



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ IBN-KHALDOUN - TIARET-
ANNEXE SOUGUEUR

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Pour l'obtention du diplôme de Master

Filière : CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique

Par :

M^r BOUSSOIRE KADA

THÈME

*Conception in silico de nouveaux inhibiteurs pour le
traitement de tuberculose*

Soutenue publiquement le : 03 / 07 /2022 devant le Jury composé de:

Mr ATMANI Abdelali	M. C .B	Université de Tiaret	Président
Mr Ghazi Redhwane	M. C. B	Université de Tiaret	Examineur
M ^{lle} LAOUD Aicha	M. C. B	Université de Tiaret	Encadreur

PROMOTION 2021 /2022

Remerciements

Avant tout, je remercie Allah qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans de Bonnes conditions.

Je tiens à remercier mon encadreur Madame LAOUD Aicha Maitre de conférence à l'université Ibn khaldoun -Tiaret, pour nous avoir encadré durant toute la période de préparation du mémoire, pour tout le temps qu'il nous a consacré à nous former, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi de ce travail.

Nos vifs remerciements vont également les membres de jury Mr ATMANI ABDELALLI et Mr GHAZI REDHWANE pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger notre travail

Enfin, Je veux témoigner ma gratitude à mes parents, mes frères, mes sœurs, et toute ma famille pour leurs encouragements et leurs soutiens ainsi qu'à tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

Résumé	I
Abstract.....	II
ملخص.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Liste des figures	V
Liste des schémas.....	VII
Introduction générale.....	01

Chapitre I : Méthodes de criblage virtuel in silico

1 Drug discovery.....	03
1-1 Histoire de la découverte des médicaments.....	03
1-2 Choix d'une cible thérapeutique.....	03
1-3 Identification de « hits	04
1-4 Génération et optimisation de « leads	04
1-5 Test précliniques.....	05
1-6 Test cliniques.....	05
2 Méthodes de criblage virtuel in silico.....	07
2-1 Criblage virtuel « ligand-based.....	07
2-2 Criblage virtuel « structure-based.....	08
Références Bibliographiques.....	

Chapitre II : Notions générales sur la Tuberculose

1- Définition de la Tuberculose.....	23
2-Histoire de la maladie.....	23
3-les différents types de la tuberculose.....	26
3-1- La tuberculose extra pulmonaire.....	26
3-2- La tuberculose pulmonaire.....	26
4- Diagnostique de la tuberculose.....	24
5 Le traitement.....	25
4- Traitement de la tuberculose maladie.....	29
4-1 Traitement de la tuberculose latente.....	30
4-2 Traitement de la tuberculose active.....	30

Chapitre III : Identification des nouveaux inhibiteurs de l'Enoly ACP reductase

1 Criblage virtuel	35
1-1 Filtration de chimiothèques.....	35
1-2 Préparation des ligands	35
1-3 Criblage virtuel à base de structure de InhA.....	35
1-3-1Préparation de protéine et la génération de récepteur.....	36
1-3-2 Docking moléculaire	36
2- Résultat et Discussion.....	37
2-1 Visualisation des poses de docking.....	37
2-2 Analyse de la justesse du modèle optimal.....	41
2-3 Analyses ADME.....	45
3 Conclusion.....	46
Références Bibliographiques.....	47
Conclusion Générale.....	48

| Résumé

De nos jours, les méthodes in silico sont de plus en plus employées dans les stratégies de découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Au cours de cette recherche, nous nous sommes appuyés sur le traitement de la tuberculose basé sur l'inhibition de l'Enoyl ACP réductase.

Dans notre travail on s'intéressé à l'étude in silico de l'inhibition enzymatique par criblage virtuel avec Maestro-Schrödinger. Cette approche permet de modéliser les interactions entre une protéine et des milliers de petits composés chimiques. Initialement, les molécules de la base de données chimiques ZINC ont été filtrées par la règle de Lipinski de cinq pour identifier les composés de type médicament. Les composés résultants ont ensuite été ancrés dans la protéine par amarrage à l'aide de trois paramètres d'amarrage différents (HTVS, SP, XP), afin de donner un aperçu de leur capacité de liaison au sein du récepteur.

Enfin, la prédiction in silico de la similitude médicamenteuse nous informe de manière positive sur les propriétés ADME de ces nouveaux composés proposés.

Mot clés : Tuberculose, inhibiteurs, Criblage virtuel, ADME.

Abstract

Nowadays, *in silico* methods are used more and more in the strategies for discovering new molecules for therapeutic purposes. During this research, we relied on the treatment of tuberculosis based on the inhibition of Enoyl ACP reductase.

In our work we are interested in the *in silico* study of enzymatic inhibition by virtual screening with Maestro-Schrödinger. This approach makes it possible to model the interactions between a protein and thousands of small chemical compounds. Initially, the ZINC chemical database molecules were filtered by the Lipinski rule of five to identify drug-like compounds. The resultant compounds were then docked into the protein by docking using three different docking parameters (HTVS, SP, XP), in order to give insights into their binding ability within the receptor. Finally, the *in silico* prediction of the similar drug positively informs us about the ADME properties of these new compounds

Keywords: Tuberculosis, inhibitor, virtual screening, ADME.

Chapitre III: Identification des nouveaux inhibiteurs de l'Enoyl ACP reductase

Tableau 1 : Les valeurs d'énergie d'interaction XP Glide Score (XPGS) des 5 hits et isoniazide.	38
Tableau 2: Interactions d'amarrage de 5 Top-scoring dans le site actif de InhA.	44
Tableau 3 : Propriétés ADME-Tox pour les 5 top-scoring.	45

Chapitre I : Méthode virtuel de criblage in silico

Figure 1: Etapes du processus de recherche et de développement des médicaments	3
Figure 2: Classification des méthodes de criblage virtuel	8
Figure 3 : Le criblage virtuel « ligand-based »	9
Figure 4 : Le criblage virtuel « structure-based »	10
Figure 5: Représentation schématique du docking de deux molécules	11
Figure 6: principe générale d'un programme de docking	11
Figure 5: Interactions électrostatiques	14
Figure 6: liaison hydrogène	15
Figure 7: Interaction de Van Der Walls	15
Figure 8: Interaction hydrophobe	15

Chapitre III: Identification des nouveaux inhibiteurs de l'Enoly ACP reductase.

Figure 1 : Interface de la chimiothèque ZINC (http://zinc.docking.org)	34
Figure 2. Interface de la Protein Data Bank (https://www.rcsb.org)	36
Figure 3 : Méthode de docking moléculaire.	37
Figure 4: Alignement moléculaire des 82 hits dans le site actif de InhA (2IE0).	38
Figure 5 : Interactions d'amarrage de 5 Top-scoring dans le site actif de InhA	43
Figure 6 : Interactions moléculaires l'isoniazid (INH) dans le site actif de InhA.	44

Chapitre III : Identification des nouveaux inhibiteurs de l'Enoly ACP reductase

Schéma 01: Etapes du protocole de criblage virtuel utilisé pour l'identification des nouveaux inhibiteurs de InhA. 33

Introduction générale



La tuberculose est une maladie infectieuse extrêmement contagieuse, causée essentiellement par le pathogène *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch. L'apparition du vaccin BCG au début du XXème siècle et des premiers antituberculeux dans les années 1950 ont permis de contenir la propagation de la maladie et même de réduire fortement le nombre de cas jusque dans les années 1980. Par la suite, l'épidémie du virus du SIDA ainsi que l'apparition de formes résistantes ont engendré une nouvelle recrudescence de la maladie.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déclaré la tuberculose comme problème de santé publique majeur au niveau mondial. L'OMS a recommandé un traitement administratif standard de 6 mois aux patients atteints de tuberculose avec une combinaison de quatre médicaments : isoniazide (INH), rifampicine (RMP), éthambutol (ETH) et pyrazinamide (PZA) [1, 2]. L'INH est le composé antituberculeux de première ligne confirmé comme inhibiteur de l'Enoyl-acyl carrier protein (ACP) réductase (InhA ; EC 1.3.1.9) [3].

De nos jours, un nombre énorme de composés chimiques sont disponibles dans diverses bases de données pour aider à la découverte des médicaments via le criblage virtuel tel que la chimiothèque ZINC [4]. Le terme criblage virtuel regroupe un ensemble de techniques computationnelles ayant pour objectif l'analyse de grandes bases de données de composés chimiques afin d'identifier des candidats médicaments, ce qui est considéré comme une étape complémentaire des approches expérimentales [5, 6].

Dans le présent travail, nous avons effectué un criblage virtuel basé sur la structure de la cible sur la base chimiothèque, afin d'identifier de nouvelles molécules à potentiels thérapeutiques ciblant l'Enoyl ACP réductase.

Le manuscrit est divisé en trois chapitres : Dans le premier chapitre nous avons effectué une recherche bibliographique représente un aperçu sur les principales stratégies de criblage virtuel, qui représente un moyen de plus en plus utilisé pour détecter *in silico* des inhibiteurs de cibles d'intérêt thérapeutique. Le second deuxième chapitre sera consacré à la présentation de la

maladie tuberculose. Le troisième chapitre présente l'application de la méthodologie de criblage virtuel par docking, pour identifier de nouveaux inhibiteurs de l'Enoyl ACP réductase. Enfin, nous terminerons ce manuscrit par une conclusion générale.

Références bibliographiques:

- [1] Nayak, N.; Ramprasad, J.; Dalimba, U., New INH – pyrazole analogs : Design, synthesis and evaluation of antitubercular and antibacterial activity. *Bioorg Med Chem Lett*, **2015**, *25*, 5540–5545.
- [2] Madhavaram, M.; Nampally, V.; Gangadhari, S.; et al., High-throughput virtual screening, ADME analysis, and estimation of MM/GBSA binding-free energies of azoles as potential inhibitors of Mycobacterium tuberculosis H37Rv, *J Recept Signal Transduct*, **2019**, *39*, 312–320.
- [3] Khade, AB.; Eshwara, VK.; Boshoff, HIM.; et al., Design, Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Dynamic Simulation Studies of Diphenyl Ether Derivatives as Antitubercular and Antibacterial Agents. *Struct Chem*, **2020**, 983–998.
- [4] Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S, et Coleman R.G. ZINC: un outil gratuit pour découvrir la chimie pour la biologie. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2012**, *52*, 1757-1768.
- [5] Walters W. P., Stahl M.T., Murcko M. A. A virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today*. **1998**, *3*,160-178.
- [6] Hou T., Xu X. Recent Development and Application of Virtual Screening in Drug Discovery: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*. **2004**, *10*, 1011-1033.

Partie I : bibliographique

Chapitre I :
Méthodes de criblage virtuel in silico



1-Drug discovery :

1-1 Histoire de la découverte des médicaments :

Par le passé, un grand nombre de médicaments ont été découverts tout simplement grâce à l'identification de principes actifs extraits de substances naturelles historiquement utilisées dans la médecine non-conventionnelle, ou même par hasard. Par la suite, les avancées dans le domaine de la synthèse chimique et de la pharmacologie ont conduit à une démarche de recherche systématique permettant l'élaboration de nouveaux médicaments de plus grande efficacité (1).

La découverte d'une molécule médicamenteuse « Drug discovery ». Le processus de recherche et de développement de nouveaux médicaments est extrêmement long et coûteux. Les différentes étapes sont illustrées schématiquement dans la (Figure 1) .Au cours des phases successives, des milliers de molécules doivent être triées et sélectionnées, afin d'obtenir un nombre très limité de candidats.

Pour chaque nouveau médicament, le temps passé depuis la première étape, au cours de laquelle une cible biologique pertinente dans un processus pathologique donné est identifiée, jusqu'à la mise sur le marché d'un composé tourne autour d'une moyenne d'environ 12 à 14 ans. Le coût global estimé est de 800 millions de dollars par composé mis sur la marche (2).

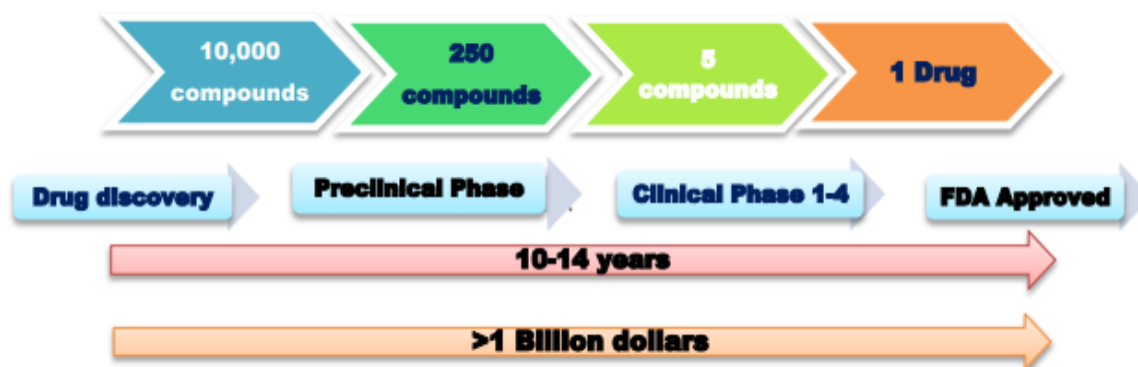


Figure 1: Etapes du processus de recherche et de développement des médicaments.

1-2 Choix d'une cible thérapeutique :

Le choix d'une cible thérapeutique revient à sélectionner, à l'aide de données issues de la littérature, une biomolécule (en général une protéine ou un complexe protéique) impliquée dans un certain processus pathologique. On estime que l'ensemble de médicaments sur le marché cible environ 500 molécules biologiques. Certaines familles de protéines sont plus représentées dans le génome humain, ou plus souvent impliquées dans des processus pathologiques, mais en contrepartie elles peuvent alors posséder un grand nombre de protéines homologues responsables d'effets indésirables. Certaines sont tout simplement plus aisées à cibler que d'autres, en particulier, il est plus facile pour une petite molécule de perturber la liaison d'un ligand endogène que des interactions protéine protéine. Ces paramètres régulent ce que l'on appelle la « drug gabilité » de la cible (3).

1-3 Identification de « hits » :

Après avoir identifié et choisi la cible thérapeutique, l'objectif est de moduler son activité afin d'altérer le processus pathologique. On appelle touches ou « hits » les composés capables de tels effets. L'approche la plus couramment utilisée dans la recherche de « hits » est le criblage (ou « screening ») de banques de petites molécules (ou chimio thèques). Un criblage peut être réalisé in vitro grâce aux techniques HTS permettant d'estimer l'affinité et activité de milliers de composés sur la cible d'intérêt. Cependant, la mise en œuvre de HTS n'est pas toujours possible du fait de leurs coûts importants et du temps nécessaire à leur exécution. Les criblages de type HTS et la validation pré-clinique des caractéristiques pharmacologiques des composés représenteraient 14% du budget de R&D de l'industrie pharmaceutique (4).

1-4 Génération et optimisation de « leads » :

A ce stade, parmi les hits précédemment choisis, quelques molécules se qualifient têtes de séries ou « leads ». Les leads idéaux sont des composés plus actifs et plus sélectifs que les hits dont ils sont issus, tout en présentant des propriétés pharmacocinétiques

optimales, qui vont ensuite permettre de créer des séries de composés ayant une activité démontrée sur la cible choisie. L'intervention des chimistes et des chimoinformaticiens est déterminante à cette étape pour obtenir ces leads, en effectuant de vastes études de relations structure-activité (SAR) basées principalement sur la variation et la modification des groupements fonctionnels tout en gardant leurs squelettes de bases des hits. L'analyse des résultats issus de ces études SAR sont actuellement assistés par des approches bioinformatiques, ce qui permet de guider la sélection de nouveaux leads en optimisant les propriétés favorables d'activité « drug-like » (activité, sélectivité, toxicité, propriétés physico-chimiques,...) tout en tentant d'améliorer l'affinité avec la cible et de prouver que l'effet biologique observé est bien induit par interaction du composé avec la cible (5).

1-5 Test précliniques :

La phase précliniques consiste à tester l'activité et la toxicité du candidat-médicament sur cellules et tissus puis sa biodisponibilité, son activité et sa toxicité sur animaux (propriétés ADME-tox: Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité). Ces tests permettent de déterminer les effets de la molécule sur les récepteurs cellulaires et les organes, la marge thérapeutique (dose toxique / dose efficace), ainsi que sa toxicité, aiguë et chronique (6).

1-6 Test cliniques :

Le passage de l'expérimentation animale à l'expérimentation humaine est une période cruciale de la vie d'un médicament, les essais chez l'homme étant fondamentaux pour apprécier l'intérêt thérapeutique d'un médicament. L'évaluation clinique vise à évaluer scientifiquement la valeur thérapeutique d'un médicament, c'est-à-dire à vérifier l'efficacité et l'innocuité d'une molécule chez l'être humain. En d'autre terme, il s'agit de connaître précisément le rapport entre le bénéfice attendu et le risque encouru lors de l'utilisation du médicament chez le patient. L'expérimentation humaine n'intervient que lorsque les études in

vitro et les études précliniques menées chez l'animal sont jugées satisfaisantes. Elle dure de 6 à 8 ans et se décompose en 3 grandes phases (7).

1-5-1 La phase I :

La phase I des essais cliniques se déroule sur un faible nombre de volontaires sains pour s'assurer de la sécurité du candidat médicament en recherchant les effets secondaires qui apparaissent lors de l'administration croissante du candidat médicament. Généralement, 70 % des composés testés passent avec succès cette première phase.

1-5-2 La phase II :

La phase II est la première étape où l'on administre le candidat médicament à des patients, dont l'ordre de grandeur est de quelques centaines. Le but est d'évaluer la réelle efficacité de la molécule ainsi que les doses minimales efficaces - et donc la marge thérapeutique vis-à-vis des résultats obtenus à la phase précédente - tout en répertoriant l'apparition éventuelle de nouveaux effets secondaires

1-5-3 La phase III :

La phase III est conceptuellement similaire à la phase précédente : il s'agit à nouveau d'administrer la molécule à un groupe de patients. Ici, le nombre de personnes est sensiblement plus important, de l'ordre de quelques milliers. Des malades ayant des profils ethniques variés est également souhaitable pour être le plus proche possible de la réalité. Cette phase permet de confirmer la sécurité et l'efficacité du candidat médicament sur la pathologie ciblée. Une comparaison par rapport à un panel de molécules concurrentes déjà présentes sur le marché est également entreprise, notamment pour pouvoir estimer le service médical rendu par le candidat (8).

1-5-4 La phase IV :

Cette phase relativement récente (également appelée pharmacovigilance) consiste à surveiller, à travers le réseau de médecins et après la mise sur le marché de la molécule, l'apparition d'effets indésirables non détectés précédemment (9).

2 Méthodes de criblage virtuel in silico :

Le terme criblage virtuel regroupe un ensemble de techniques computationnelles ayant pour objectif l'exploration de bases de composés à la recherche de molécules d'intérêt. Une analogie souvent utilisée compare ces techniques à des filtres qui permettraient de constituer des ensembles de molécules partageant certaines propriétés, de sélectionner les plus susceptibles d'interagir avec une cible donnée et d'éliminer les composés supposés inactifs ou les molécules indésirable.

Ces différentes méthodes de criblage virtuel peuvent ainsi être utilisées dans les premières phases de R&D de nouveaux médicaments par les chimistes (Figure 2) (5) et en particulier lors de l'identification de hits. Il a alors pour but de sélectionner au sein de chimiothèques variées des ensembles réduits de molécules dont le potentiel d'activité envers la cible thérapeutique visée est supérieur à celui des autres molécules. Il peut également être utilisé lors de l'optimisation des leads. Dans ce cas, le criblage a pour objectif l'identification de motifs structuraux essentiels dans la liaison ligand-récepteur, et la discrimination des meilleurs composés au sein de chimiothèques orientées comprenant des molécules appartenant à une même série.

On regroupe les méthodes in silico en deux grandes familles, le criblage virtuel «structure-based» et le criblage virtuel «ligand-based». Comme son nom l'indique, le criblage virtuel «structure-based» est basé sur la structure de la cible en évaluant la capacité des ligands à établir des interactions avec le site de liaison étudié et ainsi sélectionner les molécules capables de se lier à cette cible (10).

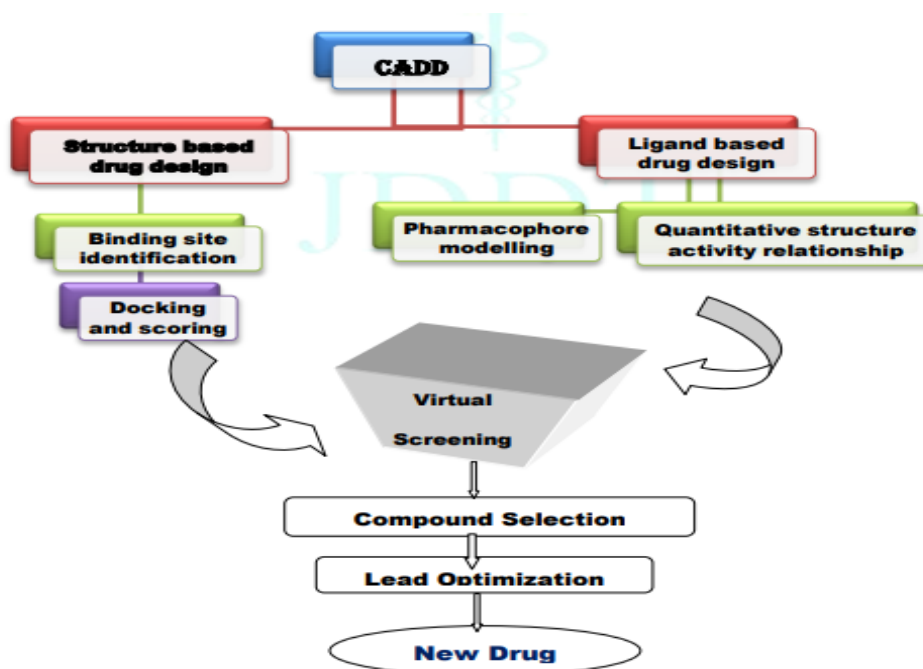


Figure 2: Classification des méthodes de criblage virtuel.

2-2 Criblage virtuel «ligand-based»:

Les méthodes de criblage «ligand-based» (Figure 3) reposent sur la connaissance préalable de ligands ayant une activité sur la cible thérapeutique. Il sera ainsi possible d'utiliser ces ligands comme une première base de «hits» afin d'identifier d'autres composés similaires, présentant des caractéristiques d'activité communs aux ligands connus de la cible. Différents types de descripteurs moléculaires pourront être calculés pour quantifier la similitude entre composés. Suivant le nombre de ligands connus de la cible thérapeutique, plusieurs méthodes peuvent être employées: la recherche de similarité, le criblage de pharmacophores, ou les approches QSAR (11).

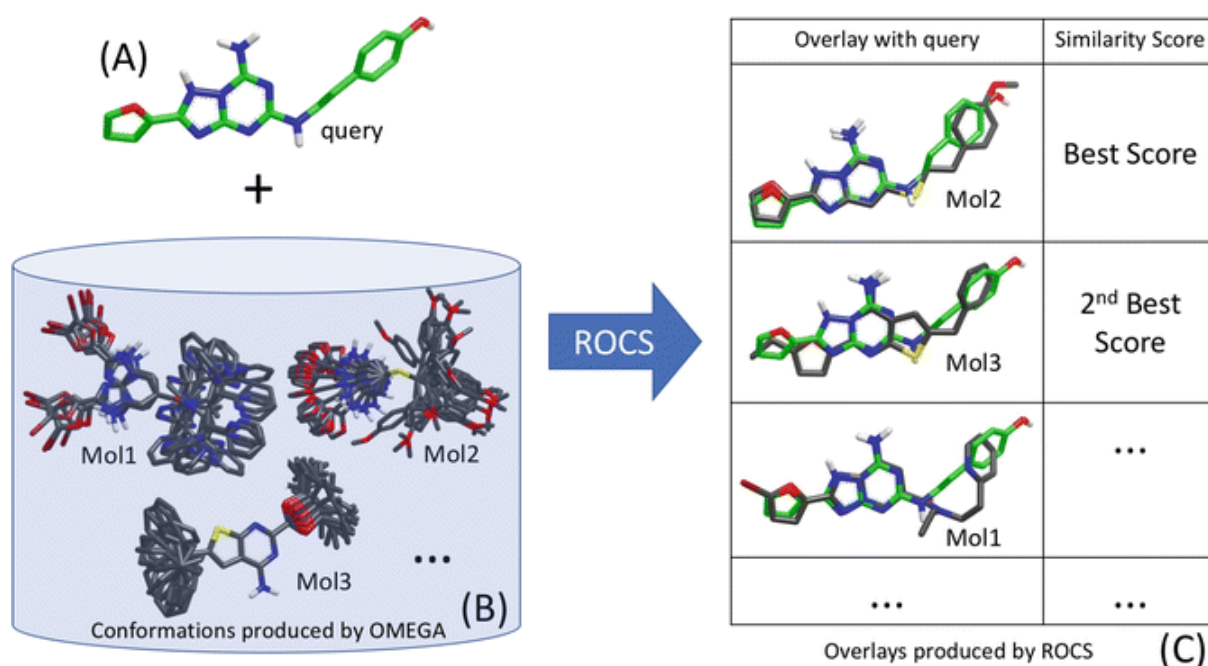


Figure 3 : Le criblage virtuel « *ligand-based* ».

Schéma de base de la recherche de similarité de forme basée sur un ligand 3D : une molécule de requête (A) dans une ou plusieurs 3D conformations est comparée à chaque conformère de chaque molécule dans une base de données pré-générée de conformations (B). La superposition optimisée entre le meilleur conformère unique de chaque molécule de base de données et chaque la conformation de la requête est rapportée avec un score de similarité (C)

2-2 Criblage virtuel «structure-based»:

Le criblage virtuel « structure-based » (Figure 4) est considéré comme un équivalent in silico d'un test expérimental étudiant la liaison ligand-cible biomoléculaire. Cependant, ce criblage dépend essentiellement de la disponibilité de la structure 3D de la cible biologique qui est obtenue, soit par méthodes expérimentales (RX et RMN) dans des bases de données (tel que PDB: Protein Data base), soit par des méthodes de prédiction de la structure 3D par homologie de séquence (12). Différentes approches peuvent être employées pour réaliser ce criblage: la construction de modèles pharmacophoriques 3D, l'établissement de modèles 3D-QSAR), la conception de novo « de novo design » et les méthodes de docking moléculaire qui sont les plus populaires. (13).

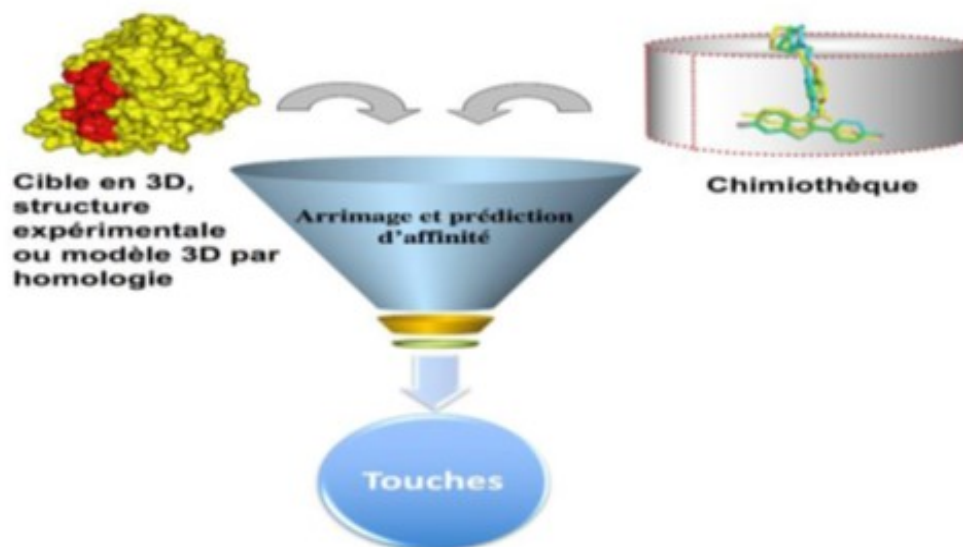


Figure 4 : Le criblage virtuel « *structure-based* »

3 Le docking ou l'amarrage moléculaire

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques. Connaître la façon dont les protéines interagissent avec d'autres entités biochimiques est une étape essentielle pour comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées. Le docking moléculaire in-silico a pour but de prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales in vitro (14). Il est étude des interactions non-liantes intervenant lors de la formation de complexes (Figure 5) moléculaires telle que : les interactions VDW, les interactions électrostatiques, les interactions Hydrogènes (15). Le plus souvent, le récepteur est une protéine qui possède un ou plusieurs sites actifs spécifiques, plus ou moins accessibles selon les cas. Le ligand est généralement une molécule flexible étrangère de petite taille. La liaison entre le ligand et le récepteur introduit un signal biologique qui peut avoir diverses formes (16).



Figure 5: Représentation schématique du docking de deux molécules.

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes: le docking proprement dit et le scoring (Figure 6).

✚ Le Docking (la première étape) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.

✚ Le Scoring (la deuxième) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées (17).

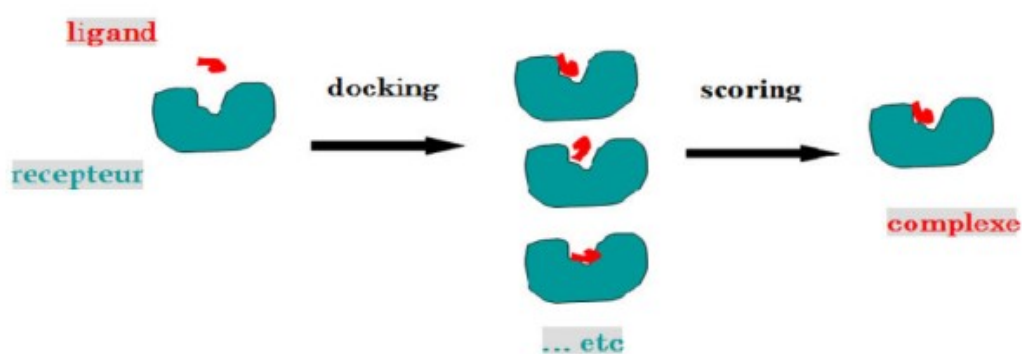


Figure 6: principe générale d'un programme de docking.

3-2 Type de docking moléculaires

3-2-1 Docking rigide

Dans le cas des méthodes de docking rigide, la recherche de la pose optimale se limite au positionnement. Cette opération consiste en la recherche exhaustive dans l'espace

discrétisé des 6 degrés de liberté. Certains programmes, s'ils n'appartiennent pas à la famille des techniques de docking rigide, utilisent plusieurs étapes successives d'optimisation dont les premières peuvent s'apparenter à du docking rigide. Par exemple, le programme Glide, utilise initialement, dans son approche multi-étapes, une recherche systématique pour positionner le ligand de façon approchée au sein du site actif de la protéine (18).

3-2-2 Docking flexible

Lorsque les méthodes de docking prennent en compte la flexibilité du ligand, deux étapes sont effectuées successivement pendant toute la durée du docking. La première étape correspond à une exploration de l'espace conformationnel de manière à retrouver, parmi les conformations proposées, la conformation bioactive. Pendant la deuxième étape une fonction de score évalue ces conformations. Il existe plusieurs types d'algorithmes pour le traitement de la flexibilité du ligand : les méthodes systématiques (fragmentation/reconstruction), les méthodes aléatoires, et les méthodes de simulation (dynamique moléculaire) (19).

3-2-3 Docking semi-flexible

Lorsque l'espace conformationnel des ligands est exploré, le nombre de degrés de liberté de l'espace de recherche peut être conséquent dans le cas de molécules très flexibles. Dans un tel contexte, l'emploi de méthodes de recherche exhaustives apparaît souvent inapproprié car nécessitant des simplifications importantes au niveau de l'échantillonnage. D'autres algorithmes, dits de fragmentation, sont employés pour construire de façon incrémentielle le ligand au sein du site actif de la protéine. L'espace des conformations du ligand est alors restreint au voisinage d'un ensemble initial d'états simplifiés. Cette stratégie de recherche par construction, qui se présente sous diverses variantes, est notamment adoptée par les programmes DOCK, FLEXX, et Hammerhead (18).

3-3 Le processus de scoring

Les méthodes de “scoring” sont utilisées pour estimer mathématiquement l’affinité de liaison entre un récepteur et chacune des poses générées pendant le docking. L’efficacité de ces fonctions de score est au moins tout aussi importante que celle des algorithmes de recherche conformationnelle (20). L’utilisation des fonctions de scoring est double. Tout d’abord, elles permettent de déterminer la conformation qui représentera au mieux le ligand concerné. Cette conformation est appelée première pose. L’autre utilisation des scores est de pouvoir classer les premières poses de chaque ligand afin d’établir un classement final des molécules les plus prometteuses (21).

3-3-1 Familles de fonctions de score

Les fonctions de scoring peuvent être classées dans deux grandes catégories: les fonctions empiriques et les fonctions basées sur la connaissance (encore appelées «knowledge-based»). Ces deux classes de fonctions sont basées sur un ensemble de complexes ligand-protéine (22).

3-3-1-1 Fonctions de score empirique

Ce type de fonction de score approxime l’énergie libre de liaison en sommant de façon pondérée différents termes d’interaction dérivés de paramètres structuraux. Les différents poids de la fonction de score sont ajustés pour reproduire en priorité des données expérimentales, telles que les constantes de liaison tirées d’un jeu d’entraînement de complexes protéine-ligand. La plupart des programmes de docking implémentent ce type de fonction de score témoignant de leur efficacité (en termes de rapport précision/rapidité). Cependant, le principal inconvénient de ces fonctions empiriques est leur forte dépendance aux données utilisées pour les calibrer qui, en cas de mauvaise paramétrisation, peut limiter leur transférabilité sur des systèmes différents. Parmi les principales fonctions de score empiriques, on peut citer : ChemScore, PLP, et LigScore (23).

3-3-1-2 Les fonctions de type knowledge-based

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexe ligand protéine déterminés de manière expérimentale. Des règles définissant la géométrie préférentielle, des interactions sont déduites de ces structures grâce à des moyens statistiques. Cette alternative aux fonctions empiriques est plus tolérante quant aux interactions présentes au sein du complexe. Leurs expressions sont moins strictes que dans le cas des fonctions empiriques. La fonction PMF fait partie de cette classe de fonction (22).

3-4 Les interactions protéine-ligand

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Cette association est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles (24).

✚ **Les interactions électrostatiques:** Certains acides aminés peuvent être chargés positivement ou négativement, ce qui donne lieu à des interactions électrostatiques. Ces interactions électrostatiques agissent à "longues" distances (autour de 10 Å), entre des groupes d'atomes électriquement chargés (Figure 5) (25).

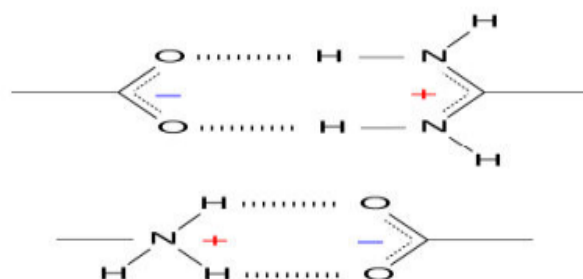


Figure 5: Interactions électrostatiques.

✚ **La liaison hydrogène :** une liaison hydrogène résulte de l'interaction électrostatique entre un atome d'hydrogène (H), lié par covalence à un atome électronégatif (O, N, S) (donneur) et un deuxième atome électronégatif possédant une paire d'électrons non partagée (accepteur) (26).



Figure 6: liaison hydrogène.

✚ Les interactions de Van Der Walls : Ce sont des interactions entre atomes, molécules, ou entre une molécule et un cristal. Ces interactions Van Der Waals s'appliquent à très courte distance et ne concernent donc que les atomes de surface .Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice (27).

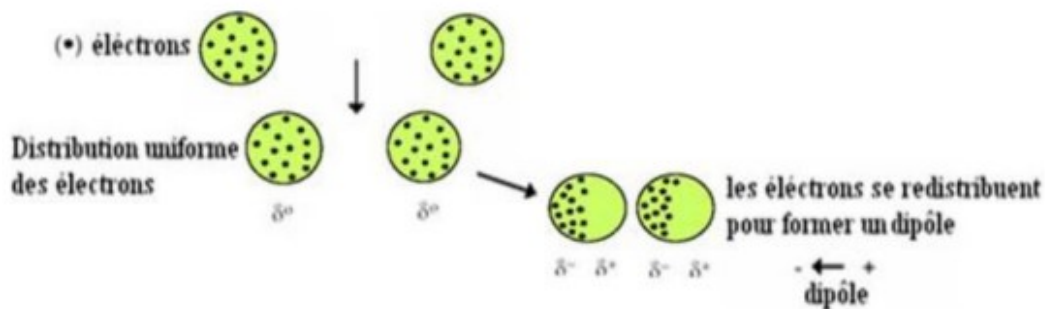


Figure 7:Interaction de Van Der Walls

✚ Interactions hydrophobes : Les acides aminés dont le radical est hydrophobe et apolaire ont la propriété d'empêcher la formation des liaisons hydrogène entre les molécules d'eau. Ils forment dans la structure des protéines des zones hydrophobes où les molécules d'eau ne peuvent échanger aucune liaison avec les radicaux d'acides aminés (28).

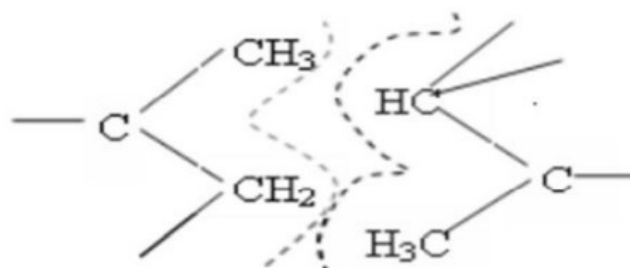


Figure 8: Interaction hydrophobe.

4 Filtrage par ADME –TOX

L'abréviation ADMET représente les concepts pharmacocinétiques suivants : l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion. Ce sont des critères qui décrivent la disposition d'une molécule bioactive dans un organisme. Ils expriment les concentrations du produit dans les différents tissus et système circulatoire de l'organisme. Les résultats obtenus par ces critères permettent d'analyser la performance et l'efficacité d'un produit afin de juger sa capacité à devenir un médicament et son intérêt à poursuivre son développement pour des études cliniques (29).

Les filtres de type ADME-Tox (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité) sont rapidement devenus populaires. Ils reposent sur plusieurs critères déterminant les propriétés pharmacocinétiques potentielles des molécules et sont désormais largement utilisés pour réduire le nombre de composés d'une chimio thèque en sélectionnant les plus adaptés à devenir des candidats médicaments, avant tout processus de criblage. L'utilisation de ces filtres a donné de très bons résultats (4).

Absorption : Cela consiste à analyser la faculté d'une molécule à pénétrer au sein de l'organisme après administration. Une faible solubilité (par exemple due à une trop grande hydrophobicité) ou une forte polarité ont un impact drastique sur l'absorption intestinale d'un composé.

Distribution : Ce critère mesure la capacité d'une molécule à diffuser, par exemple via le flux sanguin, à travers l'organisme. En effet, une molécule doit pouvoir passer d'un compartiment à un autre, afin de pouvoir arriver in fine à l'endroit où sa cible doit être atteinte. La forte liaison à des protéines plasmatiques a un impact négatif sur la distribution d'une molécule.

Métabolisme : Le filtre métabolisme vise à détecter (a) la stabilité de la molécule dans l'organisme qui impacte sur son temps d'action et (b) les métabolites de la molécule initiale, à

savoir les composés résultant de sa dégradation ou de modifications enzymatiques ayant lieu au sein de l'organisme. Chez l'homme, les cytochromes P450 du foie sont les principales enzymes modifiant les xénobiotiques.

Ces derniers sont notamment rendus plus hydrophiles par l'introduction d'atomes d'oxygène. Les métabolites peuvent être inactifs, plus actifs que le composé original et bien entendu potentiellement toxiques, d'où la nécessité de les caractériser et de les étudier.

Excrétion (élimination) : Afin d'éviter les phénomènes d'accumulation, souvent synonyme de toxicité, il faut veiller à ce que les composés administrés, ainsi que leurs métabolites, soient bien excrétés de l'organisme, par exemple via l'urine ou les selles (7). Toxicité Comme son nom l'indique, ce filtre sert à mesurer la toxicité d'un composé et de ses métabolites. Désormais, la toxicité et le manque d'efficacité des candidats médicaments sont les deux plus grandes causes d'échecs dans le développement d'un médicament. Différents types de toxicité sont évalués, entre autre la cancérogénicité (30).

Un contributeur majeur dans le domaine permettant d'identifier rapidement et à grande échelle des molécules à caractère « drug-like » est communément appelées « règles de Lipinski » ou « la règle de 5 » permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Ces règles concernant les propriétés physico-chimiques ont été définies après l'analyse de 2245 médicaments commercialisés ou en phase finale de développement (31).

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da).
- Le logarithme décimal du coefficient de partage eau / 1-octanol, noté logP, doit être inférieur à 5.
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 5.
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 10.

D'autres critères ont été mis en place pour compléter et ajuster les règles de Lipinski dans la sélection de composés « drug-like ».

Ainsi, Veber Choisissent d'utiliser critères suivants la surface polaire (PSA, polar surface area) du composé doit être inférieur à 140 Å² et le nombre de liaisons de rotation ("rotatable bonds" en anglais) doit être inférieur à 10 Sont souvent employés en complément de la « règle des 5 » Ces critères ont été établis par l'étude de la biodisponibilité orale candidats médicaments (32).

Références Bibliographiques

- (1) J.G. Lombardino, J.A. III Lowe. (2004). The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now, *Nat Rev Drug Discov.* 3, 853– 862
- (2) Mlle LAOUD Aicha. (2018). Développement de nouveaux inhibiteurs de l' α -glucosides à partir de molécules d'origine naturelle : étude 3D-QSAR et criblage virtuel, thèse de doctorat, université ANNABA.
- (3) JUDITH ELKAÏM. (2011). Drug design in silico criblage virtuel de protéines à visée thérapeutique. thèse de doctorat. Université de bordeaux 1,
- (4) Charly EMPEREUR-MOT. (2017). Développement d'outils statistiques d'évaluation de méthodes de criblage virtuel : courbes de prédictivité & Screening Explorer. Thèse de doctorat. ÉCOLE DOCTORALE Sciences des Métiers de l'Ingénieur.
- (5) Mme LAKEHAL Saoussene. (2016). Etude docking et synthèse de dérivés de xanthone : voie d'accès à de nouveaux inhibiteurs de l' α -glucosidase. thèse de doctorat. Université BADJI MOKHTAR ANNABA.
- (6) Laurent HOFFER. (2013). Développement et validation du logiciel S4MPLE. Application au docking moléculaire et à l'optimisation de fragments assistée par ordinateur dans le cadre du Fragment-Based Drug Design. Thèse de doctorat. Ecole doctorale des sciences chimiques .Université de Strasbourg.
- (7) Véronique MALLO. (2015). Sous-traitance et développement pharmaceutique d'un médicament : application à la conception d'un comprimé à croquer, diplôme d'état de docteur en pharmacie, Collège sciences de la sante université de bordeaux.
- (8) Hubbard, R.E. (2005). 3D structure and the drug-discovery process. *Mol. BioSyst.* 1: p. 391-406.
- (9) Nathalie LAGARDE, (2014). Méthodes de criblage virtuel in silico : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6. Thèse de

doctorat du conservatoire national des arts et métiers. Ecole doctorale Abbé Grégoire
Laboratoire Génomique, Bioinformatique et Applications.

(10) T. Tuccinardi, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2009, 12, 303-314

(11) Farouk CHIBAT et Abdelaziz GUECHIRI.(2015). Contribution à la mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase par docking moléculaire. Mémoire de Master Université des Frères Mentouri Constantine.

(12) B. S. Cummings, *Biochem. Pharmacol*, 2007, 74, 949-959

(13) D. J. Diller and R. Li, *J Med Chem*, 2003, 46, 4638-4647

(14) Abdallah Chaouche Med Larb, (2014). Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des alcaloïdes dans l'inhibition de la télomérase par docking moléculaire. Mémoire de Master 2. Université Constantine 1.

(15) MERZOUG Amina, (2012), Étude in silico de l'inhibition de la peptide déformylase, thèse de magistère. Université Mentouri Constantine.

(16) BOUTRIF Chams Eddine, MERDASSI Abderraouf, (2014) .Etude in silico de La 5-lipoxygénase en tant qu'enzyme impliquée dans les Maladies inflammatoires, mémoire de Master en Biochimie. Université Constantine 1.

(17) Melle EL HADJ SAID kenza. (2016). Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire, mémoire de master en chimie. Université de Tlemcen.

(19) Alexandre Beautrait, (2008) développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine fat de la kinase d'adhérence focale FAK, thèse doctorat en Chimie Informatique et théorique. Université Henri Poincaré.

(20) Ayaz Mahmood Dar, and Shafia Mir. *Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges*. *J Anal Bioanal Tech* 2017.

- (21) MERZOUG Amina. (2018). Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptidase déformylase. Thèse de doctorat. Université des FRERES MENTOURI - CONSTANTINE 1.
- (22) Gohlke H., Klebe G. 2002. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 41 (15), 2644-2676
- (23) Alban ARRAULT, (2007). Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat. Université D'ORLEANS.
- (24) ALMI Imen. (2016). Contribution à l'étude du Pharmacophore d'une série de dérivés de nitro benzoxadiazole, sont des inhibiteurs de glutathione-S-transferase P1-1(GSTP). Mémoire en Master 2. Université Med Khider Biskra.
- (25) Salpin F. (2008). « laine et colorants : fixation, quantification et vieillissement. Étude par spectrométrie Roman ». Thèse de doctorat : Université Pierre et Marie Curie.
- (26) Mme BOUDGHENE. (2013). Etude de l'Interaction Protéine-Protéine par modélisation moléculaire. Application aux Processus Biologiques. Thèse doctorat. Université abou bekr belkaid TLEMEN.
- (27) Teniou S. (2012). Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Magt : Technologie des Explorations Biochimiques : Université Mentouri Constantine.
- (28) SALAHI DEHBIA. (2014) Modélisation de la structure d'une protéine impliquée dans le cancer et de ses interactions avec quelques ligands. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzo.
- (29) Patrick Darveau, (2018) .Étude des propriétés des dendrimères pour le transport de molécules bioactives .université Québec, Canada.

(30) Wang, J. M.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* 2004, 25, 1157-1174.

(31) Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 46 (1-3) :3–26.

(32) Corinne HAZAN, (2008). Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de L'ADN polymérase BETA par criblage virtuel et RMN. Thèse de doctorat. Université Toulouse III,

Chapitre II:
Notions générales sur la Tuberculose



1- Définition de la Tuberculose:

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à l'être humain et à de nombreuses espèces animales. Elle est causée par divers espèces bactériennes appartenant au complexe tuberculosis du genre *Mycobacterium*, mais plus fréquemment à l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ou Bacille de Koch (BK) dont il existe 3 variétés: *hominis*, le plus fréquent, *bovis* et *africanum*.

La TB atteint les poumons le plus souvent, mais peut toucher d'autres organes et être disséminée dans la quasi-totalité de l'organisme. A travers l'histoire elle a pris plusieurs nomenclatures. En effet, Aux XVIIème et XVIIIème les grecs et latins la nommaient, respectivement, « phtisie » et « consommation », en comparaison à un feu intérieur qui brûlait les viscères qui se manifeste par un amaigrissement excessif (1). Cependant, ce n'est qu'en 1839 que le nom « tuberculose » fut employé pour la première fois par Johan Schönlein, décrivant l'aspect anatomique des lésions inflammatoires, fermes et arrondies, comparables à des tubercules de pommes de terre (2).

2- Histoire de la maladie:

2-1 Origine de la maladie :

✓ Le bacille de la tuberculose a existé il y a 15000 à 20000 ans. On l'a trouvé en reliques d'Egypte antique, d'Inde, et de Chine. Parmi la tuberculose spinale de momies égyptiennes, connue sous le nom de maladie de Pott a été trouvé par des archéologues (3).

✓ En 2400 Avant J.C: première reconnaissance officielle de l'existence de la tuberculose.

✓ En 460 avant J.-C., Hippocrate identifiait la phtisie (mot grec signifiant «consommation») comme étant la maladie la plus répandue à cette époque et qu'elle est presque toujours mortelle (3).

2-2 La découverte de la tuberculose :

- ✓ En **1546**: Girolamo Tracastoro était le premier à expliquer dans son livre « De Morbis Contagiosis» que la tuberculose était contagieuse et que cette contamination ne se transmettait pas seulement du malade mais aussi à partir des habits et de la literie de ce dernier.
- ✓ En **1679**: Séylvius de la Boe en Hollande a eu à établir le lien causal entre les symptômes et la maladie.
- ✓ En **1810**: Carmichael publiait que la tuberculose bovine se transmettait à l'homme par la consommation de la viande ou du lait infecté.
- ✓ En **1865**: Jean Antoine Villemin fournissait les preuves expérimentales de la transmission de la tuberculose entre l'homme et l'animal (bovin, lapin).
- ✓ En **1882**: Robert Koch que devait revenir le mérite de la découverte du bacille, Il établissait d'une façon définitive l'étiologie bactérienne de la tuberculose et démontrait que le Bacille spécifique existe dans les crachats de tous les phthisiques et dans toutes les excréctions provenant de l'homme et l'animal tuberculeux. Enfin il fournissait la preuve que ce microbe pouvait être décelé facilement là où il existait grâce aux artifices de coloration, Dès lors ce bacille est appelé Bacille de Koch (BK) ou *Mycobacterium tuberculosis*. Pour Koch, la maladie chez l'homme et l'animal était causée par le même organisme.
- ✓ En **1898**: Theobald Smith fit la distinction entre *M. bovis* et *M. tuberculosis* sur la base de leurs caractéristiques culturelles in vitro et l'étude de leur virulence. Avec la découverte de l'agent causal, la lutte contre la maladie pouvait réellement commencer (4).

2-3 Vaccin pour la tuberculose :

- ✓ En **1921**: Mise au point du vaccin contre la tuberculose : le BCG, par A. Calmette et Camille Guérin.
- ✓ En **1950**: Le BCG est rendu obligatoire (5).

2-4 Diagnostique de la tuberculose :

- ✓ En **1883**: Ziehl et Neelsen mettent au point la coloration du bacille tuberculeux par la fuchsine phéniquée, cette coloration du B.K résiste à la décoloration par l'acide et l'alcool (6).
- ✓ En **1890**: description de l'Intradermo Réaction (IDR) par R. Koch (5).
- ✓ En **1896**: Bouchard décrit les premières applications des rayons X sur l'étude de la tuberculose pulmonaire (7).
- ✓ En **1998**: Le génome complet de *Mycobacterium tuberculosis* est séquencé (8).

2-5 Traitement anti-tuberculeux :

- ✓ En **1944**: Le traitement de la tuberculose par les antibiotiques a été effectif grâce aux travaux de Selman A. Waksman qui a purifié la streptomycine à partir du *Streptomyces griseus*. Cependant cette monothérapie à la streptomycine a rapidement engendrée des mutants résistants ce qui suscitera la mise au point de nouveaux antibiotiques.
- ✓ En **1949**: Isoniazide.
- ✓ En **1952**: Pyrazinamide.
- ✓ En **1954** : Cyclosérine.
- ✓ En **1955**: Ethambutol.
- ✓ En **1962**: Rifampine ou Rifampicine (4).

3- Les différents types de la tuberculose :

3-1 La tuberculose extra-pulmonaire :

A partir d'une localisation pulmonaire initiale (primo-infection), *M. tuberculosis* peut essaimer dans l'organisme au cours d'une phase silencieuse (via les systèmes lymphatique et sanguin, créer de nouveaux foyers infectieux et provoquer une tuberculose extra-pulmonaire), en générale au début de l'infection. Une TB évolutive peut donc se développer au niveau de nombreux autre organe en dehors des poumons, en particulier ganglions lymphatiques, méninges, vertèbre, articulation, reins, peau, miliaire, génitaux et cavité abdominale.

Les formes EP peuvent survivre à tous âges. Les jeunes enfants et les patients infectés par le VIH sont plus susceptibles de développer une TBEP.

Ces affections présentent des caractéristiques cliniques variées. Toutefois, leurs caractéristiques communes sont : une évolution s'accompagnant d'une altération de l'état général et l'absence de réponse aux traitements symptomatiques ou anti-infectieux non spécifiques (9).

La Tuberculose miliaire résulte d'une dissémination hémotogène diffuse des mycobactéries, reste l'une des formes les plus graves et de pronostic réservé, même sous traitement adéquat, atteignant non seulement les deux poumons, mais encore tous les principaux viscères (10).

3-2 La tuberculose pulmonaire

Désigne tout cas de tuberculose confirmé bactériologiquement ou diagnostiqué cliniquement dans lequel le parenchyme pulmonaire ou l'arbre trachéo-bronchique est touché (11).

3-2-1 Mode de transmission et développement

La transmission du bacille est interhumaine et s'effectue essentiellement par voie aérienne. La source de l'infection est un patient ayant une TB pulmonaire (TBP) ou laryngée, qui expectore des bacilles. En toussant, en parlant ou en éternuant, le patient produit de fines gouttelettes infectieuses. Elles peuvent rester en suspension dans l'air pendant plusieurs heures, selon l'environnement. La contamination se produit lors de l'inhalation des gouttelettes infectieuses. La lumière solaire, les rayons UV et la ventilation sont des moyens efficaces de décontamination de l'environnement.

La contagiosité d'un patient est liée à la quantité de bacilles présents dans ses crachats. Les patients positifs à l'examen microscopique direct des crachats sont de loin les plus contagieux. Ceux positifs à la culture mais négatifs à l'examen microscopique sont moins

contagieux. Les patients dont la microscopie et la culture de crachats sont négatifs ne sont habituellement pas contagieux.

Les patients souffrant de primo-infection ne sont pas contagieux. Les cas de TB extra pulmonaire (TBEP) ne le sont qu'exceptionnellement. En général, les enfants sont moins contagieux que les adultes, probablement parce qu'ils toussent peu, produisent peu de crachats et ont une charge bacillaire plus faible.

On estime qu'un patient atteint de TB à frottis positif non diagnostiquée et non traitée contamine 10 à 20 personnes par an (avec des variations selon le style de vie et l'environnement) (9).

3-2-2 Primo-infections

La primo-infection se produit lors de la première exposition à *M. tuberculosis*. Les gouttelettes (contenant *M. tuberculosis*) sont si fines qu'elles échappent aux défenses du tapis mucociliaire des bronches et se logent dans les alvéoles terminales des poumons (12).

Les bacilles de Koch peuvent rester latents dans l'organisme pendant des semaines, des années voire des décennies sans provoquer de symptômes, ni de maladie.

En effet, si le système immunitaire de la personne infectée est suffisamment résistant, il empêche que les microbes se réveillent, se multiplient et provoquent la tuberculose maladie. C'est la primo-infection. A ce stade, la personne infectée ne présente aucun symptôme et n'est pas contagieuse. (3)

A/ Primo-infection de forme latente

Les seuls symptômes sont les réactions cutanées à la tuberculine qui, de négatives, deviennent positives, traduisant ainsi l'apparition de l'allergie tuberculinique. Dans la forme latente, un examen clinique ne découvre aucun signe général, physique, biologique, radiologique ou bactériologique. Et ce n'est qu'après une surveillance au moins clinique,

aidée au besoin d'examens répétés (radiographiques en particulier) que l'on peut parler de tuberculose latente et s'abstenir de traiter.

B/ Primo-infection de forme patente

En plus des réactions cutanées à la tuberculine, elle s'accompagne des signes et des perturbations souvent discrets.

L'infection tuberculeuse induit des modifications biologiques et des lésions histologiques. Le « chancre d'inoculation » est la lésion qui répond au premier contact de l'organisme avec le BK, à l'inflammation non spécifique succède une infiltration, puis un nodule, pouvant évoluer vers la nécrose caséuse qui, dans le meilleur des cas, s'enkyste et parfois se calcifie sans que le BK puisse essaimer (3).

3-2 -3 Tuberculose active

La tuberculose post-primaire peut se déclarer plusieurs années après la primo-infection, par suite de la réactivation d'une infection tuberculeuse latente. Il peut s'agir d'une réaction à un facteur déclencheur, comme un affaiblissement du système immunitaire dû à une infection par le VIH. La réaction immunitaire du malade entraîne une lésion pathologique qui est généralement localisée, s'accompagnant souvent d'une destruction du tissu pulmonaire et de la formation de cavernes.

La tuberculose touche en général les poumons (80-85%), mais peut s'attaquer à n'importe quelle partie de l'organisme. Les caractéristiques de la TBP post-primaire sont une destruction étendue des poumons avec la présence des cavernes, et des cultures et/ou frottis d'expectoration positifs. Cette forme de tuberculose est souvent beaucoup plus contagieuse que la primo-infection tuberculeuse (13).

Les sujets immunodéprimés, transplantés ou surtout infectés par le VIH ont un risque élevé de développer une tuberculose active. Leurs défenses immunitaires sont incapables de limiter la réactivation des bacilles viables au niveau des lésions de primo-infection (14).

On définit ainsi les groupes à risque :

- Groupes socio-économiques défavorisés
- Populations étrangères pour lesquelles, à pourcentage comparable, l'incidence tuberculeuse est trois à quatre fois plus forte.
- Anciens tuberculeux de l'ère pré anti biothérapeutique n'ayant pas reçu de chimiothérapie spécifique.
- Personnels soignants très exposés au cours de leurs activités professionnelles au sein d'établissements contaminés.
- Les exclus sociaux (fréquence de l'intoxication tabagique, alcoolique).
- Les sujets séropositifs pour le VIH.
- Les immunodépresseurs divers : néoplasie, hémopathie, traitements à base de cortisone, immunodépresseurs, transplantations d'organes.
- Les sujets dialysés chroniques ; et les diabétiques.
- Les toxicomanes et les détenus (8).

4- Traitement de la tuberculose maladie

Le traitement de la tuberculose est basé sur l'application d'une chimiothérapie basée sur l'association de plusieurs antibiotiques antituberculeux. La durée de cette chimiothérapie a considérablement diminué depuis 1960 ; initialement de 18 à 24 mois, elle est actuellement de 6 à 8 mois et constitue « la chimiothérapie de courte durée ». Les médicaments antituberculeux essentiels sont au nombre de cinq : Isoniazide, Rifampicine, Pyrazinamide, Streptomycine, Ethambutol. Le thioacétazone est classé dans la liste complémentaire des médicaments essentiels. Aucun d'entre eux n'est suffisamment efficace pour détruire tous les bacilles tuberculeux se trouvant chez un malade ; c'est pourquoi l'association de plusieurs médicaments antituberculeux est indispensable pour obtenir la guérison définitive d'un malade (15).

4-1 Traitement de la tuberculose latente

Lorsqu'une tuberculose latente (primo-infection) est mise en évidence chez un patient, un traitement prophylactique peut être proposé. Cette décision de chimio-prophylaxie est une mesure individuelle qui doit viser tout particulièrement les jeunes enfants, les adolescents, les sujets immunodéprimés, et les individus ressèment contaminées. Le traitement prophylactique classiquement recommandé est l'isoniazide en monothérapie, à la dose de 5 mg/kg par jour pendant 6 mois. Ce traitement permet, chez l'immunocompétent, de réduire l'incidence de la tuberculose-maladie de 50 à 65 %. Parfois, une bithérapie (isoniazide et rifampicine ou rifampicine et pyrazinamide) est prescrite pendant 3 mois. L'administration d'un traitement prophylactique ne peut se faire qu'après avoir vérifié l'absence d'une maladie tuberculeuse par radiographie pulmonaire et examen bactériologique. En effet, si un patient atteint de maladie tuberculeuse est traité par monothérapie, le risque de sélectionner un mutant résistant sera élevé (16).

4-2 Traitement de la tuberculose active

Le schéma de traitement est identique quelle que soit la forme de tuberculose : (2(RHZE)/4(RH)). Cette codification internationale signifie qu'il existe une première phase de deux (2) mois avec quatre antituberculeux RHZE, suivie d'une deuxième phase de quatre (4) mois avec deux antituberculeux RH. L'hospitalisation est nécessaire si l'état général du patient est altéré ou en cas de complications. Doivent bénéficier du régime de deuxième ligne ou de retraitement les patients classés comme rechute, échec ou reprise de traitement. Ces patients étant fortement suspectés de porter des bacilles résistants, le régime associe cinq antituberculeux pendant deux mois puis quatre antituberculeux (sans la Streptomycine) pendant un mois et pendant cinq mois la Rifampicine, l'Isoniazide et l'Ethambutol, toujours sous supervision (17).

Références Bibliographiques

- (1) Grellet, I., & Kruse, C. (1983). Histoires de la tuberculose: les fièvres de l'âme, 1800-1940: Ramsay.
- (2) Ferlinz, R. (1995). Die Tuberkulose in Deutschland und das deutsche Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose. *Pneumologie*, 49 (Suppl 3), 617-632.
- (3) Bahnous S, Menani F, Rouaiguia I. (2015). La sensibilisation de la bacilloscopie par la méthode à l'hypochlorite de sodium. mémoire de master université 8 MAI 1945 GUELMA.
- (4) Prof H., Weiss N., Gabriela E., Pfyffer. (2004). La tuberculose Humaine et Animale Au Tchad : Contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. Faculté de l'Université de la philosophie et des sciences naturelles Basel.
- (5) Fanny A. (2013). Rôle du médecin généraliste dans la prise en charge désinfections tuberculeuses latentes du diagnostic de l'infection aux effets indésirables du traitement. Diplôme d'études spécialisées de médecine générale Université de Caen.
- (6) Grosset J. (1998) Histoire naturelle du bacille tuberculeux. Springer Verlag. Paris.
- (7) Mathys V. (2010). Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de Mycobacterium tuberculosis aux agents anti-tuberculeux. Thèse de doctorat Université Libre de Bruxelles.
- (8) Bouizem F. et Chellali A. (2010). La tuberculose en Médecine interne. service de médecine interne. Tlemcen.
- (9) Varaine F. et Rich M. (2014). Guide pratique à l'usage des médecins, infirmiers, technicien de laboratoire et auxiliaires de santé. Médecine sans frontière. France.
- (10) Zellweger J.P. (2014). Etiologie, transmission et évolution In : Manuel de la tuberculose. Suisse.

- (11) Black C. et Lim S. (2014). Définitions et cadre de notification pour la tuberculose. Organisation mondiale de la Santé.
- (12) Sidhom M., Dhikray, Gamara. (2014). Guide de prise en charge de la tuberculose en Tunisie. Direction des soins de santé de base.
- (13) Ben-Kheder A. (2014). Guide de prise en charge de la tuberculose en Tunisie, programme national de lutte contre la tuberculose.
- (14) Gilles P. (2000). Mycobactéries : Bacilles de la tuberculose.
- (15) Ait-Khaled N. et Donald E. (1999). Bactériologie de la tuberculose In : Tuberculose manuel pour les étudiants en médecine. France.
- (16) Mathys V. (2010). Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de Mycobacterium tuberculosis aux agents anti-tuberculeux. Thèse de doctorat Université Libre de Bruxelles.
- (17) Desiré I. (2013). Diagnostic moléculaire par PCR en temps réel du complexe mycobacterium tuberculosis résistant à l'isoniazide et à la rifampicine. Université d'Ouagadougou. Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie Moléculaire.

Partie II : Expérimentales

Chapitre III:
Identification des nouveaux inhibiteurs
de l'Enoly ACP reductase.



1- Criblage virtuel :

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au criblage virtuel à base de structure de l'enoyle ACP reductase (InhA) pour ses applications dans le cadre de la découverte de nouveaux médicaments de tuberculoses et notamment de la recherche de hits. Notre but a été, à partir des composés téléchargés à partir de chimiothèque ZINC, d'aboutir à une sélection de molécules enrichie en composés potentiellement actifs contre l'InhA. Ce processus peut être réalisé en Cinq étapes (**schéma 1**).

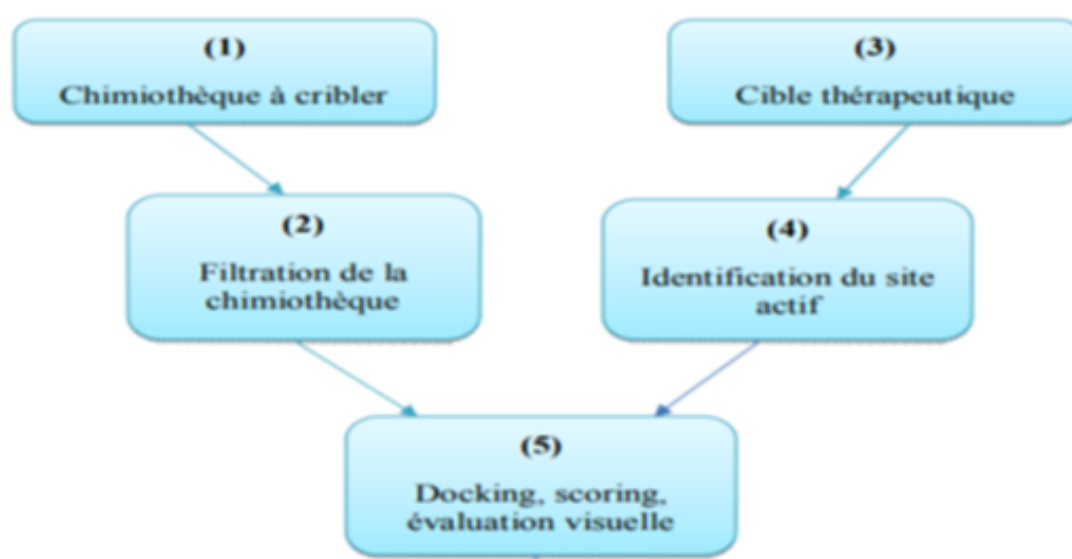


Schéma 01: Etapes du protocole de criblage virtuel utilisé pour l'identification des nouveaux inhibiteurs de InhA.

1-1 Filtration de chimiothèques

Les structures moléculaires de la base de données ZINC ont été téléchargées à partir du site web de (<http://zinc.docking.org/catalogs/molport>) (Figure 1) qui fournit gratuitement les structures de composés disponibles dans le commerce pour le criblage virtuel (1). Cette base de données contient plus de vingt millions de molécules disponibles dans le commerce dans des représentations biologiquement pertinentes. Chaque molécule de la chimiothèque ZINC est stockée dans plusieurs formats de fichiers courants, notamment SMILES, mol2, sdf, décrivant notamment les types d'atomes, leurs charges, leur connectivité, les types de liaisons

et la stéréochimie. ZINC est fourni par le Laboratoire Shoichet au département de chimie pharmaceutique à l'Université de Californie, San Francisco (UCSF).

ZINC15

Welcome to ZINC, a free database of commercially-available compounds for virtual screening. ZINC contains over 230 million purchasable compounds in ready-to-dock, 3D formats. ZINC also contains over 750 million purchasable compounds you can search for analogs in under a minute.

ZINC is provided by the Irwin and Shoichet Laboratories in the Department of Pharmaceutical Chemistry at the University of California, San Francisco (UCSF). We thank NiGMS for financial support (GM71896).

To cite ZINC, please reference: Sterling and Irwin, *J. Chem. Inf. Model.* 2015 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jcim.5b00559>. You may also wish to cite our previous papers: Irwin, Sterling, Mysinger, Bolstad and Coleman, *J. Chem. Inf. Model.* 2012 DOI: 10.1021/ci3001277 or Irwin and Shoichet, *J. Chem. Inf. Model.* 2005;45(1):177-82 PDF, DOI.

Getting Started

- Getting Started
- What's New
- About ZINC 15 Resources
- Current Status / In Progress
- Why are ZINC results "estimates"?

Explore Resources

Chemistry
Tranches, Substances, 3D
Representations, Rings, Patterns
And More

Ask Questions

You can use ZINC for **general** questions such as

- How many substances in current clinical trials have PAINS patterns? (150)
- How many natural products have names in ZINC and are not for sale? (9296) get them as SMILES, names and calculated logP
- How many endogenous human metabolites are there? (47319) and how many of these can I buy? (8271) How many are FDA approved drugs? (94)
- How many compounds known to aggregate are in current clinical trials? (60)
- How many epigenetic targets have compounds known? (53) and Which of these substances can I buy? (278)

ZINC15 News

- 2018-02-14 - ZINC reaches 213,235,528 purchasable leadlike 3DI
- 2018-02-13 - ZINC reaches 736,001,654 purchasable molecules 2DI
- 2018-01-14 - Klara Anu is born! Welcome Klara Anu, sister to Lisa!
- 2018-01-01 - Chinzo Dandar joins our team. Welcome Chinzo! Follow us on twitter @chem4biology Known limitations What's new

Caveat Emptor: We do not guarantee the quality of any molecule for any purpose and take no responsibility for errors arising from the use of this

Figure 1 : Interface de la chimiothèque ZINC (<http://zinc.docking.org>).

Une fois la base de données de ligand choisie, la première étape de n'importe quel protocole de criblage virtuel est d'éliminer les molécules indésirables des chimiothèques. Pour cela, nous avons choisi le programme **Virtual screening workflow** (Schrödinger). Il permet de filtrer les composés selon divers critères :

- La règle de cinq de Lipinski (2,3).
- Les propriétés ADME-Tox.
- Les groupements fonctionnels réactifs.

a) Règle de Lipinski :

La règle de Lipinski (3) est la plus utilisée pour caractériser les composés « druglike » (2).

- ✓ Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da).
- ✓ Le logarithme décimal du coefficient de partage eau / 1-octanol, noté logP, doit être inférieur ou égale à 5 ($\text{Log P} \leq 5$).

- ✓ Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur ou égale à 10 ($H \leq 10$).
- ✓ Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur ou égale à 5 ($H \leq 5$).

On rappelle que cette règle a pour but d'identifier les composés posant des problèmes d'absorption et de perméabilité.

b) Propriétés ADME-Tox:

Un autre aspect de sélection très important dans le domaine pharmacologique est l'élimination des drogues manifestant des propriétés toxiques in-vivo. Indice d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion (ADME) et de toxicité sont généralement appliqués aux ensembles de tests utilisés pour caractériser les composés selon leur absorption par les intestins, distribution dans l'organisme, métabolisme par le foie, excrétion par les reins et profil de toxicité. L'application du filtre ADME-Tox dans la conception et le développement de médicament joue un rôle important dans le processus étant donné le nombre important de composés "lead" et de drogues qui détiennent des propriétés toxiques.

c) les groupements fonctionnels réactifs:

Les fonctions réactives sont des fonctions principalement électrophiles du ligand qui permettent la formation de liaisons covalentes entre ce dernier et la cible biologique. La liste de fonctions réactives généralement citée est celle de Rishton (4).

1-2 Préparation des ligands :

Toutes les structures moléculaires des ligands ont été préparées en effectuant une recherche conformationnelle avec Macro Model. Les conformées les moins énergétiques de toutes les molécules ont été générés en utilisant le champ de force (OPLS-2005), puis les états des structures ont été générés à pH physiologiques ($7,0 \pm 0,2$).

1-3 Criblage virtuel à base de structure de InhA:

Le criblage virtuel par docking moléculaire de l'ensemble pré-filtré a été effectuée dans le site actif de l' InhA (2IE0).

1-3-1 Préparation de protéine et la génération de récepteur:

La structure cristalline du **Enoyl ACP reductase (PDB ID: 2IE0)** a été téléchargée à partir de la banque de données de protéines (PDB) (Figure 2). La structure de protéine téléchargée est dépourvue d'atomes d'hydrogène, et contient des molécules d'eau. Par conséquent, elle devrait être rectifiée avant d'être utilisé pour docking (Figure 4).



Figure 2. Interface de la Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>).

Le complexe (2IE0) a été préparé dans « Protein Preparation Wizard » et sa préparation comprenait l'élimination des molécules d'eau, l'addition d'atomes d'hydrogène, le remplissage des chaînes latérales manquantes du ligand. Ensuite, le complexe a été minimisé énergétiquement en utilisant « Protein Preparation Wizard », et après la préparation de la protéine, une grille de récepteurs a été générée en utilisant le « Receptor Grid Generation ».

1-3-2 Docking moléculaire :

Le docking moléculaire a été effectué en utilisant le Glide (programme impliqué dans le logiciel Maestro) pour générer un alignement tridimensionnel des molécules (Figure 4). Ce

programme « Glide » inclut trois niveaux de précision de la méthode de docking avec plusieurs options :

- Docking avec glide HTVS, c'est déroule très rapidement mais avec précision médiocre. Seules les 10% des meilleurs résultats classés dans cette étape sont retenus pour ensuite être utilisés dans l'étape suivante.
- Docking avec glide SP, cette étape est lente par rapport glide HTVS mais aboutit à des résultats avec plus de précision.
- Enfin les 10% des valeurs les plus élevées de glide ont été utilisées dans la dernière étape de docking « docking Glide XP ». Cette étape est caractérisée par sa haute précision de calcul. Les meilleures 82 molécules (hits) classées dans cette étape sont retenues pour les tests biologiques.

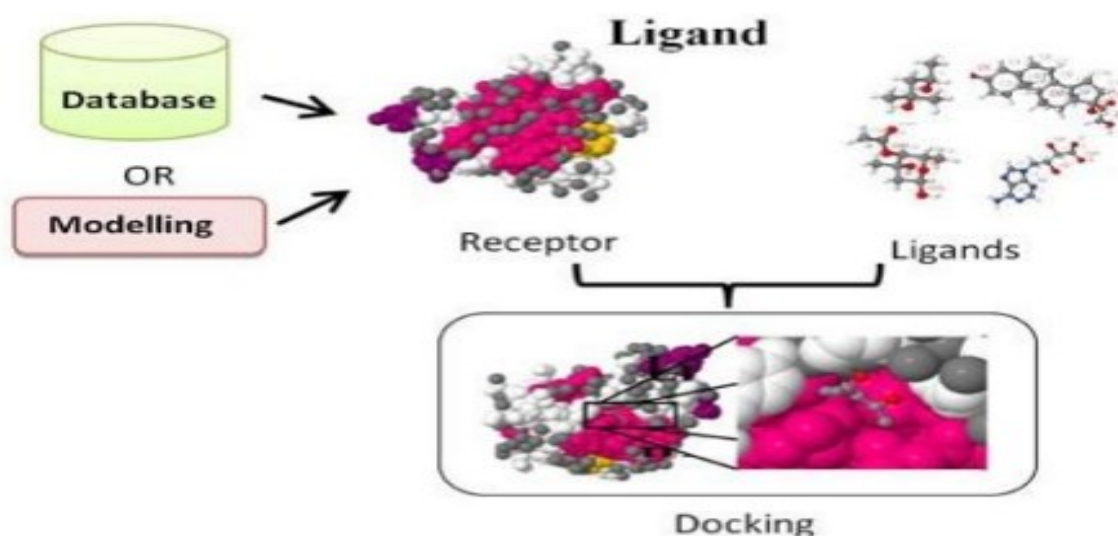


Figure 3 : Méthode de docking moléculaire.

2- Résultat et Discussion :

2-1 Visualisation des poses de docking :

Les meilleures molécules sélectionnées dans la dernière étape de docking ont été analysées individuellement en termes d'interaction avec les résidus du site actif de l'enzyme.

L'analyse de docking des molécules sélectionnées a révélé que ces dernières sont associées aux résidus de sites actifs de manière au isoniazide. (Figure 5, Figure 6), les liaisons hydrogène, π - π , π -cation (Van Der Waals) «VDW» et les interactions hydrophobiques étant les interactions ligand-protéine les plus prédominantes.

Les valeurs d'énergie d'interaction XP Glide Score (XPGS) des 82 hits sélectionnés qui varient de -11.54 à -13.41 kcal/mol, sont plus élevées que l'isoniazide qui a -6.90 kcal/mol, ce qui indique que ces 82 hits possèdent une affinité comparable à celle de la référence ce qui confère une stabilité meilleure dans le site actif.

Tableau 1 : Les valeurs d'énergie d'interaction XP Glide Score (XPGS) des 5 hits et Isoniazide.

<i>Hits</i>	XPGS
ZINC20975142 (A)	-11.94
ZINC64838311 (B)	-11.69
ZINC98211522 (C)	-11.67
ZINC72393268 (D)	-11.54
ZINC25865569 (E)	-11.51
Drug: Isoniazide (INH)	-6.60

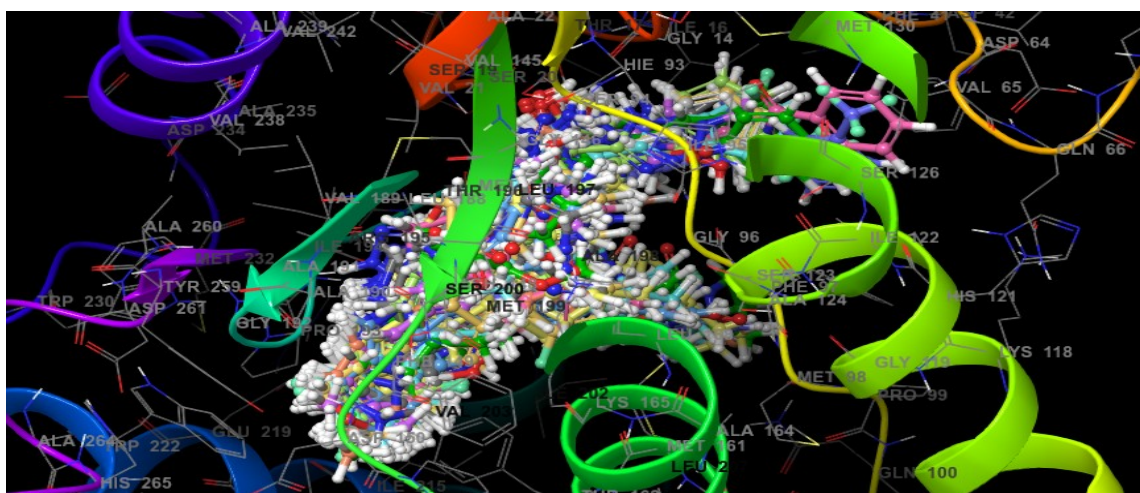
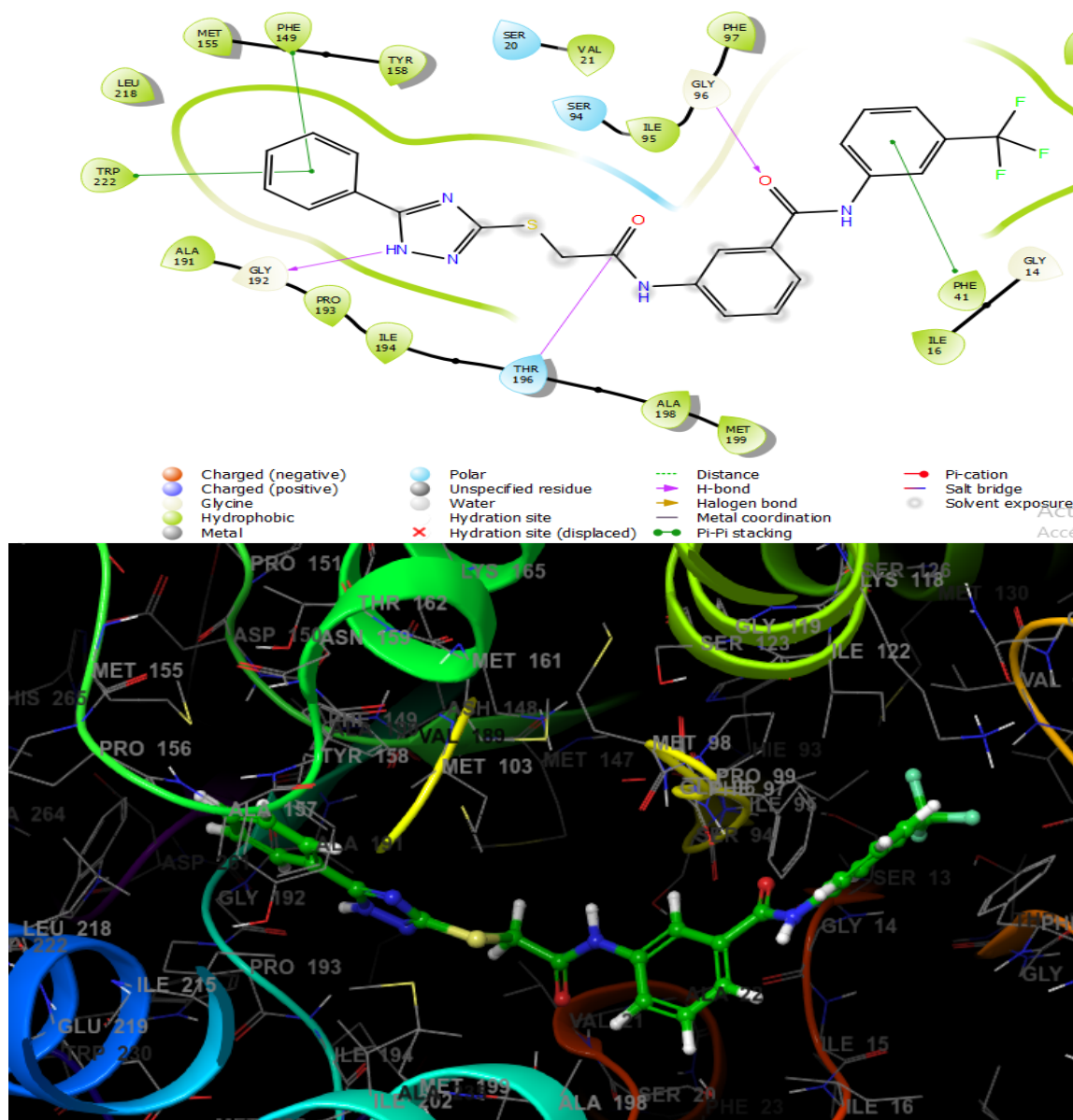


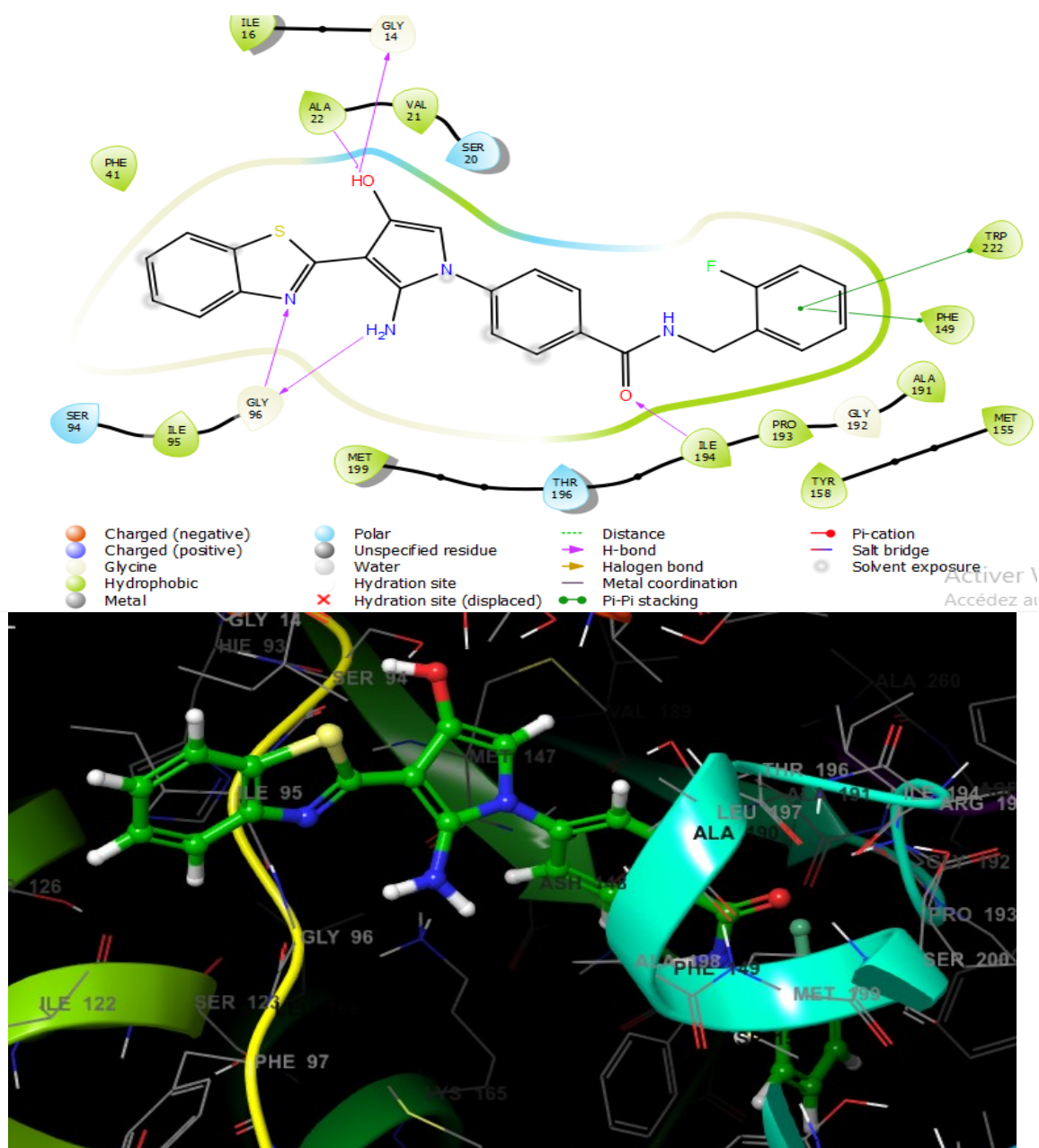
Figure 4: Alignement moléculaire des 82 hits dans le site actif de InhA (2IE0).

2-2 Liste des molécules sélectionnées :

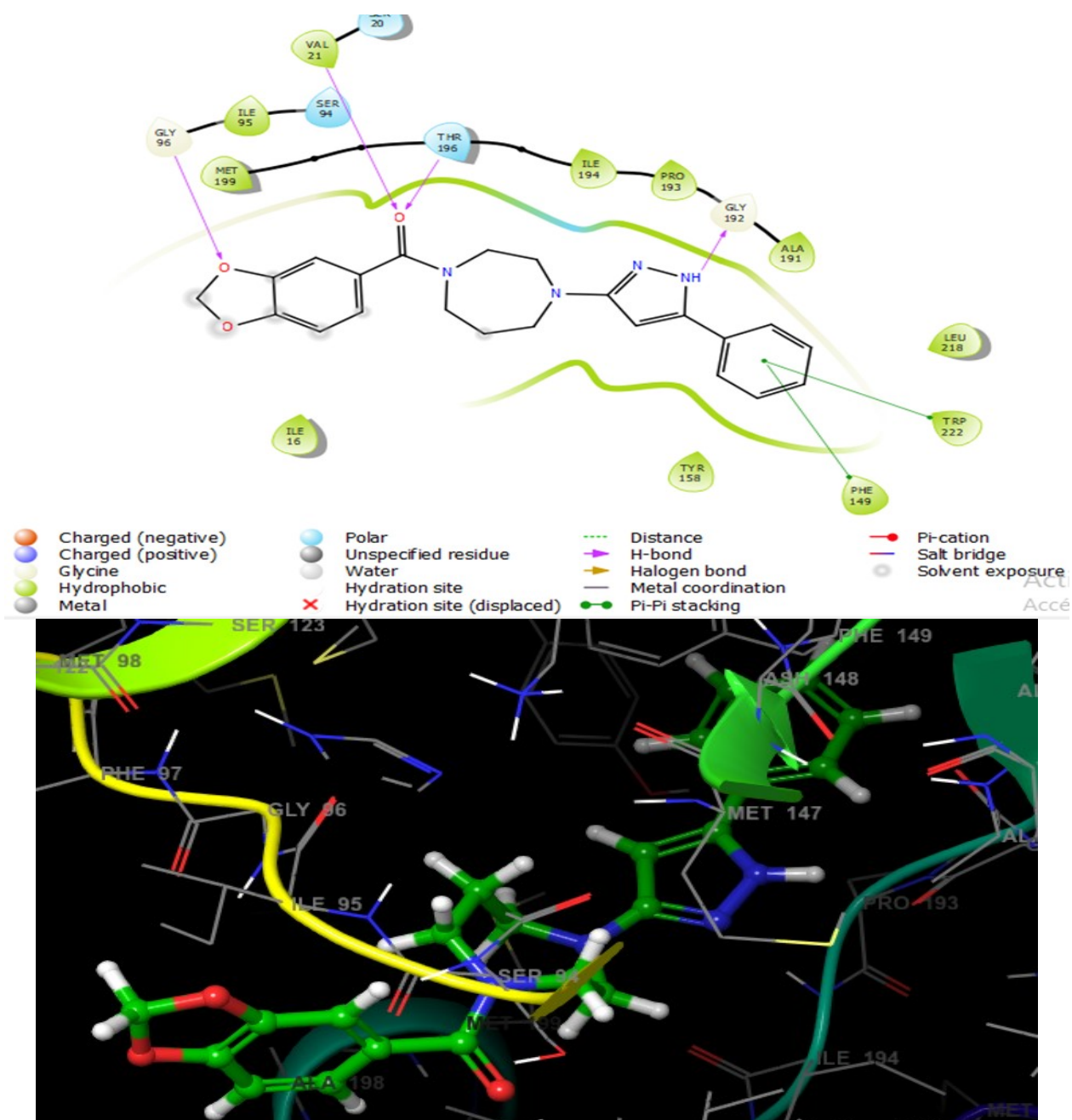
Après visualisation des poses de docking, nous avons choisi les 5 meilleurs hits dits «**Top-scoring**» (Figure 5), ayant les valeurs énergétiques d'interaction les plus basses.



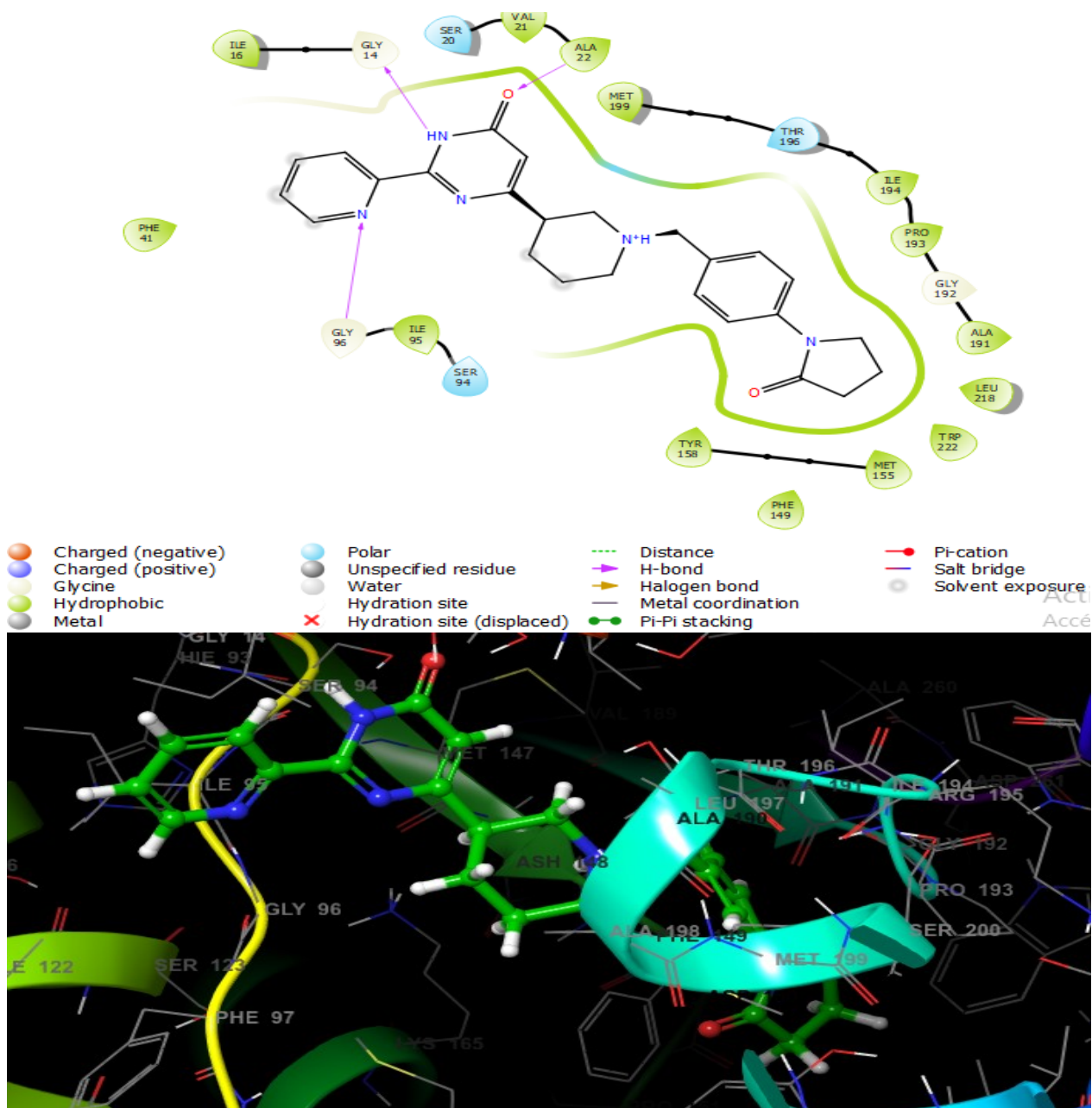
ZINC20975142 (A)



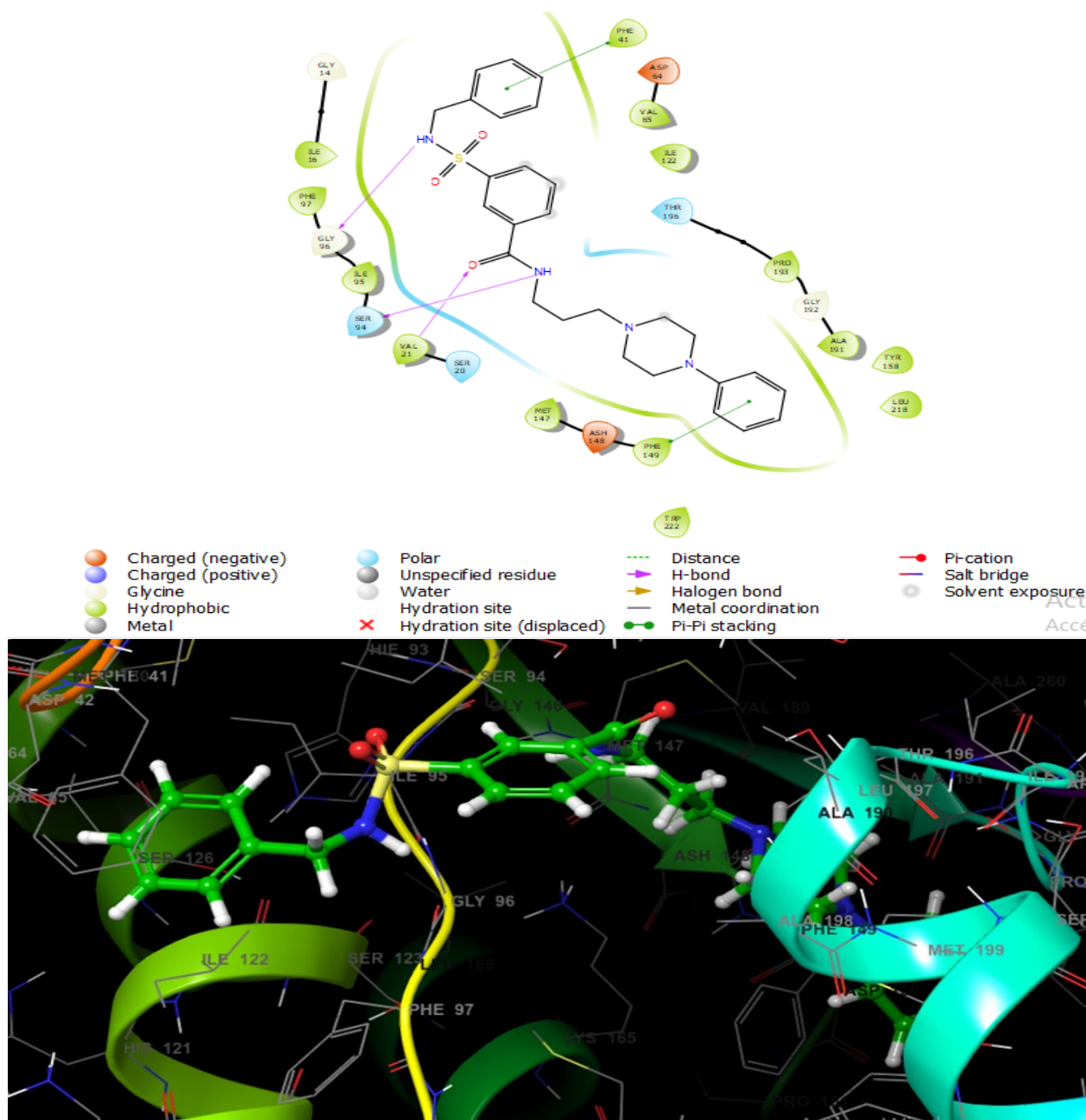
ZINC6483831 (B)



ZINC98211522 (C)



ZINC72393268 (D)



ZINC25865569 (E)

Figure 5 : Interactions d'amarrage de 5 Top-scoring dans le site actif de InhA.

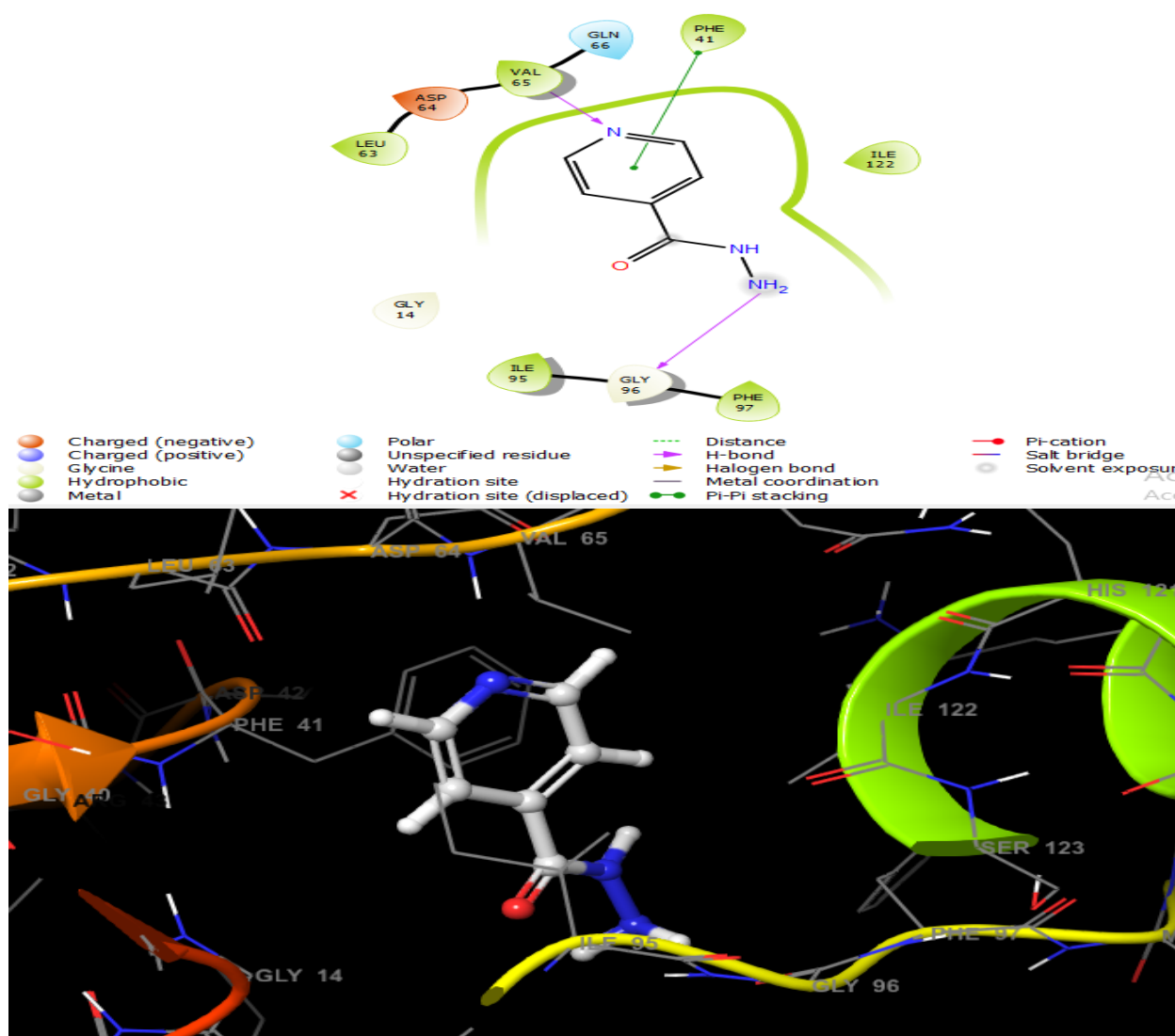
Résidus essentiels de l'interaction d'amarrage de 5 hits :

L'analyse de docking des 5 hits a montré que la majorité des interactions de liaisons hydrogène se produisaient avec des résidus d'acides aminés GLY96, GLY14 et des interactions π - π avec PHE149, TRP222 sont également constatées (**Tableau 2**).

Tableau 2: Interactions d'amarrage de 5 Top-scoring dans le site actif de InhA.

Hits	PHE149	TRP222	GLY96	PHE41	THR196	GLY192	GLY14	ALA22	ILE194	VAL21
A	X	X	X	X	X	X				
B	X	X	X				X	X	X	
C	X	X	X		X	X				X
D	X		X	X			X			
E			X				X	X		
INH			X	X						

D'autre part, la comparaison des interactions de liaison de l'isoniazide (**Figure 6**) a montré le potentiel de la classe des inhibiteurs du salacinol en tant que futurs candidats médicaments.

**Figure 6 :** Interactions moléculaires l'isoniazide (INH) dans le site actif de InhA.

2-4 Analyses ADME:

Les paramètres pharmacocinétiques (ADME) pour les dix hits se sont révélés être dans la gamme acceptable destinée à l'usage humain, révélant leurs propriétés potentielles de type médicamenteux (**voir tableau 3**).

Tableau 3 : Propriétés ADME-Tox pour les 5 top-scoring.

Hits	MW	dHB	aHB	QPlogPw	QPlogP0/w	QPlogS	QPPCaco	PHOA	HOA
A	497.94	3	7.50	16.58	4.97	-8.12	421.39	100	1
B	458.51	4	5.25	16.09	4.99	-7.36	578.81	100	1
C	390.44	1	6.0	11.05	3.72	-5.24	1617.12	100	3
D	429.52	1	9.5	14.72	2.62	-4.69	113.15	79.07	3
E	492.65	2	10.0	17.09	3.94	-6.04	122.49	87.41	3
INH	137.14	3	4.5	11.15	-0.65	-0.053	277.35	66.89	2

MW : Poids Moléculaire

dHB: Estimation du nombre de liaisons hydrogène qu'un ligand peut accepter (acceptable: 0,0 - 6,0) **aHB**: Estimation du nombre de liaisons hydrogène que le ligand peut donner (acceptable: 2,0 - 20,0).

QPlogPw: Predicted water/gas partition coefficient (acceptable range: 4.0 - 45 .0)

QPlogP0/w: Predicted octanol/water partition coefficient (acceptable range: -2.0 – 6.5)

QPlogS: Predicted aqueous solubility, logarithm in mol dm⁻³ (acceptable range: -6.5 – 0.5)

QPPCaco: Predicted apparent Caco-2 cell permeability in nm/sec (< 25 poor and >500 great)

PHOA: Pourcentage d'absorption orale humaine (80% est élevé et 25% est faible)

HOA: Absorption prédite par voie orale à une échelle de 0 à 100%. La prédiction est basée sur un modèle de régression linéaire multiple. Cette propriété est généralement en corrélation avec l'absorption orale humaine, car les deux mesurent la même propriété.

3- Conclusion :

Notre travail a été consacré au développement de nouveaux inhibiteurs puissants de l'enzyme Enoyl ACP réductase qui pourraient être optimisés et transformés en médicaments anti-tuberculose.

Un criblage virtuel a été appliqué, sur les composés de la base de données ZINC pour identifier de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'Enoyl ACP réductase. Les structures moléculaires sont toutes filtrées et traitées pour ne cibler que les molécules dites « drug-like ».

Les propriétés pharmacocinétiques (ADME) et la toxicité des meilleures structures ont été prédites, et les résultats obtenus montrent que ces molécules possèdent des valeurs de paramètres pharmacocinétiques dans la gamme acceptable destinée à l'usage humain.

Références bibliographiques:

- (1) J.J. Irwin, B.K. Shoichet, ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening, *J Chem Inf Model.* 45 (2005) 177–182.
- (2) C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 44 (2000) 235–249.
- (3) C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and developmental settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3–25.
- (4) G. Rishton, Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening, *Drug Discov Today.* 8 86–96.

Conclusion générale

Une procédure de criblage virtuel basée sur la structure de InhA a été appliquée sur une chimiothèque (ZINC) pour identifier de nouveaux inhibiteurs potentiels de l’InhA.

Dans une première étape, la base de données ZINC a été filtrée et traitée dans l’objectif de ne cibler que des molécules dites « druglike ». Ensuite l'ensemble sélectionné de molécules a été amarré dans le site actif de InhA (**PDB ID: 2IE0**) afin d'évaluer et d’avoir une idée approfondie de leur capacité de liaison dans le site actif de l'enzyme cible.

L’analyse de docking a révélé que les hits identifiés sont associés aux résidus de sites actifs de manière analogue à l’inhibiteur de référence : isoniazide.

Ces interactions sont de nature liaisons hydrogène, π - π et interactions hydrophobes. Les interactions prédominantes sont principalement observées avec les résidus PHE149, TRP222, GLY96, GLY14.

Enfin, une étude ADME-tox a été effectuée pour les 5 hits sélectionnés pour évaluer leur toxicité et leurs propriétés pharmacocinétiques.

L’analyse des résultats obtenus montre que ces molécules possèdent des valeurs de paramètres pharmacocinétiques dans la gamme acceptable destiné à l’usage humain.

Les résultats de cette étude pourraient fournir des indications sur le développement de nouveaux inhibiteurs puissants de InhA et être prometteurs pour de nouveaux médicaments contre la tuberculose.