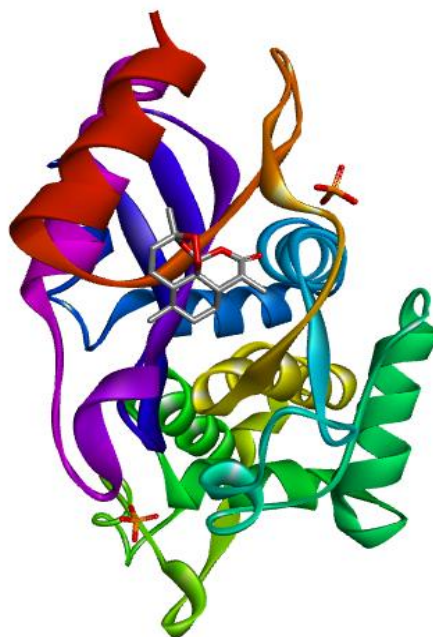


Figure 31. Mode de liaison de la BlaC avec l'artémisinine. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : l'artémisinine.

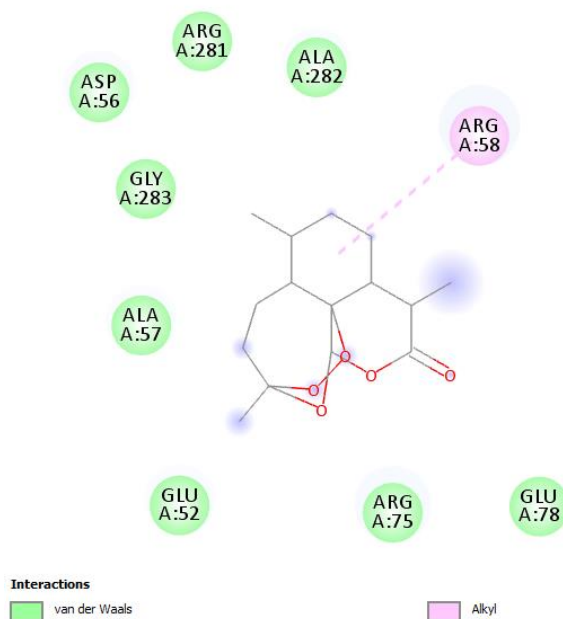


Figure 32. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et l'artémisinine.

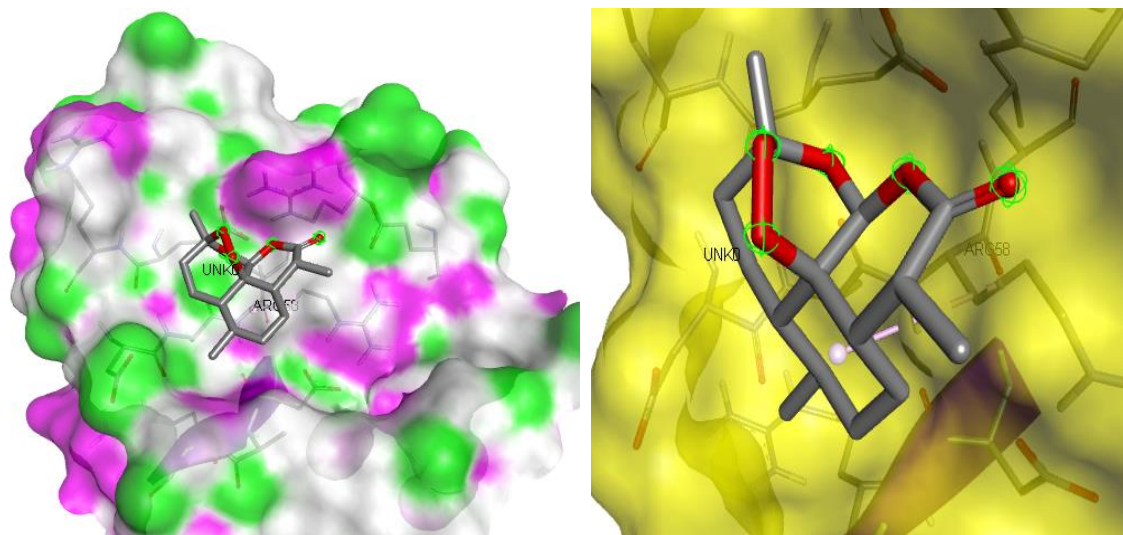


Figure 33. Emplacement de l'artémisinine dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.11. Nature des interactions du complexe 'BlaC : harmaline'

Les acides aminés (ASP 255) et (ASN 186) forment des liaisons hydrogènes alors que GLU 289 forme une liaison carbon-hydrogène. Les forces de van Der Waals sont assurées par (THR 253), (PRO 290), (ASP 287), (ALA 288), (TYR 286) et (GLY 254). L'acide aminé ILE 117 forme une liaison hydrophobique et PO 41 (2) forme une liaison électrostatique. Les liaisons sont réalisées dans une distance comprise entre 2.19 et 4.57 Å.

Les figures 34, 35 et 36 montrent le mode d'interaction entre la β -lactamase et l'artémisinine.

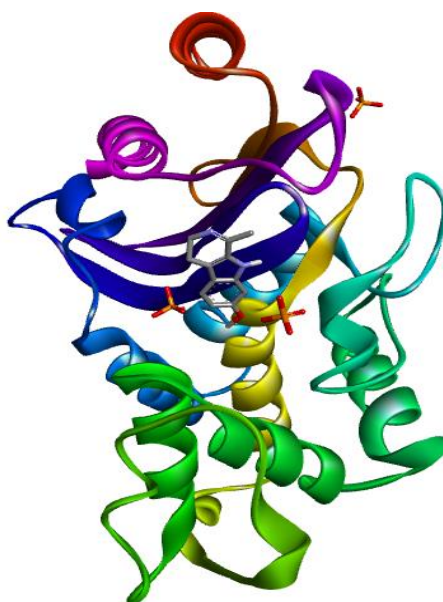


Figure 34. Mode de liaison de la BlaC avec l'harmaline. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : l'harmaline.

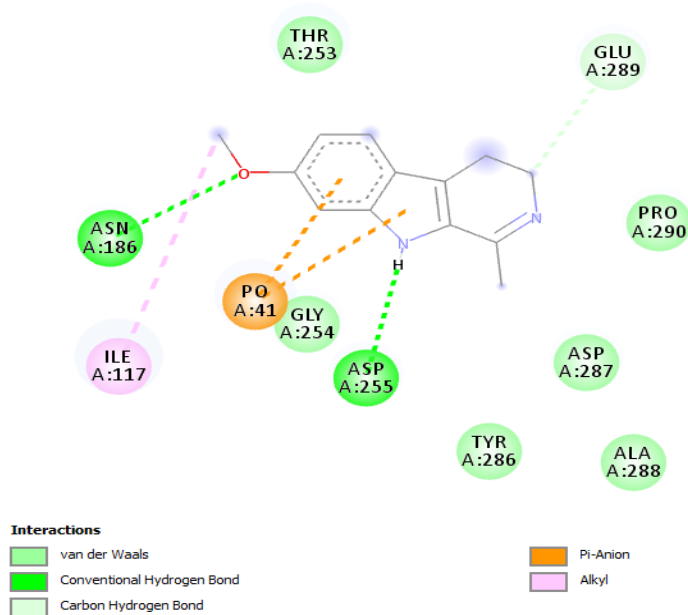


Figure 35. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et l'harmaline.

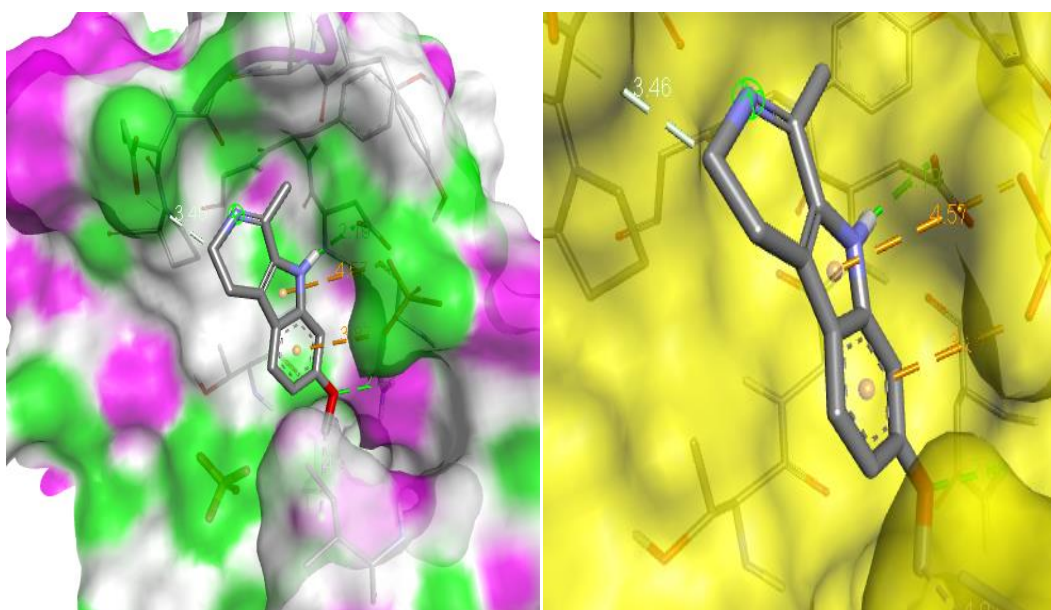


Figure 36. Emplacement de l'harmaline dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.12. Nature des interactions du complexe 'BlaC : acide férulique'

Les acides aminés (ARG 58) et (ALA 57) forment des liaisons hydrogènes alors que GLU 289 forme une liaison carbon-hydrogène. Les forces de van Der Waals sont assurées par (GLY 91), (PRO 190), (ASP 280), (ARG 75), (GLU 52), (ASP 56), (ARG 281) et (GLY 283). Les liaisons hydrophobiques sont maintenues par (ALA 282), (ARG 58) (2) et (ALA 57). Les liaisons sont réalisées dans une distance comprise entre 2.48 et 4.99 Å.

Les figures 37, 38 et 39 montrent le mode d'interaction entre la β -lactamase et l'acide férulique.

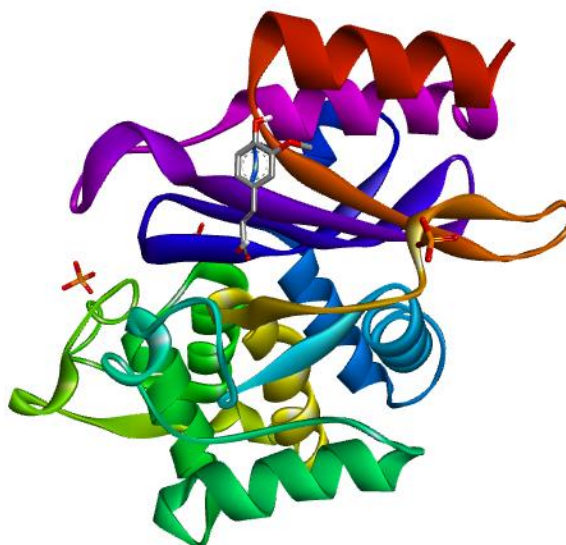


Figure 37. Mode de liaison de la BlaC avec l'acide férulique. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : l'acide férulique.

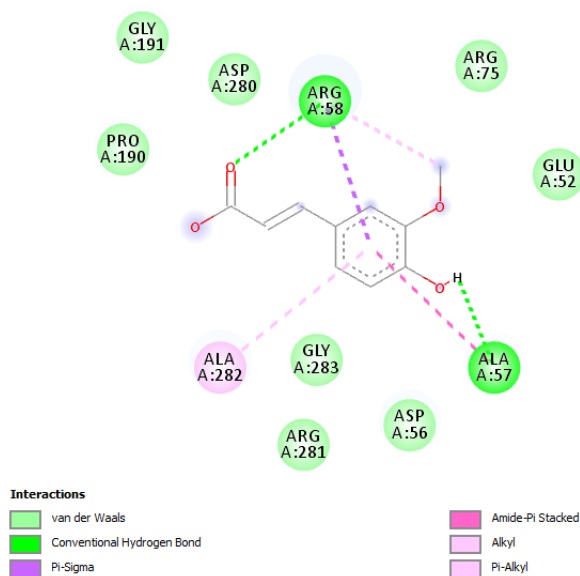


Figure 38. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et l'acide férulique.

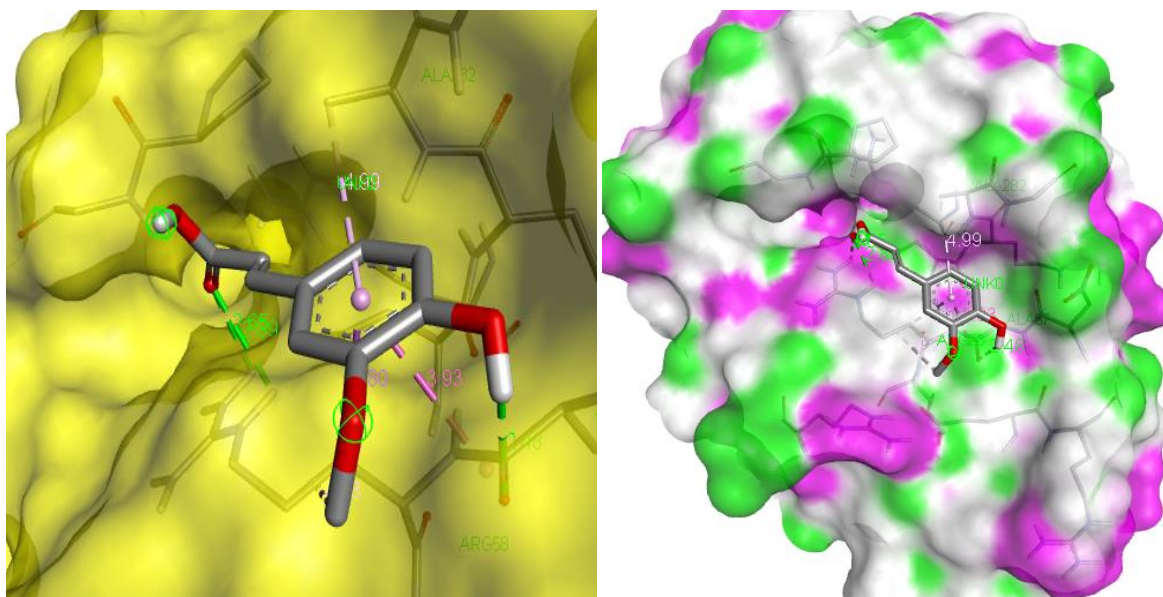


Figure 39. Emplacement de l'acide férulique dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

2.13. Nature des interactions du complexe 'BlaC : menthol'

Les acides aminés (GLY 257) et (GLY 254) forment des liaisons hydrogènes alors que TYR 286 forme une liaison hydrophobique.

Les forces de van Der Waals sont assurées par (PO 41), (THR 253), (PRO 290), (ASP 287), (ASP 255), (ALA 288), (TYR 256) et (ARG 258). La liaison hydrophobique est maintenue par (TYR 286). Les liaisons sont réalisées dans une distance comprise entre 1.99 et 5.4 Å.

Les figures 40, 41 et 42 montrent le mode d'interaction entre la β -lactamase et menthol.



Figure 40. Mode de liaison de la BlaC avec le menthol. Modèle en ruban : BlaC, modèle en boule et en bâton : le menthol.

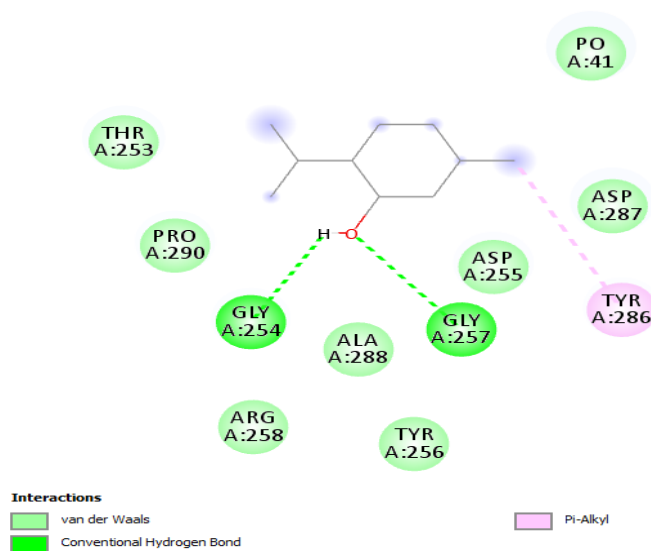


Figure 41. Diagramme en 2D montrant les interactions entre les résidus de BlaC et le menthol.

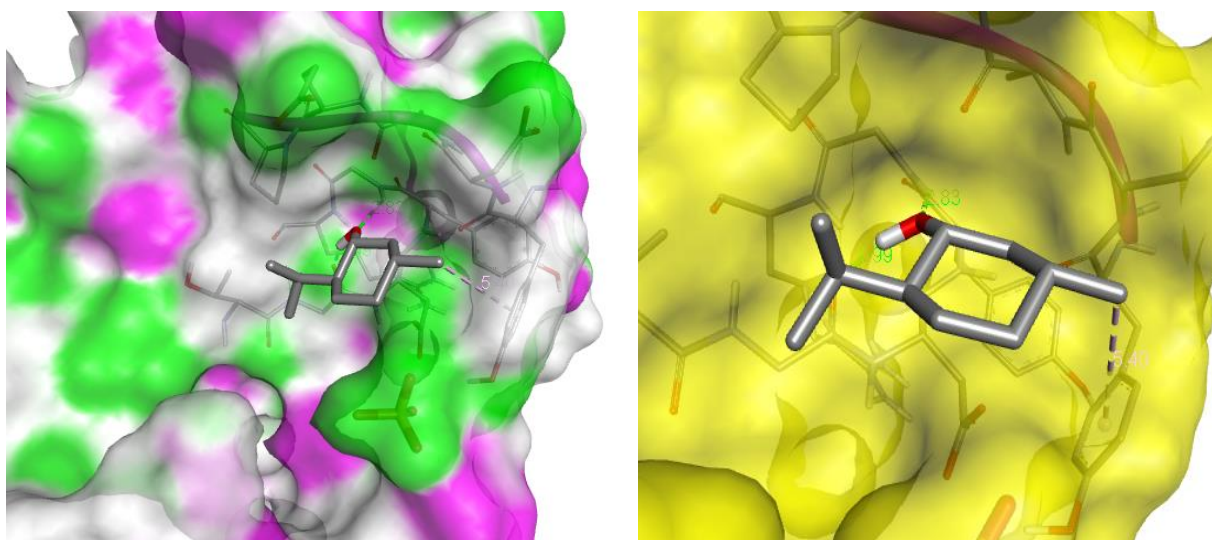


Figure 42. Emplacement du menthol dans le site catalytique de la bêta-lactamase.

L'interaction du BlaC avec les différents produits naturels sélectionnés et l'antibiotique de référence (Ceftazidime) a été résumé dans le tableau 7.

Tableau 7. Tableau récapitulatif des diverses interactions du BlaC : β -lactamase avec l'antibiotique de référence et les composés naturels choisis.

Composant	Liaisons hydrogène	Liaisons carbon-hydrogène	Liaisons hydrophobiques	Liaisons électrostatiques	Forces de van Der Waals	Distance (Å)	Energie de liaison (kcal/mol)
Ceftazidime (antibiotique de référence)	GLU 289 GLU 292	/	/	/	LEU 294 ARG 236 ARG 236 LYS 235 PRO 290 GLY 254	1.33- 3.39	-7.1

					ILE 117 PO 43 THR 253		
Diosgénine	ARG 291	/	PRO 290 ALA 293	/	GLU 292 ARG 236 THR 253 ILE 117 PO 41 LYS 235 TYR 55	2.14- 5.17	-7.5
Carpaine	/	ASP 255 PO 41	/	/	PO 43 ILE 117 GLU 289 THR 253 PRO 290 GLY 254 TYR 286 ASP 287	3.42- 3.79	-6.7
Catéchine	ASP 56 ARG 75 ARG 58	/	ALA 282 ARG 58	/	GLY 191 PRO 190 ARG 281 GLY 283 ALA 57 GLU 52	2.53- 5.18	-6.7
Berbérine	ARG 194	/	ARG 187 TYR 286 ALA 180	ASP 188	GLU 184 PRO 189 TYR 256	2.05- 4.85	-6.6
Curcumine	ASP 255 LYS 235 ARG 236	ASP 255 ALA 288	ALA 293 PRO 290	ARG 291	ASP 287 GLY 257 THR 253 PO 41 GLY 254 GLU 292	2.31- 5.19	-6.4
Acide rosmarinique	ARG 58 GLY 283 ASP 56 ALA 57 GLU 52	/	ARG 58 ALA 282	GLU 52	GLU 78 ARG 75 ARG 53 ASP 280 ARG 281	1.13- 5.13	-6.1
Artémisinine		/	ARG 58	/	ALA 282 ARG 281 ASP 56 GLY 283 ALA 57 GLU 52 ARG 75 GLU 78	4.31	-6.0
Harmaline	ASP 255 ASN 186	GLU 289	ILE 117	PO 41	THR 253 PRO 290 ASP 287 ALA 288 TYR 286 GLY 254	2.19- 4.57	-5.5
Acide férulique	ARG 58 ALA 57	/	ALA 282 ARG 58 ALA 57	/	GLY 91 PRO 190 ASP 280 ARG 75 GLU 52 ASP 56 ARG 281 GLY 283	2.48- 4.99	-4.9
Menthol	GLY 257 GLY 254	/	TYR 286	/	PO 41 THR 253 PRO 290 ASP 287 ASP 255 ALA 288 TYR 256 ARG 258	1.99- 5.40	-4.4

Discussion

Discussion

Pendant des milliers d'années, l'être humain a été livré sans défense à divers types d'infections, qui ont souvent atteint des proportions épidémiques et ont coûté la vie à des millions de personnes. La découverte puis la production à grande échelle d'antibiotiques au début du XXe siècle a été l'une des plus importantes réalisations de l'histoire de la médecine. Ces nouveaux médicaments miracles, en plus d'une connaissance approfondie des agents pathogènes et de l'amélioration des mesures d'hygiène, ont fait disparaître la peur de nombreuses maladies infectieuses et ont considérablement augmenté la qualité et l'espérance de vie (Mohr, 2016).

Les antibiotiques ont constitué un outil utile pour traiter les infections bactériennes depuis leur découverte, mais avec le temps, l'évolution de la résistance des microbes aux antibiotiques les a rendus inutiles. En conséquence, les bactéries ont pu trouver différentes façons d'échapper aux effets nocifs des antibiotiques et l'utilisation accrue des antibiotiques a entraîné la propagation de la résistance parmi les populations bactériennes, ce qui fait que de nombreux antibiotiques sont désormais incapables d'agir sur les agents pathogènes. Il existe différents mécanismes développés par les microbes pour résister à l'effet des antibiotiques. La présence de ces agents pathogènes pose un plus grand risque pour la santé publique partout dans le monde. À l'échelle mondiale, le problème de la résistance aux antibiotiques est une préoccupation croissante et des études ont été menées à cet égard dans différents pays du monde (Lodhi et al., 2018).

Les antibiotiques sont utilisés pour le traitement et la prévention des maladies bactériennes même chez de nombreux animaux domestiques destinés à l'alimentation comme stimulateur de croissance et réducteur de mortalité en réduisant la fonction du système immunitaire. Une utilisation excessive d'antibiotiques peut conduire à une contamination résiduelle établie du lait même après la pasteurisation et la littérature scientifique a révélé que l'être humain est l'utilisateur ultime de ces résidus d'antibiotiques (Chowdhury et al., 2020).

Actuellement, plus d'un tiers de la population mondiale souffre de la tuberculose induite par l'agent étiologique *Mycobacterium tuberculosis* qui affecte principalement les poumons. Pour le traitement de la tuberculose, l'administration de plusieurs antibiotiques tels que l'isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide et l'éthambutol est nécessaire pendant une longue période pour tuer les bactéries pathogènes (Bansal et al., 2018).

Les antibiotiques bêta-lactamines constituent la classe la plus utilisée (Veiga et Paiva, 2018). Ils sont des agents bactéricides qui interrompent la formation de la paroi cellulaire bactérienne en

raison de la liaison covalente aux protéines essentielles de liaison à l'antibiotique. La résistance aux β -lactamines est principalement due aux enzymes β -lactamases produites par les bactéries qui hydrolysent le cycle β -lactame, inactivant ainsi le médicament (Bush and Bradford, 2016). La connaissance du mécanisme moléculaire et de la structure des enzymes dégradant les antibiotiques est essentielle pour mettre au point des approches visant à l'emporter sur la résistance (Wright, 2005).

β -Lactamase (BlaC) est une hydrolase sérine, exprimée à la surface des cellules de *Mycobacterium tuberculosis*, qui peut efficacement hydrolyser les antibiotiques β -lactames. Le site actif large et ouvert de BlaC accueille une variété d'échafaudages de β -lactames, fournissant à *M. tuberculosis* une β -lactamase à large spectre. Une approche commune pour combattre la β -lactamase dans les agents pathogènes résistants aux médicaments consiste à coupler un antibiotique β -lactames avec un inhibiteur de la β -lactamase, ce qui augmente la sensibilité de la bactérie (White et al., 2019).

Historiquement, les produits naturels ont joué un rôle essentiel dans l'introduction de nouvelles thérapies à la clinique pour traiter les infections bactériennes potentiellement mortelles. La recherche et l'utilisation des molécules bioactives comme potentiels inhibiteurs de BlaC afin d'améliorer l'efficacité ou restaurer l'utilisation des antibiotiques contre les souches bactériennes aura un impact sur la santé globale et l'économie mondiale. La biologie computationnelle joue un rôle important dans ces recherches en fournissant une vaste base de données des structures des molécules.

Parmi les six antibiotiques bêta-lactamines et les quatre inhibiteurs soumis à l'analyse de docking avec BlaC, la ceftazidime présentait l'affinité de liaison maximale (-7.1 kcal/mol). De plus, dix composés naturels qui peuvent potentiellement inhiber l'activité de cette enzyme ont été testés ; un d'entre eux, la diosgénine, a affiché un meilleur résultat dans le cadre d'affinité avec BlaC par comparaison à l'antibiotique de référence la ceftazidime. Par ailleurs, d'autres produits naturels ont montré des résultats mieux que les autres antibiotiques et inhibiteurs testés. Il s'agit de la carpaine, la catéchine et la berbérine.

La ceftazidime se lie aux résidus de la BlaC à travers la formation de dix ponts hydrogènes, neuf interactions de van der Waals. En outre, une liaison d'hydrogène, deux liaisons hydrophobiques et sept interactions de van der Waals ont été formées entre les résidus de BlaC et le produit naturel diosgénine qui a affiché l'énergie de liaison la plus élevée. De plus, la carpaine s'est amarré au site actif de la BlaC en arrangeant deux liaisons d'hydrogène et huit interactions van der Waals. La catéchine s'est distinguée par la mise en place de deux liaisons hydrophobiques, trois liaisons hydrogènes et six liaisons de van der Waals avec les résidus de

BlaC. Enfin la berbérine s'est fixée par l'intermédiaire d'un pont hydrogène, trois liaisons hydrophobiques, une liaison électrostatique et trois interactions de van der Waals.

Outre de cette étude, l'analyse d'amarrage moléculaire dans une autre révèle de fortes interactions moléculaires entre les résidus ILE 117, PRO 290, ARG 236 et THR 253 et le ligand (Junaid et al., 2018).

Les molécules naturelles testées dans la présente étude ont montré des résultats *in silico* très intéressants dans le cadre de leur potentielle activité inhibitrice de la BlaC et il est nécessaire de promouvoir leur utilisation par la meilleure façon possible.

En effet, la diosgénine, un stéroïde saponine, est le produit de l'hydrolyse par les acides, les bases fortes ou les enzymes des saponines. On la trouve dans une variété de plantes dont les graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*), les racines d'igname sauvage (*Dioscorea villosa*, *Dioscorea polygonoides* et *Dioscorea zingiberensis*), *Solanum xanthocarpum*, *Solanum incanum* *Lloydia* et *Costus speciosus*. La diosgénine aurait diverses propriétés, telles qu'un effet stabilisateur de la membrane myocardique hypocholestérolémique, un potentiel anticancéreux et une activité antioxydante (Rajalingam et al., 2013).

Cependant, la carpaine est le principal alcaloïde des feuilles de Papaya a montré une forte inhibition de BlaC chez *M. tuberculosis* (Kongkham 2020). Cette molécule est connue pour ses effets sur le système cardiovasculaire. Il a été signalé également que la carpaine, la catéchine et la berbérine ont montré une potentielle inhibition de BlaC chez *Escherichia coli* (Thakur et al., 2014).

De plus, la catéchine est un composé de la famille des flavonoïdes de la sous-classe des flavanols connue également sous le nom de catéchol. Ce tanin est un composé allélopathique initialement découvert dans les fruits de l'acacia de cajou (*Acacia catechu*) de la famille des fabacées et *Periploca aphylla* de la famille des apocynacées. La catéchine et ses nombreux isomères sont de puissants antioxydants qui aident à prévenir les maladies inflammatoires et coronariennes et ils sont également considérés comme antibactériens (Bais et al., 2002).

Les études réservées à l'identification des produits naturels qui pourraient inhiber la BlaC ont réussi à promouvoir la réalité de ces molécules notamment la capacité des molécules actives à contrer les effets indésirables de nombreux agents pathogènes. Des preuves qui élucident la nécessité de l'examen de ces composés afin de confirmer leur potentiel inhibiteur et d'élaborer des stratégies pour leur extraction et utilisation comme agents antibactériens ainsi que pour la lutte contre la tuberculose.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La présente étude a pour but d'élucider l'importance de la biologie moléculaire computationnelle comme outil indispensable de screening moléculaire *in silico* pour résoudre certains problèmes associés à certaines pathologies telle que la tuberculose notamment en ce qui concerne l'émergence de l'antibiorésistance chez *Mycobacterium tuberculosis* suite à l'exposition fréquente aux antibiotiques variés qui se trouvent dans le lait et les viandes des animaux domestiques.

La modélisation biologique a pu mettre en évidence la faisabilité de la recherche et d'emploi des molécules actives d'origine naturelle pour contrebalancer l'antibiorésistance bactérienne. Il s'est avéré que la ceftazidime est l'antibiotique bêta-lactamine qui présente une affinité de liaison maximale à la bêta-lactamase (BlaC) par rapport aux autres neuf antibiotiques et inhibiteurs reconnus. Cependant, parmi les dix biomolécules naturelles testées qui pourraient exercer une potentielle inhibition de l'enzyme BlaC, la diosgénine a présenté de meilleures affinités avec le site actif de BlaC par rapport à l'antibiotique de référence la ceftazidime. De plus, la carpaine, la catéchine et la berbérine ont présenté également une potentielle inhibition de cette enzyme mais à moindre degré.

De plus, certains résidus du site actif de la métallo-bêta-lactamase à savoir PRO 290, GLU 292, ARG 236, THR 253, ILE 117 et LYS 235 se sont impliqués dans la formation de liaisons aussi bien avec l'antibiotique de référence 'ceftazidime' qu'avec les biomolécules retenues dans cette étude.

Les molécules actives identifiées dans la présente étude ont montré des résultats *in silico* très intéressants comme de potentiels inhibiteurs de la BlaC et par conséquent de l'antibiorésistance de *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose. Il est donc envisagé que les inhibiteurs identifiés serviront de meilleur point de départ pour les études expérimentales visant la conception et la découverte des inhibiteurs de BlaC. De plus, des expériences *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires afin de confirmer le potentiel inhibiteur de ces molécules afin de les promouvoir comme agents antibactériens.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Alonso-Amelo ME. 2018. Chapter 10 - Milk as a natural product : Foreign natural and anthropogenic organic compounds in it. *Studies in Natural Products Chemistry*. 56: 335-435.
- Anadón A., Martínez-Larrañaga MR., Ares I., Martínez MA. 2017. Chapter 21 - Overview : Preclinical studies of dairy milk and products on health. *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*. 261-285. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00021-8>.
- Bais HP., Walker TS., Stermitz FR., Hufbauer RA., Vivanco JM. 2002. Enantiomeric dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (\pm)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant physiology*. 128(4): 1173-1179. DOI: 10.1104/pp.011019.
- Banaganapalli B., Morad FA., Khan M., Kumar CS., Elango R., Awan Z., Shaik NA., 2019. *Molecular docking in essentials of bioinformatics*. 1. Springer Nature Switzerland. 335-353.
- Bansal R., Sharma D., Singh R. 2018. Tuberculosis and its treatment: An overview. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 18(1): 58-71. DOI:10.2174/1389557516666160823160010
- BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, (v20. 1.0. 19295), San Diego: Dassault Systèmes, 2020.
- Burley SK., Berman HM., Kleywegt GJ., Markley JL., Nakamura H., Velankar S. 2017. Protein Data Bank (PDB): The single global macromolecular structure archive. *Methods in Molecular Biology*. 1607: 627–641. doi: 10.1007/978-1-4939-7000-1_26.
- Bush K., Bradford PA. 2016. β -Lactams and β -Lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6(8): a025247. doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Calhoun C., Wermuth HR., Hall GA. 2020. Antibiotics. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; PMID: 30571064.
- Chowdhury J., Mandal TK., Mondal S. 2020. Genotoxic impact of emerging contaminant amoxicillin residue on zebra fish (*Danio rerio*) embryos. *Heliyon*. 6(11): e05379.
- Crass RL., Pai MP. 2019. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of β -lactamase inhibitors. *Pharmacotherapy*. 39(2): 182-195. doi: 10.1002/phar.2210.
- de Sousa Oliveira K., de Lima LA., Cobacho NB., Dias SC., Franco OL. 2016. Chapter 2 - Mechanisms of antibacterial resistance : Shedding some light on these obscure processes ? *Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*. 19-35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00002-2>.
- de Vrese M., Pfeuffer M., Roos N., Scholz-Ahrens K., Schrezenmeir J. 2010. The health aspects of milk. *Improving the Safety and Quality of Milk. Improving Quality in Milk Products*.

- Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 28-73.
<https://doi.org/10.1533/9781845699437.1.28>.
- Elings W., Gaur A., Blok AJ., Timmer M., van Ingen H., Ubbink M. 2020. β -Lactamase of *Mycobacterium tuberculosis* shows dynamics in the active site that increase upon inhibitor binding. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 64(3): e02025-19. doi: 10.1128/AAC.02025-19.
- Ferguson LA., Rhoads J. 2009. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: The new face of an old disease. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*. 21(11): 603-609. doi: 10.1111/j.1745-7599.2009.00458.x.
- Fogel N. 2015. Tuberculosis: a disease without boundaries. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 95(5): 527-31. doi: 10.1016/j.tube.2015.05.017.
- Gómez-Meda BC., Bañales-Martínez LR., Zamora-Perez AL., Lemus-Varela ML., Trujillo X., Sánchez-Parada MG., Torres-Mendoza BM., Armendáriz-Borunda J., Zúñiga-González GM. 2016. Micronucleated erythrocytes in peripheral blood from neonate rats exposed by breastfeeding to cyclophosphamide, colchicine, or cytosine-arabioside. *Biomed Research International*. 2016:9161648. doi: 10.1155/2016/9161648.
- Gonzalez J., Lendebol E., Shen A., Philipp M., Clement CC. 2018. In silico-mediated virtual screening and molecular docking platforms for discovery of non β -lactam inhibitors of γ -49 β -lactamase from *Mycobacterium tuberculosis*. *MOJ Proteomics & Bioinformatics*. 7(1): 12-24.
- Green M., Ben-Hur E., Riklis E., Gordin S., Rosenthal I. 1980. Application of mutagenicity test for milk. *Journal of Dairy Science*. 63(3): 358-361.
- Hartle JC., Cohen RS., Sakamoto P., Boyd Barr D., Carmichael SL. 2018. Chemical contaminants in raw and pasteurized human milk. *Journal of Human Lactation*. 34(2): 340-349. doi: 10.1177/0890334418759308.
- Hemaiswarya S., Kruthiventi AK., Doble M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15(8): 639-52. doi: 10.1016/j.phymed.2008.06.008.
- Junaid M., Alam MJ., Hossain MK., Halim MA., Ullah MO. 2018. Molecular docking and dynamics of Nickel-Schiff base complexes for inhibiting β -lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Silico Pharmacology*. 6: 6. <https://doi.org/10.1007/s40203-018-0044-6>.
- Junza A., Barbosa S., Codony MR., Jubert A., Barbosa J., Barrón D. 2014. Identification of metabolites and thermal transformation products of quinolones in raw cow's milk by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(8):2008-21. doi: 10.1021/jf405554z.

- Khusro A., Aarti C., Barbabosa-Pliego A., Salem AZM. 2018. Neoteric advancement in TB drugs and an overview on the anti-tubercular role of peptides through computational approaches. *Microbial Pathogenesis*. 114: 80-89. doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.034.
- Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker BA., Thiessen PA., Yu B., Zaslavsky L., Zhang J., Bolton EE. 2018. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acid Research*.
- King MD., Phillips P., Turner MW., Katz M., Lew S., Bradburn S., Andersen T., McDougal OM. 2016. Computational exploration of a protein receptor binding space with student proposed peptide ligands. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 44(1): 63-67. doi: 10.1002/bmb.20925.
- Koch A., Mizrahi V. 2018. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*. 26(6): 555-556. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.012.
- Konaté K., Mavoungou JF., Lepengué AN., Aworet-Samseny RRR., Hilou A, Souza A., Dicko MH., M'Batchi B. 2012. Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 11: 18.
- Kongkham B., Prabakaran D., Puttaswamy H. 2020. Opportunities and challenges in managing antibiotic resistance in bacteria using plant secondary metabolites. *Fitoterapia*. 147: 104762.
- Kurz SG., Bonomo RA. 2012. Reappraising the use of β -lactams to treat tuberculosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 10(9): 999-1006. doi: 10.1586/eri.12.96.
- Kwofie SK., Adobor C., Quansah E., Bentil J., Ampadu M., Miller WA., Wilson MD. 2020. Molecular docking and dynamics simulations studies of OmpATb identifies four potential novel natural product-derived anti-*Mycobacterium tuberculosis* compounds. *Computers in Biology and Medicine*. 122: 103811. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.103811>.
- Lodhi AF., Zhang Y., Adil M., Deng Y. 2018. Antibiotic discovery: combining isolation chip (iChip) technology and co-culture technique. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(17): 7333-7341. doi: 10.1007/s00253-018-9193-0.
- Martelli G., Giacomini D. 2018. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 158: 91-105.
- Miotto P., Zhang Y., Cirillo DM., Yam WC. 2018. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology*. (12): 1098-1113. doi: 10.1111/resp.13393.
- Morris GM., Lim-Wilby M. 2008. Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*. 443:365-82. doi: 10.1007/978-1-59745-177-2_19.
- Moural TW., White DSD., Choy CJ., Kang C., Berkman CE. 2019. Crystal structure of phosphoserine BlaC from *Mycobacterium tuberculosis* Inactivated by Bis(Benzoyl)

- Phosphate. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(13): 3247. doi: 10.3390/ijms20133247.
- Nag SK. 2010. Pesticides, veterinary residues and other contaminants in milk. *Improving the Safety and Quality of Milk. Milk Production and Processing. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. 113-145. <https://doi.org/10.1533/9781845699420.2.113>.
- Navien TN., Thevendran R., Hamdani HY., Tang TH., Citartan M. 2021. In silico molecular docking in DNA aptamer development. *Biochimie*. 180: 54-67.
- Pagadala NS., Syed K., Tuszynski J. 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*. 9: 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>.
- Pajewska-Szmyt M., Sinkiewicz-Darol E., Gadzała-Kopciuch R. 2019. The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk. *Environmental Science and Pollution Research*. 26: 7405–7427 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04141-1>.
- Parasuraman S. 2012. Protein data bank. *WEBWISE*. 3(4): 351-352.
- Perrin-Guyomard A., Soumet C., Leclercq R., Doucet-Populaire F., Sanders P. 2005. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from pasteurized milk and characterization of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance genes. *Journal of Food Protection*. 68(2): 347-52. doi: 10.4315/0362-028x-68.2.347.
- Pettersen EF., Goddard TD., Huang CC., Couch GS., Greenblatt DM., Meng EC., Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 13: 1605-1612.
- Pinzi L., Rastelli G. 2019. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(18): 4331.
- Rajalingam K., Sugunadevi G., Vijayaanand MA., Sathiyapriya J., Sivakumar K., Suresh K. 2013. Anticlastogenic of diosgenin on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene treated experimental animals. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 23(2): 77-85.
- Sagar A., Haleem N., Bashir YM., Ashish. 2017. Search for non-lactam inhibitors of mtb β -lactamase led to its open shape in apo state: new concept for antibiotic design. *Scientific Reports*. 7: 6204. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06023-3>.
- Tavan E., Cayuela C., Antoine JM., Cassand P. 2000. Effect of fermented milk on colorectal cancer biomarker in rats induced by a chronic exposure to several heterocyclic amines. *Dietary Anticarcinogens and Antimutagens Chemical and Biological Aspects*. 376-379. DOI: 10.1533/9781845698188.7.376.
- Tehrani KHME., Martin NI. 2018. β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: an update. *MedChemComm*. 9(9): 1439-1456. doi: 10.1039/c8md00342d.

- Teixeira RC., Luiz LC., Junqueira GMA., Bell MJV., Anjos VC. 2020. Detection of antibiotic residues in Cow's milk: A theoretical and experimental vibrational study. *Journal of Molecular Structure*. 1215: 128221.
- Thakur P., Chawla R., Goel R., Grover S., Singh N., Narula A., Arora R., Sharm RK. 2014. Molecular docking analysis of predominant phyto-ligands against New Delhi metallo-beta-lactamase-1 harboring *Escherichia coli*. *Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research*. 5(2): 97-106.
- Tremblay LW, Fan F., Blanchard JS. 2010. Biochemical and structural characterization of *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase with the carbapenems ertapenem and doripenem. *Biochemistry*. 49(17):3 766-73. doi: 10.1021/bi100232q.
- Trott O., Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 31(2): 455-61. doi: 10.1002/jcc.21334.
- Veiga RP., Paiva JA. 2018. Pharmacokinetics-pharmacodynamics issues relevant for the clinical use of beta-lactam antibiotics in critically ill patients. *Critical Care*. 22(1): 233. doi:10.1186/s13054-018-2155-1.
- Ventola CL. 2015. The antibiotic resistance crisis. Part 1: Causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 40(4): 277–283.
- Wang J., Soisson SM., Young K., Shoop W., Kodali S., Galgoci A., Painter R., Parthasarathy G., Tang YS., Cummings R., et al. 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*. 441: 358–361.
- Wang W., Liu L., Xu L., Ma W., Kuang H., Xu C. 2013. Detection of β -lactamase residues in milk by sandwich ELISA. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10(7): 2688-2698. doi: 10.3390/ijerph10072688.
- White DS., Choy CJ., Moural TW., Martin SE., Wang J., Gargaro S., Kang CH., Berkman CE. 2019. Bis(benzoyl) phosphate inactivators of beta-lactamase C from Mtb. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 29(16): 2116–2118. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.07.002.
- Wivagg CN., Bhattacharyya RP., Hung DT. 2014. Mechanisms of β -lactam killing and resistance in the context of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 67(9): 645-54. doi: 10.1038/ja.2014.94.
- Wright GD. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57(10): 1451-70. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.002.
- Yang Z., Niu Y., Le Y., Ma X., Qiao C. 2010. Beta-lactamase inhibitory component from the roots of *Fissistigma cavaleriei*. *Phytomedicine*. 17(2): 139-141.

- Zhang Y., Yew WW. 2015. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 19(11): 1276-89. doi: 10.5588/ijtld.15.0389.
- Zhang D., Wang Y., Lu J., Pang Y. 2015. In Vitro Activity of β -Lactams in Combination with β -Lactamase Inhibitors against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 60(1): 393-399. doi: 10.1128/AAC.01035-15.
- Zorraquino MA., Roca M., Fernandez N., Molina MP., Althaus R. 2008. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. Journal of Food Protection. 71(6): 1193-8. doi: 10.4315/0362-028x-71.6.1193.