

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université Farhat Abbas Sétif
Faculté des Sciences Médicales
Département de Pharmacie



THÈSE
De Doctorat en vue de l'obtention du diplôme de
Docteur en Sciences Médicales
Spécialité : Chimie thérapeutique

**Conception d'antibiotique inhibiteur de l'ADN Gyrase par
méthode de relation structure activité quantitative QSAR
et criblage virtuel basé sur le docking**

Présentée par

MOKHENANE Ahmed Mostefa

Maitre-assistant en Chimie Thérapeutique

Devant le jury :

Président :

M. AMOURA Kamel : Professeur à la Faculté de Médecine, Université d'Annaba

Directrice : **Mme. HADJADJ-AOUEL Fatima Zohra**
Professeur à la Faculté de Pharmacie, Université d'Alger

Co-directeur : **M. NEGHRA Abdelhak**
Professeur à la Faculté de Médecine, Université
Badji Mokhtar, Annaba

Examineurs :

M. DELLAOUI Yahia : Professeur à la Faculté de Médecine, Université d'Oran

M. MERAH Abdelaali : Professeur à la Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar,
Annaba

M. ZOUAI Foued : Professeur à l'Université Farhat Abbas, Sétif

Année 2023

Remerciements :

Je tiens à commencer mes remerciements en exprimant ma gratitude envers mon Dieu pour sa bénédiction et sa guidance tout au long de ce parcours académique. Sans sa force, sa sagesse et sa protection, je n'aurais jamais pu mener à bien ce projet de thèse. Sa grâce et sa miséricorde ont été une source constante d'inspiration et de soutien pour moi. Je suis profondément reconnaissant pour sa présence dans ma vie et pour avoir eu la chance de bénéficier de ses bénédictions tout au long de mes recherches. Merci à mon Dieu pour son amour et sa bonté infinis.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers mes parents, ainsi que mon grand frère, pour leur amour inconditionnel, leur soutien constant et leur encouragement tout au long de ma vie et de mes études. Ils ont été mes plus grands champions, me poussant à donner le meilleur de moi-même et à poursuivre mes rêves, même lorsque les obstacles semblaient insurmontables. Je suis reconnaissant pour leur patience, leur bienveillance et leur sacrifice, qui ont rendu possible la réalisation de ce projet de thèse. Leur amour et leur soutien m'ont donné la force de persévérer, même dans les moments les plus difficiles. Je leur suis éternellement reconnaissant et je leur suis redevable pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Je voudrais remercier sincèrement le **Professeur Fatima Zohra Hadjadj-Aouel**, ma directrice de thèse. Ses compétences en chimie thérapeutique et son expertise ont été des atouts majeurs pour la réalisation de ce travail. Je suis reconnaissant pour sa patience, son soutien constant, sa disponibilité, son écoute attentive et ses conseils avisés qui ont été précieux tout au long de ces années. Je suis fier d'avoir travaillé sous sa direction et je la remercie de m'avoir donné l'opportunité de mener ce travail à bien.

Je tiens également à remercier le **Professeur Abdelhak Neghra**, mon co-directeur de thèse, qui a joué un rôle clé dans l'accomplissement de ce travail. Ses compétences en chimie thérapeutique et son expertise ont été un atout majeur pour le développement de mes recherches. Sa disponibilité, son soutien et ses conseils ont été inestimables et ont grandement contribué à la qualité de mon travail. Je suis honoré d'avoir travaillé sous sa direction et je lui suis très reconnaissant pour son dévouement et son engagement tout au long de cette expérience.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le **Professeur Kamel Amoura**, président du jury de ma thèse. Sa présence et sa contribution ont été très importantes pour moi et ont donné un grand prestige à cette thèse. Ses compétences en microbiologie, son expertise et son engagement dans la recherche scientifique m'ont permis de bénéficier de ses précieux conseils et de ses remarques constructives. Je suis reconnaissant pour sa présence lors de cette soutenance et pour son soutien tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers le **Professeur Yahia Dellaoui**, membre du jury de ma thèse. Ses compétences en chimie thérapeutique, son expertise et sa grande expérience dans le domaine m'ont permis de bénéficier de ses précieux conseils et de ses remarques constructives tout au long de mon travail. Je suis reconnaissant pour son temps et sa disponibilité, ainsi que pour sa contribution lors de cette soutenance. Sa présence et son engagement ont été très importants pour moi et ont grandement contribué à la qualité de cette thèse.

Je tiens également à remercier le **Professeur Abdelaali Merah**, membre du jury de ma thèse. Ses compétences en chimie minérale, son expertise et sa grande expérience dans le domaine

ont été très précieuses pour la réussite de ce travail. Ses commentaires, suggestions et remarques constructives m'ont permis de consolider mes recherches et d'approfondir mes connaissances. Je suis reconnaissant(e) pour sa présence et son engagement lors de cette soutenance, ainsi que pour son temps et sa disponibilité tout au long de ce projet. Sa contribution a été très importante pour moi et a grandement contribué à la qualité de cette thèse.

Je tiens à remercier le **Professeur Foued Zouai**, membre du jury de ma thèse. Ses compétences en génie des procédés, son expertise et son expérience ont été très précieuses pour moi tout au long de ce projet. Ses remarques constructives, son soutien et son encouragement m'ont permis de progresser et d'approfondir mes recherches. Je suis reconnaissant(e) pour sa présence et son engagement lors de cette soutenance, ainsi que pour son temps et sa disponibilité tout au long de cette expérience. Sa contribution a été très importante pour moi et a grandement contribué à la qualité de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au **Docteur Khaireddine Kraim**, au **Docteur Faycel Layachi**, au **Professeur Mohamed Djebbar** et à la **Docteure Samira Ait Kaki** pour leur contribution précieuse à la réalisation de ma thèse. Leurs conseils, leur expertise et leur soutien tout au long de ce projet ont été inestimables et ont grandement contribué à la qualité de mes recherches. Leurs connaissances et leur expérience ont été un atout majeur pour le développement de mes travaux. Je suis reconnaissant pour leur disponibilité, leur temps et leur engagement envers ce projet. Leur contribution a été très importante pour moi et a grandement contribué à la réussite de ma thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les collaborateurs qui ont contribué à la réalisation de ma thèse. Leurs conseils, leur soutien, leurs compétences et leur expertise ont été très précieux pour le succès de ce projet. Leurs contributions ont permis de consolider mes recherches et d'approfondir mes connaissances. Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Dr Med Nadjib Kaarar, Dr Nadia Hadhoum, Dr Ahmed Ameziane, Dr Imene Adouani, Dr Noureddine Boumaaza, Dr Khaled Achouri, Dr Faiza Bouchala, Pr Sabah Benboudiaf, Dr Abdessalam Bouzina, Dr Mohamed Aissaoui, Pr Amel Ouyahia, Pr Laouamri Slimane, Dr Yamoun Assia, Pr Abdennacer Flilissa, Dr Khalifa Bouacem, Dr Nawel Tachi, Dr Amel Boudiche, Dr Nour El Houda Mezaach, Pr Fatima Zohra Benabid, Dr Younes Daoued, Dr Abdelhamid Chikh, Dr Yazid Chellik et M. Yassine Azzi. Leur contribution a été très importante pour moi et a grandement contribué à la réussite de ma thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les enseignants qui m'ont formé en pharmacie. Leur passion, leur savoir-faire et leur dévouement ont été une source d'inspiration tout au long de mes études et de ma thèse. Grâce à leur enseignement, j'ai acquis des connaissances solides et une compréhension approfondie des principes fondamentaux de la pharmacie. Leurs conseils avisés m'ont permis de progresser et de m'adapter aux différents défis que j'ai rencontrés. Je suis particulièrement reconnaissant pour leur accompagnement tout au long de ma thèse, qui n'aurait pas été possible sans leur aide et leur expertise. Leur contribution à mon parcours académique et professionnel est inestimable et je leur suis profondément reconnaissant. Je suis fier d'avoir été formé par des enseignants aussi talentueux et dévoués et je suis impatient de continuer à m'appuyer sur leur soutien tout au long de ma carrière professionnelle. Merci à tous les enseignants de pharmacie pour leur impact sur ma vie et mon travail.

Résumé :

Le développement de nouveaux antibiotiques efficaces est un enjeu de santé publique majeur. Dans cette thèse, nous avons utilisé une approche intégrée combinant la modélisation QSAR, le docking moléculaire, la synthèse de composés et l'évaluation de l'activité biologique *in vitro* pour concevoir une nouvelle molécule antibiotique. Nous avons commencé par utiliser le docking moléculaire pour étudier l'interaction entre la molécule synthétisée dans notre étude et l'ADN Gyrase. Ensuite, nous avons construit un modèle QSAR robuste avec 5 variables pour prédire l'activité antibactérienne de notre composé candidat. Les résultats ont été utilisés pour guider la synthèse d'un nouveau composé antibactérien qui a été préparé par une synthèse de Schotten-Baumann modifiée. Enfin, nous avons testé l'activité antibactérienne de notre composé synthétisé contre des souches bactériennes de référence et cliniques. Nous avons identifié un composé prometteur avec une activité antibactérienne significative sur *Proteus mirabilis*. Ces résultats fournissent une base solide pour le développement futur de nouveaux antibiotiques.

Mots clés :

Antibiotique, modélisation QSAR, docking, synthèse, activité antibiotique.

Abstract:

The development of new effective antibiotics is a major public health issue. In this thesis, we used an integrated approach combining QSAR modeling, molecular docking, compound synthesis and *in vitro* biological activity evaluation to design a new antibiotic molecule. We first used molecular docking to study the interaction between the molecule synthesized in our study and DNA Gyrase. Then, we built a robust QSAR model with 5 variables to predict the antibacterial activity of our candidate compound. The results were used to guide the synthesis of a new antibacterial compound that was prepared by a modified Schotten-Baumann synthesis. Finally, we tested the antibacterial activity of our synthesized compound against reference and clinical bacterial strains. We identified a promising compound with significant antibacterial activity against *Proteus mirabilis*. These results provide a solid basis for the future development of new antibiotics.

Keywords:

Antibiotic, QSAR modeling, docking, synthesis, antibiotic activity.

Liste des abréviations :

°C	degrés celsius
µg	Microgramme
µL	Microlitre
2XCS	The 2.1Å crystal structure of <i>S. aureus</i> Gyrase complex with GSK299423 and DNA
2XCT	The twinned 3.35Å structure of <i>S. aureus</i> Gyrase complex with Ciprofloxacin and DNA
3ILW	Structure of DNA gyrase subunit A N-terminal domain
4Z2C	Quinolone(Moxifloxacin)-DNA cleavage complex of gyrase from <i>S. pneumoniae</i>
Å	Ångström
ADME/Tox	Absorption, distribution, métabolisme, élimination et toxicité
ADMET	Absorption, distribution, métabolisme, élimination et toxicité
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN-lig	complexe acide désoxyribonucléique ligand
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ASP-1	Atomic Surface Potential
ATCC	American Type Culture Collection
ATSC7c	AutoTorsion Shape Complementarity with Volume and Charge-scaled van der Waals spheres
BN	bouillon nutritif
Ca	calcium
cc	centimètre cube
CCC	le coefficient de corrélation de concordance
CCM	chromatographie sur couche mince
CD4	cluster de différenciation 4
CIP	ciprofloxacin
CLIN	clinafloxacin
CMB	concentration minimale bactéricide
CMI	concentration minimale inhibitrice
Cu	cuivre
DMF	N, N-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
EMME	éthoxyméthylènemalonate de diéthyle
Et	éthyle
EVR	Extraction par vaporisateur rotatif
Fe	fer

FLE	fléroxacine
G6PD	Glucose-6-déshydrogénase
GAT	gatifloxacine
GATS2v	Generalized AutoTorsion Shape Complementarity with Volume-scaled van der Waals spheres
Gly	glycine
GRE	grépafloxacine
H	hydrogène
h	heure
hERG	human Ether-à-go-go-Related Gene
ID	identifiant
IgA	immunoglobulines A
LOM	Loméfloxacine
LVX	lévofloxacine
m.o.	molécule originale
Mg	magnésium
minHBint6	Minimum Hydrogen Bond Interaction Energy of 6 Tautomers
MOX	Moxifloxacine
N	azote
nHCsatu	Number of Hydrogen Bond Donors and Acceptors of a Tautomeric Unit
nm	Nanomètre
OFL	ofloxacine
PDB	protéine data base
PEF	péfloxacine
pH	Le potentiel hydrogène
pKa	logarithme décimal négatif de la constante d'acidité
PLP	Protéines liant les Pénicillines
PLS	Régression des moindres carrés partiels
PPA	acide polyphosphorique
Prot-lig	complexe protéine ligand
PRP	protéines à répétition pentapeptidique
Q ²	Coefficient de prédiction
QRDR	quinolone resistance-determining regions
QSAR	Relation Structure-Activité Quantitative
<i>R. rickettsii</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>
R ²	Coefficient de détermination
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	Root-mean-square deviation
RMSE	L'écart quadratique moyen
RMSEP	erreur quadratique moyenne de prédiction
SBDD	conception de médicaments basée sur la structure
SDF	structure data file

Ser	sérine
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SPA	sparfloxacin
TRO	trovafloxacin
UFC	Unité formant colonie
UICPA	Union internationale de chimie pure et appliquée
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
Zn	zinc

Liste des figures :

Figure 01 : mécanisme d'action des antibiotiques	19
Figure 02 : structure générale des quinolones	29
Figure 03 : structure chimique de l'acide nalidixique NEGRAM®	30
Figure 04 : structure chimique de l'acide pipémidique PIPRAM®	30
Figure 05 : dénomination commune des quinolones	31
Figure 06 : synthèse chimique des quinolones	32
Figure 07 : synthèse de la péfloxaciné	33
Figure 08 : synthèse de l'ofloxaciné.....	34
Figure 09 : synthèse de L'anilinoéthylène maléonate de diéthyle	34
Figure 10 : marquage des quinolones avec le ¹⁴ C	35
Figure 11 : mode d'action de l'ADN Gyrase	39
Figure 12 : pénétration des quinolones vers l'intérieur des bactéries	40
Figure 13 : mode d'action des quinolones.....	41
Figure 14 : résistance aux quinolones par efflux.....	43
Figure 15 : les étapes du docking	50
Figure 16 : Diagrammes schématiques des trois modèles de liaison. (A) Le modèle clé-serrure, (B) le modèle d'ajustement induit, et (C) le modèle de sélection conformationnelle.	52
Figure 17 : schéma général de la philosophie QSAR.....	60
Figure 18 : schéma de la stratégie QSAR.....	64
Figure 19 : site de fixation du ligand de référence capturé par Molegro	79
Figure 20 : interaction Ligand-Proteine simulée par Molegro.....	80
Figure 21 : interaction Ligand-ADN simulée par Molegro	80
Figure 22 : structure générale des 7-pipérazine fluoroquinolones N-substituées	84
Figure 23 : carte de ligand de l'interaction du dérivé N-méthyle (ofloxaciné) avec l'ADN gyrase	85
Figure 24 : carte de ligand de l'interaction du dérivé N-Isobutyle avec l'ADN gyrase.....	85
Figure 25 : carte de ligand de l'interaction du dérivé N-chloroéthyle avec l'ADN gyrase	86
Figure 26 : carte de ligand de l'interaction du dérivé N-chlorométhyle avec l'ADN gyrase .	87
Figure 27 : structure des deux molécules candidates issues du docking	87
Figure 28 : La pCMI prédite des composés testés par rapport à la pCMI expérimentale	97
Figure 29 : l'impact de la fonction amide sur le descripteur nHCsatu.....	99
Figure 30 : structure générale des 7-pipérazine fluoroquinolones N-substituées.....	101
Figure 31 : QSAR entre valeur réelles et valeur prédictives	103

Figure 32 : structure chimique de la molécule à synthétiser	106
Figure 33 : réaction d'amidification entre acide et amide	108
Figure 34 : principe général de la réaction de Schotten-Baumann.....	108
Figure 35 : bilan générale de la réaction de synthèse de la molécule en étude.....	109
Figure 36 : mécanisme de la réaction de synthèse de la molécule en étude	109
Figure 37 : résultat de la chromatographie sur couche mince	118
Figure 38 : spectre infrarouge de la molécule synthétisée	120
Figure 39 : chromatogramme de la molécule synthétisée	121
Figure 40 : spectre de masse simple MS de la molécule synthétisée avec ionisation positive	122
Figure 41 : spectre de masse double MS de la molécule synthétisée avec ionisation positive	122
Figure 42 : spectre de masse double MS de la molécule synthétisée avec ionisation négative	122
Figure 43 : les poids moléculaires des différents fragments de la molécule	123
Figure 44 : Spectre RMN ^1H de la molécule synthétisée.....	126
Figure 45 : Spectre RMN ^{13}C de la molécule synthétisée.....	127
Figure 46 : réaction d'hydrolyse de la molécule en étude	136

Liste des tableaux :

Tableau 01 : activité in vitro des fluoroquinolones sur les entérobactéries	36
Tableau 02 : activité in vitro des fluoroquinolones sur les bacilles Gram négatifs non fermentaires	36
Tableau 03 : exemples de logiciels utilisés pour le docking	57
Tableau 04 : exemples de logiciels utilisés dans le QSAR	67
Tableau 05 : Protéines utilisées, identifiant du ligand et résolution	77
Tableau 06 : Les énergies de liaison enzyme-ligand des molécules de la database	83
Tableau 07 : Les énergies de liaison enzyme-ligand des molécules issues du design.....	87
Tableau 08 : prédiction de la CMI de quelques molécules issues du docking	101
Tableau 09 : liste des réactifs utilisés dans l'étape de synthèse	107
Tableau 10 : données de spectroscopie de masse de la molécule 01	123
Tableau 11 : les souches concernées par les essais de CMI.....	133
Tableau 12 : Résultats de la mesure de la CMI de la nouvelle molécule	135

Liste des équations :

équation 01 : formule du coefficient de détermination	68
équation 02 : formule générale de la régression linéaire multiple	93
équation 03 : formule du modèle QSAR.....	95
équation 04 : formule du modèle QSAR de E Gamal et al	100

Liste des annexes :

Annexe 1 : structures des molécules issues du docking.....	152
Annexe 2 : les molécules de la dataset (QSAR).....	153
Annexe 3 : la publication	159
Annexe 3 : rapport de l'HPLC	170

Table des matières :

Remercîments.....	ii
Résumé.....	iv
Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des équations.....	xi
Liste des annexes.....	xii
Table des matières.....	xiii
Introduction générale.....	1
Etude bibliographique.....	2
1. Les infections bactériennes.....	3
1.1.Introduction.....	8
1.2.Objectifs.....	8
1.3.Définition des infections bactériennes.....	9
1.4.Epidémiologie des infections bactériennes et modes de transmission.....	9
1.5.Classification.....	9
1.6.Conflit hôte bactérie.....	10
1.7.Mécanismes de pathogénicité.....	11
1.8.Facteurs de virulence spécifiques.....	14
1.9.Activité biologique des endotoxines.....	14
1.10.Diagnostic.....	14
2.Les antibiotiques.....	16
2.1.Introduction.....	17
2.2.Objectifs.....	17
2.3.Réflexions générales.....	17
2.4.Indications de l'antibiothérapie.....	18
2.5.Mécanismes d'actions des antibiotiques.....	19
2.6.Principaux modes de résistance des bactéries.....	21
2.7.Critères de choix du traitement antibiotique.....	21
2.8.Stratégie des indications.....	24
2.9.Antibioprophylaxie.....	26
3.Antibiotiques inhibiteurs de l'ADN Gyrase : les Quinolones.....	27
3.1.Introduction.....	28
3.2.Objectifs.....	29

3.3. Structure et nomenclature.....	29
3.4. Synthèse chimique : Méthode de GOULD et JACOB	31
3.5. Relation structure activité.....	35
3.6. Classification.....	37
3.7. L'enzyme ADN gyrase et mécanisme d'action des quinolones	38
3.8. Mécanisme de résistance des bactéries aux quinolones	42
3.9. Propriétés pharmacocinétiques.....	43
3.10. Spectre antibactérien	43
3.11. Interactions médicamenteuses.....	44
3.12. Effets indésirables	45
4. Docking moléculaire	47
4.1. Introduction	48
4.2. Objectif.....	48
4.3. Contexte.....	48
4.4. Définition.....	49
4.5. Modèles pour les mécanismes de liaison des protéines.....	50
4.6. Données structurales.....	52
4.7. Méthodes de docking.....	52
4.8. Types d'interactions	53
4.9. Mécanisme du docking moléculaire.....	54
4.10. Analyses post-docking	54
4.11. Applications du docking.....	55
4.12. Limites du docking moléculaire	55
4.13. Quelques logiciels de criblage virtuel disponibles	57
5. Modélisation QSAR (relation structure-activité quantitative).....	58
5.1. Introduction	59
5.2. Objectif.....	59
5.3. Définition.....	59
5.4. Historique	60
5.5. Crédibilité des modèles QSAR.....	61
5.6. Les descripteurs moléculaires.....	62
5.7. Conception d'un modèle QSAR.....	63
5.8. Interprétation et domaines d'applications	69
5.9. Utilisations des modèles QSAR en chimie thérapeutique	69
Etudes expérimentales	72
Introduction et objectifs.....	73

Chapitre 1 : docking	74
1.1.Introduction	75
1.2.Objectifs	75
1.3.Matériel et méthodes	76
1.4.Résultats et discussion.....	80
1.5.Conclusion.....	88
Chapitre 2 : QSAR	89
2.1. Objectifs	90
2.2. Interet de la modélisation QSAR.....	90
2.3. Matériels et méthodes.....	91
2.4. Résultats et discussion.....	95
2.5. Prédiction de l'activité biologique.....	100
2.6. Limite de l'études QSAR	102
2.7. Conclusion.....	103
Chapitre 3 : synthèse de la molécule 01 issue du docking	105
3.1. Introduction	106
3.2. Objectifs	106
3.3. Présentation de la molécule.....	106
3.4. Matériels et méthodes.....	107
3.5. Résultats et discussion.....	110
3.6. Conclusion.....	112
Chapitre 4 : identification.....	114
4.1. Introduction	115
4.2. Objectif.....	115
4.3. Choix des techniques.....	115
4.4. Matériels et méthodes.....	116
4.5. Résultats et discussion.....	118
4.6. Conclusion.....	128
Chapitre 5 : activité antibactérienne de la molécule 01 synthétisée	129
5.1. Introduction	130
5.2. Objectifs	130
5.3. Matériels et méthodes.....	130
5.4. Résultats et discussion.....	134
5.5. Conclusion.....	136
5.6. Perspectives	137
Conclusion générale	138

Références bibliographiques	141
Annexes	151

Introduction

Introduction générale :

Les antibiotiques ont été largement utilisés pour traiter les infections bactériennes depuis leur découverte dans les années 1940. Cependant, l'utilisation excessive et inappropriée d'antibiotiques a conduit à une augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries, ce qui a créé un problème de santé publique mondial (1).

Les données statistiques montrent que la résistance aux antibiotiques est en constante augmentation depuis les dernières décennies. Selon un rapport de l'Organisation mondiale de la santé, environ 700 000 décès dans le monde sont attribués chaque année à des infections résistantes aux antibiotiques, et ce nombre pourrait atteindre 10 millions d'ici 2050 si des mesures ne sont pas prises pour lutter contre ce phénomène. La résistance bactérienne est souvent liée à l'utilisation abusive ou inappropriée des antibiotiques, ce qui souligne l'importance d'une utilisation judicieuse des antibiotiques pour prévenir et contrôler la résistance bactérienne (2–4). La résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique majeur dans le monde entier, et la situation est de plus en plus préoccupante. Dans ce contexte, une étude épidémiologique menée en 2019 au CHU MOHAMED VI de OUJDA a révélé un taux alarmant de résistance des entérobactéries aux fluoroquinolones. En effet, sur les souches isolées, 41,3% ont montré une résistance à cette classe d'antibiotiques(5). Cette constatation est particulièrement préoccupante car les entérobactéries sont responsables d'un grand nombre d'infections courantes, telles que les infections urinaires, les infections digestives, et peuvent également causer des infections nosocomiales graves. Ces résultats soulignent donc l'urgence de trouver des solutions pour lutter contre la résistance aux antibiotiques, afin de préserver l'efficacité des traitements et de garantir une prise en charge médicale efficace pour les patients atteints d'infections bactériennes

Le développement de nouveaux antibiotiques est devenu une nécessité urgente pour faire face à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles. Les antibiotiques sont utilisés pour traiter les infections bactériennes, mais l'augmentation de la résistance bactérienne rend certains traitements inefficaces. Cela peut entraîner une augmentation des taux d'infections graves, une prolongation des séjours hospitaliers, une augmentation des coûts de santé et une augmentation de la mortalité. Il est donc crucial de développer de nouveaux antibiotiques pour lutter contre les bactéries résistantes et préserver l'efficacité des traitements antibiotiques existants. Cependant, le développement de nouveaux antibiotiques est un processus long et coûteux, nécessitant des investissements importants en recherche et développement, ainsi qu'une surveillance continue pour éviter l'émergence de

résistance (1). Les besoins cliniques en nouveaux agents antibactériens découlent de la dissémination de la résistance bactérienne et de l'émergence de pathogènes opportunistes, en particulier dans la population croissante de personnes dont le système immunitaire est affaibli. Une approche pour assurer la disponibilité future de médicaments efficaces consiste à augmenter le nombre de molécules innovantes(6).

L'ADN gyrase est une enzyme importante que l'on trouve dans les bactéries et qui est impliquée dans la réplication et la transcription de l'ADN. Les inhibiteurs de l'ADN gyrase sont un type d'antibiotique qui cible spécifiquement cette enzyme, ce qui en fait une cible thérapeutique importante pour le développement de nouveaux antibiotiques (7). Dans ce contexte, les inhibiteurs de l'ADN gyrase sont des antibiotiques qui présentent un grand intérêt. En effet, ces antibiotiques ciblent une enzyme clé de la réplication de l'ADN chez les bactéries, ce qui les rend bactéricides et très efficaces. Les inhibiteurs de l'ADN gyrase ont été largement utilisés dans le traitement de diverses infections bactériennes, y compris les infections urinaires, les infections respiratoires, les infections de la peau et des tissus mous, et d'autres types d'infections. En raison de leur efficacité et de leur large spectre d'activité, le développement de nouveaux antibiotiques inhibiteurs de l'ADN gyrase est un enjeu important pour la lutte contre la résistance aux antibiotiques. Cependant, la recherche de nouveaux antibiotiques nécessite une compréhension approfondie de la biochimie et de la physiologie des bactéries, ainsi que des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Par conséquent, la recherche sur les inhibiteurs de l'ADN gyrase est un domaine prometteur pour le développement de nouveaux antibiotiques efficaces et bactéricides pour le traitement des infections bactériennes, l'augmentation constante du nombre de publications scientifiques sur les inhibiteurs de l'ADN gyrase témoigne de l'importance de ce sujet pour la recherche et le développement de nouveaux traitements antibiotiques efficaces. En effet, le nombre de publications concernant cette famille d'antibiotiques est passé de 418 en 2019 à 511 en 2021, ce qui montre l'intérêt croissant pour cette classe. Cette tendance reflète la nécessité de trouver des alternatives efficaces aux antibiotiques actuels, compte tenu de l'augmentation de la résistance bactérienne.

Le criblage moléculaire basé sur le docking est une méthode informatique de plus en plus utilisée pour identifier de nouveaux composés qui peuvent inhiber l'ADN gyrase en se liant à des sites spécifiques sur l'enzyme. Cette méthode repose sur la prédiction de l'interaction entre une molécule et une cible protéique, à l'aide d'algorithmes de calcul intensifs(8). Le criblage moléculaire permet d'évaluer l'aptitude des molécules candidates à se lier à des sites actifs sur la cible, ce qui peut conduire à la découverte de nouveaux composés inhibiteurs de l'ADN

gyrase. Cette approche est particulièrement utile car elle permet de cibler des sites spécifiques sur l'enzyme, ce qui peut améliorer la sélectivité et l'efficacité des traitements. En conséquence, le criblage moléculaire basé sur le docking est une méthode prometteuse pour la découverte de nouveaux inhibiteurs de l'ADN gyrase, qui peut contribuer à la lutte contre la résistance aux antibiotiques et à l'amélioration des traitements des infections bactériennes.

Le QSAR (Relation Structure-Activité Quantitative) est une approche de modélisation de plus en plus utilisée pour prédire l'activité biologique d'une molécule en fonction de sa structure chimique. En combinant le criblage moléculaire basé sur le docking et le QSAR, il est possible de concevoir de nouveaux antibiotiques inhibiteurs de l'ADN gyrase avec des propriétés optimisées. Cette approche permet de prédire l'activité biologique des composés potentiels, ce qui permet d'optimiser les propriétés physicochimiques et pharmacologiques des candidats antibiotiques. En utilisant le criblage moléculaire pour sélectionner les composés qui se lient le mieux à l'enzyme, puis en utilisant le QSAR pour prédire leur activité biologique, nous pouvons concevoir des composés avec des propriétés optimales telles que l'efficacité, la stabilité, la biodisponibilité et la sélectivité. L'approche combinée de criblage moléculaire et QSAR est donc très utile pour la découverte de nouveaux antibiotiques inhibiteurs de l'ADN gyrase, qui peuvent surmonter la résistance bactérienne et améliorer les traitements des infections bactériennes. En conséquence, la recherche continue sur cette approche peut contribuer à la lutte contre la résistance aux antibiotiques et à l'amélioration de la santé publique. (9).

Dans cette thèse, nous proposons d'utiliser une approche combinée de criblage moléculaire basé sur le docking et de QSAR pour concevoir de nouveaux antibiotiques inhibiteurs de l'ADN gyrase. Cette méthode permet de prédire l'interaction moléculaire d'un composé avec la cible protéique et son activité biologique, ce qui permet d'optimiser les propriétés pharmacologiques des candidats antibiotiques. En utilisant cette approche, nous synthétiserons une molécule parmi les candidats sélectionnés pour évaluer son activité bactéricide et étudier son mécanisme d'action. Nous espérons ainsi contribuer au développement de nouveaux antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques et améliorer la santé publique. L'utilisation de l'approche combinée de criblage moléculaire et QSAR peut fournir des informations précieuses pour la conception de nouveaux composés antibactériens efficaces, ce qui peut aider à surmonter la résistance bactérienne et améliorer l'efficacité des traitements antibiotiques. La synthèse et l'évaluation de nouveaux composés antibactériens peuvent également fournir de nouvelles cibles pour la découverte de nouveaux antibiotiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Objectifs :

L'objectif de cette thèse est de concevoir un nouvel antibiotique qui inhibe l'activité de l'enzyme ADN gyrase des bactéries, en utilisant une approche combinée de modélisation QSAR (Relation Quantitative Structure-Activité) et de criblage virtuel basé sur le docking moléculaire. Nous cherchons à évaluer l'activité inhibitrice de la nouvelle molécule candidate contre l'ADN gyrase, en prédire sa concentration minimale inhibitrice avec un modèle QSAR développé et validé et à synthétiser le produit candidat issu du docking, tout en l'identifiant par des méthodes de caractérisation moléculaire. Ensuite, nous évaluerons l'activité antibiotique de la nouvelle molécule candidate synthétisée contre différentes souches de bactéries. Finalement, nous discuterons des avantages et des limites de l'approche QSAR et du docking moléculaire dans la conception de nouveaux médicaments et de leur potentiel pour contribuer au domaine de la chimie médicinale.

L'objectif de ce travail consiste aussi à fournir des connaissances importantes pour la conception de nouveaux antibiotiques efficaces, en utilisant des techniques de modélisation moléculaire avancées et des méthodes de criblage virtuel, qui peuvent accélérer la découverte de nouveaux médicaments antibactériens.

Etude bibliographique

Partie 01 : Etude bibliographique :

1. Introduction :

Dans cette partie de la revue de la littérature, nous explorerons les différents aspects des infections bactériennes, des antibiotiques, des inhibiteurs de l'ADN gyrase, de l'ADN gyrase, du docking moléculaire et de la modélisation QSAR. Nous examinerons les mécanismes d'action des antibiotiques et des inhibiteurs de l'ADN gyrase, les méthodes de docking moléculaire utilisées pour étudier les interactions entre les antibiotiques et l'ADN gyrase, ainsi que les applications de la modélisation QSAR dans la conception de nouveaux composés chimiques actifs contre les infections bactériennes. Nous mettrons également en évidence les avancées récentes et les défis actuels dans ces domaines de recherche passionnants.

2. Objectif de l'étude bibliographique:

L'objectif global de la revue de la littérature est de fournir une vue d'ensemble approfondie et complète des différentes facettes des infections bactériennes, des antibiotiques, des inhibiteurs de l'ADN gyrase, de l'ADN gyrase, du docking moléculaire et de la modélisation QSAR. Cela inclut la définition et la classification des infections bactériennes, la présentation des différents types d'antibiotiques et de leurs mécanismes d'action, l'étude pharmaco-chimique des inhibiteurs de l'ADN gyrase, l'étude enzymatique de l'ADN gyrase, ainsi que les principes et les modalités du docking moléculaire et de la modélisation QSAR. L'ensemble de ces chapitres vise à fournir une base solide de connaissances pour comprendre les aspects clés des infections bactériennes et de la recherche sur les antibiotiques, en mettant l'accent sur l'ADN gyrase comme cible majeure, ainsi que sur les méthodes *in silico* telles que le docking moléculaire et la modélisation QSAR dans la recherche et le développement de nouveaux agents antibactériens.

Chapitre 1 :

Les infections

bactériennes

1. Les infections bactériennes :

1.1.Introduction :

Les infections bactériennes sont un problème de santé mondial majeur, affectant des millions de personnes chaque année. Elles peuvent toucher diverses parties du corps, comme les voies respiratoires, le système urinaire, la peau, les tissus mous, les os, ainsi que le sang. Les infections bactériennes peuvent être aiguës ou chroniques(10), et peuvent varier en gravité, allant de légères à potentiellement mortelles. Les bactéries responsables des infections peuvent être de différents types, tels que les cocci, les bacilles, les spirilles, et les spirochètes(11), et peuvent causer une grande variété de symptômes chez les patients. La compréhension des bases de la pathogenèse bactérienne, y compris les facteurs de virulence et les mécanismes de résistance, est essentielle pour le développement de stratégies de prévention, de diagnostic et de traitement efficaces contre ces infections. Dans ce chapitre, nous examinerons la définition et la classification des infections bactériennes, en mettant en évidence les principaux types d'infections, les facteurs de risque associés, ainsi que les méthodes de diagnostic et de traitement couramment utilisées. Nous aborderons également les avancées récentes dans le domaine de la recherche sur les infections bactériennes(12), y compris les nouvelles approches thérapeutiques et les défis émergents tels que la résistance aux antibiotiques. Enfin, nous discuterons des perspectives futures et des besoins de recherche pour améliorer la prévention, le diagnostic et le traitement des infections bactériennes(13). Cette revue de la littérature vise à fournir une vision globale et actualisée des infections bactériennes, avec un accent sur leur impact clinique, les défis et les opportunités de recherche dans ce domaine critique de la santé publique.

1.2.Objectifs :

L'objectif de cette partie de la thèse est de définir les infections bactériennes et en expliquer les mécanismes sous-jacents, de présenter une classification des infections bactériennes basée sur différents critères tels que l'agent pathogène, le site d'infection, la gravité de l'infection, etc., de discuter des différents facteurs de risque associés aux infections bactériennes, tels que l'âge, l'immunodépression, les conditions médicales sous-jacentes, etc., et de mettre en évidence les conséquences potentiellement graves des infections bactériennes sur la santé humaine et animale.

1.3. Définition des infections bactériennes :

L'infection est l'invasion de l'hôte par des micro-organismes qui se multiplient ensuite en association étroite avec les tissus de l'hôte. Les bactéries peuvent provoquer une multitude d'infections différentes, dont la gravité va d'inapparente à fulgurante (14).

1.4. Epidémiologie des infections bactériennes et modes de transmission :

Les études épidémiologiques, dans le domaine des maladies infectieuses, visent à déterminer les mécanismes de transmission des agents infectieux et les facteurs qui favorisent la survenue de maladies chez les sujets contaminés. Le résultat de ces études peut permettre de mettre en place des mesures préventives.

Les infections bactériennes peuvent être transmises par voie aérienne, par voie digestive (ingestion d'eau ou d'aliments contaminés), par voie transcutanée (brèche cutanée, piqûre d'insecte), conjonctivale ou génitale. La transmission est le plus souvent interhumaine. Les pathogènes des voies respiratoires sont transmis par la toux (formation d'aérosols). D'autres pathogènes sont transmis par contact direct. Les pathogènes des voies digestives contaminent les mains du sujet infecté. Ils peuvent alors être transmis soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'aliments manipulés par le sujet contaminé. Dans les pays à faible niveau d'hygiène, les pathogènes des voies digestives, éliminés dans les fèces, peuvent contaminer les eaux consommées par la population. Les pathogènes des voies génitales sont transmis par les relations sexuelles. Dans de rares cas, la transmission peut être verticale, par voie transplacentaire (13).

1.5. Classification :

Il existe plusieurs types d'infections bactériennes qui peuvent affecter l'organisme humain. Tout d'abord, il y a les infections inapparentes qui ne présentent aucun symptôme détectable, comme la gonorrhée asymptomatique. Ensuite, il y a les infections latentes, qui sont des portages sains, tels que le portage sain de typhoïde. Les infections accidentelles sont causées par des expositions accidentelles ou des zoonoses, comme les cryptococcoses ou les accidents lors de manipulations de souches vivantes en laboratoire. Les infections opportunistes sont causées par la flore normale de l'hôte lorsque les défenses de l'organisme sont affaiblies, comme les infections à *Serratia*.

Les infections primaires sont cliniquement apparentes et sont causées par l'invasion et la multiplication du germe dans les cellules de l'hôte, comme dans le cas d'une infection à *Shigella*

dysenteriae. Les infections secondaires surviennent à la suite d'une infection primaire, comme les pneumonies bactériennes qui surviennent après une longue infection virale. Les infections mixtes sont celles où plusieurs germes infectent un seul tissu, tel que dans le cas d'un abcès anaérobique causé par *Escherichia coli* et *Bacteroides fragilis*.

Les infections peuvent être aiguës et se développer rapidement, comme dans le cas de la diphtérie. Elles peuvent également être chroniques et durer longtemps, comme dans le cas d'une gastrite à *Helicobacter Pylori*. Les infections localisées sont limitées à une petite zone, comme les staphylococcies, tandis que les infections généralisées se disséminent dans plusieurs régions de l'organisme, telles que les bactériémies Gram négatives.

Certaines infections bactériennes sont pyogènes, ce qui signifie qu'elles forment du pus, comme les infections à streptocoque pyogène. Les infections rétrogrades surviennent lorsque les microbes remontent un conduit ou un tube contre le sens des sécrétions ou des excréctions, telles que les infections urinaires à *E. coli*. Enfin, il existe des infections fulminantes qui se produisent soudainement et de manière intense, comme les infections à *Yersinia pestis* (15).

1.6. Conflit hôte bactérie :

La sensibilité aux infections bactériennes dépend de l'état physiologique et immunologique de l'hôte et de la virulence de la bactérie. Avant que des quantités accrues d'anticorps spécifiques ou de cellules T ne soient formées en réponse à l'invasion de pathogènes bactériens, les mécanismes "non spécifiques" de résistance de l'hôte (tels que les neutrophiles et les macrophages) doivent défendre l'hôte contre les microbes. Le développement d'une immunité spécifique efficace (telle qu'une réponse anticorps contre la bactérie) peut prendre plusieurs semaines. La flore bactérienne normale de la peau et des surfaces muqueuses sert également à protéger l'hôte contre la colonisation par des pathogènes bactériens. Chez la plupart des individus en bonne santé, les bactéries de la flore normale qui pénètrent occasionnellement dans l'organisme (par exemple, lors d'une extraction dentaire ou d'un brossage de dents de routine) sont éliminées par les mécanismes cellulaires et humoraux de l'hôte. En revanche, les personnes dont les réponses immunitaires sont défailtantes sont sujettes à des infections fréquentes et récurrentes par des bactéries même les moins virulentes. L'exemple le plus connu de cette sensibilité est le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), dans lequel les lymphocytes auxiliaires CD4+ sont progressivement décimés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (16).

1.7. Mécanismes de pathogénicité :

1.7.1. Infectivité bactérienne :

Les facteurs qui sont produits par un micro-organisme et qui évoquent une maladie sont appelés facteurs de virulence. Il s'agit par exemple des toxines, des couches superficielles qui inhibent la phagocytose et des récepteurs de surface qui se lient aux cellules hôtes. La plupart des pathogènes bactériens francs (par opposition aux pathogènes opportunistes) ont développé des facteurs de virulence spécifiques qui leur permettent de se multiplier dans leur hôte ou leur vecteur sans être tués ou expulsés par les défenses de l'hôte. De nombreux facteurs de virulence ne sont produits que par des souches virulentes spécifiques d'un micro-organisme. Par exemple, seules certaines souches d'*E. Coli* sécrètent des entérotoxines diarrhéiques. Les facteurs de virulence ne doivent jamais être considérés indépendamment des défenses de l'hôte ; l'évolution clinique d'une maladie dépend souvent de l'interaction des facteurs de virulence avec la réponse de l'hôte. Une infection commence lorsque l'équilibre entre la pathogénicité bactérienne et la résistance de l'hôte est rompu. L'essentiel, nous vivons dans un environnement qui favorise le microbe, simplement parce que le taux de croissance des bactéries dépasse de loin celui de la plupart des cellules eucaryotes. En outre, les bactéries sont beaucoup plus polyvalentes que les cellules eucaryotes en ce qui concerne l'utilisation des substrats et la biosynthèse. Le taux de mutation élevé des bactéries, combiné à leur courte durée de génération, permet une sélection rapide des souches et des espèces les mieux adaptées. En général, les bactéries sont beaucoup plus résistantes aux composants toxiques présents dans l'environnement que les eucaryotes, notamment lorsque les principales barrières des eucaryotes (peau et muqueuses) sont franchies (17).

1.7.2. Résistance de l'hôte :

Bien que facilement endommagée, la peau représente l'une des plus importantes barrières de l'organisme au monde microbien, qui contient un ensemble varié de bactéries en nombre énorme. Heureusement, la plupart des bactéries présentes dans l'environnement sont relativement bénignes pour les personnes ayant un système immunitaire normal. Cependant, les patients immunodéprimés, comme les personnes qui suivent une chimiothérapie contre le cancer ou qui sont atteintes du sida, les agents pathogènes microbiens opportunistes peuvent causer des infections mortelles. Normalement, les microbes présents dans l'environnement sont empêchés de pénétrer dans l'organisme par la peau et les muqueuses. La surface extérieure de la peau est constituée d'un épithélium de cellules squameuses, composé en grande partie de cellules mortes qui sont éliminées au fur et à mesure que de nouvelles cellules se forment en

dessous. En plus de la barrière cutanée, les muqueuses du système respiratoire, gastro-intestinal et urogénital représentent d'autres portails par lesquels les bactéries peuvent accéder au corps. Comme les cellules épithéliales squameuses de la peau, les cellules épithéliales des muqueuses se divisent rapidement et, à mesure que les cellules mûrissent, elles sont poussées latéralement vers la lumière intestinale et se détachent. L'ensemble du processus ne nécessiterait que 36 à 48 heures pour le remplacement complet de l'épithélium, ce qui diminue le nombre de bactéries associées à l'épithélium. La surface de la peau est un environnement sec et acide, et la température est inférieure à 37° C. Les pores et les crevasses de la peau sont également colonisés par la "flore bactérienne normale", qui assure la compétition pour les agents pathogènes auxquels la peau est exposée. De même, la couche muqueuse qui recouvre l'épithélium contient des substances hostiles à la colonisation microbienne. Les niveaux protecteurs de lysozyme, de lactoferrine et de lactoperoxydase dans le mucus tuent les bactéries ou limitent leur croissance. En outre, le mucus contient des immunoglobulines sécrétatoires (principalement les IgA) synthétisées par les plasmocytes résidant dans le tissu sous-muqueux. A l'état normal, les individus développent des anticorps locaux spécifiques pour une variété de bactéries intestinales qui colonisent les surfaces muqueuses (18).

1.7.3. Echappement au système immunitaire :

En dehors des mécanismes de résistance à la phagocytose qui ont été évoqués précédemment, les bactéries pathogènes peuvent utiliser différents moyens pour échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Les bactéries à Gram négatif pathogènes sont généralement résistantes à l'action du complément grâce à des structures de surface qui empêchent l'activation du complément ou bien empêchent l'insertion du complexe lytique dans la membrane externe. Certaines bactéries produisent des IgA protéases qui inactivent les molécules d'IgA présentes dans les sécrétions muqueuses. Pour échapper à la reconnaissance par les anticorps produits par l'hôte, plusieurs espèces bactériennes sont capables de faire varier leurs antigènes de surface. Chez certaines bactéries les variations antigéniques peuvent se réaliser à une fréquence élevée, grâce à des éléments génétiques mobiles. On peut donner comme exemples les variations de phase intéressant les flagelles de salmonelles et les variations antigéniques portant sur les pili de *Neisseria gonorrhoeae* (13).

1.7.4. Bases génétiques et moléculaires de la virulence :

Les facteurs de virulence des bactéries peuvent être codés sur l'ADN chromosomique, l'ADN des bactériophages, les plasmides ou les transposons, soit dans les plasmides, soit dans le

chromosome bactérien. Par exemple, la capacité de l'espèce *Shigella* à envahir les cellules est une propriété codée en partie sur un plasmide de 140 mégadaltons. De même, l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli* est codée sur le plasmide, tandis que la toxine thermolabile est codée sur le chromosome. D'autres facteurs de virulence sont acquis par les bactéries suite à l'infection par un bactériophage particulier, qui intègre son génome dans le chromosome bactérien par le processus de lysogénie. Les bactériophages tempérés servent souvent de base à la production de toxines chez les bactéries pathogènes. Citons par exemple la production de toxines diphtériques par *Corynebacterium diphtheriae*, la formation de toxines érythrogyènes par *Streptococcus pyogenes*, la synthèse de toxines de type Shiga par *E. coli* et la production de toxines botuliques (types C et D) par *Clostridium botulinum*. D'autres facteurs de virulence sont codés sur le chromosome bactérien (par exemple, la toxine du choléra, l'entérotoxine de *Salmonella* et les facteurs d'invasion de *Yersinia*) (17).

1.7.5. Pathogénèse à médiation par l'hôte :

La pathogénèse de nombreuses infections bactériennes ne peut être séparée de la réponse immunitaire de l'hôte, car une grande partie des dommages tissulaires est causée par la réponse de l'hôte plutôt que par des facteurs bactériens. Des exemples classiques de pathogénèse à médiation par la réponse de l'hôte sont observés dans des maladies telles que la septicémie à bactéries Gram négatif, la tuberculose et la lèpre tuberculeuse. Dans ces infections, les lésions tissulaires sont causées par des facteurs toxiques libérés par les lymphocytes, les macrophages et les neutrophiles polymorphonucléaires qui s'infiltrent dans le site de l'infection. Souvent, la réponse de l'hôte est si intense que les tissus de l'hôte sont détruits, ce qui permet aux bactéries résistantes de proliférer. Dans la lèpre lépreuse, en revanche, l'absence de réponse cellulaire à *Mycobacterium leprae* permet aux bactéries de se multiplier en si grand nombre dans la peau qu'elles deviennent étroitement tassées et remplacent les tissus sains. La base moléculaire de cette anergie immunitaire spécifique est mal comprise (19).

1.7.6. Croissance intracellulaire :

Certaines bactéries survivent au milieu intracellulaire en produisant des phospholipases pour dissoudre la vésicule phagocytaire qui les entoure. Cela semble être le cas de *R. rickettsii*, qui détruit la membrane phagosomale avec laquelle les lysosomes fusionnent. *Legionella pneumophila*, qui préfère l'environnement intracellulaire des macrophages pour sa croissance, semble induire sa propre absorption et bloque la fusion lysosomale par des mécanismes indéfinis. D'autres bactéries ont évolué au point de préférer l'environnement à faible pH des

granules lysosomaux, comme c'est le cas pour *Coxiella burnetii*, un membre très résistant du groupe des rickettsies. Les espèces de *Salmonella* et de *Mycobacterium* semblent également très résistantes à la destruction intracellulaire par les cellules phagocytaires, mais leurs mécanismes de résistance ne sont pas encore entièrement compris. Il est certain que la capacité des bactéries à survivre et à se multiplier dans les cellules hôtes a un impact important sur la pathogénèse des infections respectives (20).

1.8. Facteurs de virulence spécifiques :

Les facteurs de virulence des bactéries peuvent être divisés en plusieurs types :

- Facteurs d'adhésion et de colonisation
- Facteurs d'invasion
- Capsules et autres composants de surface
- Endotoxines(16)

1.9. Activité biologique des endotoxines :

Les effets biologiques de l'endotoxine ont été largement étudiés. Le lipide A purifié (conjugué à l'albumine du sérum bovin) et l'endotoxine provoquent les mêmes réponses biologiques. Les effets toxiques les plus pertinents comprennent la pyrogénicité, la leucopénie suivie de leucocytose, l'activation du complément, la dépression de la pression sanguine, la mitogénicité, l'induction de la synthèse des prostaglandines et l'hypothermie. Ces événements peuvent aboutir à une septicémie et à un choc mortel. Toutefois, il convient de noter, que tous les effets de l'endotoxine ne sont pas nécessairement néfastes ; plusieurs induisent des réponses potentiellement bénéfiques pour l'hôte (20).

1.10. Diagnostic :

Il est essentiel de préparer adéquatement les échantillons cliniques aux fins de l'identification des organismes. Une description complète des paramètres de diagnostic dépasse le cadre de ce texte ; Toutefois, il est important de mentionner un certain nombre de techniques classiquement utilisées dans le laboratoire clinique. Dans la plupart des cas, l'isolement des organismes peut être réalisé en utilisant des méthodes de culture dans un milieu défini, ce qui permet également la détermination de la sensibilité aux antibiotiques. La croissance sur La gélose au sang peut déterminer la présence de colonies hémolytiques, comme on le voit avec les streptocoques b-hémolytiques. Les organismes peuvent être détectés par visualisation au moyen de taches spécifiques et des caractéristiques morphologiques correspondantes. Par

exemple, une réaction gram-négative représente un organisme dont l'enveloppe cellulaire présente une membrane externe avec seulement une fine couche de peptidoglycane ; une réaction gram-positif est indicative d'une cellule enveloppe avec une épaisse paroi cellulaire de peptidoglycane et sans membrane. En revanche, une enveloppe cellulaire acido-résistante est une enveloppe qui a une épaisse couche de peptidoglycane semblable aux bactéries gram-positives, mais qui contient une forte concentration de cire, les acides gras à longue chaîne (acides mycoliques), comme on l'a vu avec les espèces mycobactériennes. Et les tests biochimiques, tels que ceux pour catalase et coagulase, sont des marqueurs importants pour les organismes connus pour perturber les tissus et les vaisseaux de coagulation pendant l'infection. D'autres méthodes font appel à des techniques moléculaires, telles que l'utilisation de la réaction en chaîne de la polymérase pour amplifier des séquences de nucléotides uniques. Méthodes basées sur les anticorps, telles que l'immuno essai enzymatique et l'agglutination peuvent détecter des espèces et des sérovars spécifiques antigènes. Enfin, la détection des anticorps peut également indiquer la présence d'organismes dans l'hôte, avec isotype d'anticorps identification indiquant une infection présente ou passée (21).

Chapitre 2 :

Les antibiotiques

2. Les antibiotiques :

2.1.Introduction :

Les antibiotiques sont des médicaments utilisés pour traiter les infections bactériennes et sont devenus un outil essentiel dans la lutte contre les maladies infectieuses. Depuis leur découverte, les antibiotiques ont permis de sauver de nombreuses vies en éliminant ou en inhibant la croissance de bactéries pathogènes. Cependant, l'utilisation généralisée des antibiotiques a également conduit à l'émergence de la résistance aux antibiotiques, ce qui constitue un défi majeur pour la santé publique dans le monde entier. Comprendre les différentes classes d'antibiotiques, leur mode d'action, leur spectre d'activité, leur pharmacocinétique et leur utilisation appropriée est essentiel pour optimiser leur efficacité dans le traitement des infections bactériennes, ainsi que pour prévenir la résistance aux antibiotiques. Dans ce chapitre, nous passerons en revue les principaux types d'antibiotiques, leur mécanisme d'action, leur spectre d'activité, ainsi que les défis et les perspectives dans l'utilisation des antibiotiques dans la gestion des infections bactériennes. Nous aborderons également les approches émergentes pour la découverte de nouveaux antibiotiques, ainsi que les stratégies de prévention et de gestion de la résistance aux antibiotiques. Une compréhension approfondie des antibiotiques est essentielle pour les professionnels de la santé, les chercheurs et les décideurs afin de faire face efficacement à l'évolution constante des défis liés aux infections bactériennes et à la résistance aux antibiotiques.

2.2.Objectifs :

L'objectif de ce chapitre consiste à présenter les différents types d'antibiotiques, tels que les bêta-lactamines, les aminoglycosides, les quinolones, etc., et expliquer leur mode d'action, les classer en fonction de leur spectre d'activité, de leur mécanisme d'action, de leur voie d'administration, etc. et à discuter des mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries, ainsi que des conséquences de la résistance aux antibiotiques sur la santé publique.

2.3.Réflexions générales :

Prescrire un ou des antibiotiques pour traiter un syndrome infectieux voire une fièvre est une tentation permanente pour la plupart des praticiens. Les conséquences épidémiologiques et économiques d'une antibiothérapie mal conduite n'autorisent plus un choix affectif. L'évolution des connaissances fondamentales moléculaires et pharmacodynamiques a progressivement modifié bon nombre d'idées reçues et même de règles de prescription des antibiotiques. De

nouvelles familles d'antibiotiques, de nouvelles molécules, de nouvelles formes d'utilisation, l'identification de nouvelles maladies infectieuses nous conduisent en permanence à moduler nos comportements. Récemment, la mise à disposition en médecine communautaire des céphalosporines dites de troisième génération, des fluoroquinolones systémiques illustre parfaitement ces propos (22).

En pratique médicale, les prescriptions antibiotiques sont parmi les plus usuelles. Cette grande fréquence impose d'autant plus de prudence que les conséquences de cette prescription sont importantes : toute antibiothérapie se doit d'abord d'être efficace. Pour ce faire, elle doit être ciblée. Le succès est d'autant plus impératif que l'infection risque d'être sévère. Elle doit aussi respecter au mieux l'écologie bactérienne. Cette notion peut paraître accessoire, elle ne l'est pas : toute prescription inadaptée participe à une pression de sélection sur des germes, qui réduit potentiellement l'efficacité des molécules antibiotiques. Si un antihypertenseur garde ses propriétés, quelles que soient ses modalités de prescription, il n'en est pas de même pour l'antibiotique. C'est la raison pour laquelle toute antibiothérapie doit être raisonnée et justifiée. En toutes circonstances cette démarche intellectuelle est à la fois possible et impérative (23).

2.4. Indications de l'antibiothérapie :

Au cours d'une infection, l'apport d'un médicament ne se conçoit que si ce dernier supplée ou renforce une fonction biologique et plus particulièrement toute fonction liée à la capacité de l'hôte à juguler les effets pathogènes directs ou indirects de micro-organismes endogènes ou exogènes. Ainsi, les antibiotiques, concept naturel mais de plus en plus concept de synthèse en fonction des besoins, sont des molécules capables d'inhiber la croissance et/ou de tuer certains micro-organismes *in vitro*, leur efficacité *in vivo* étant optimale en présence de cellules humaines dont c'est le rôle naturel. Parmi les agents anti-infectieux, la principale originalité des antibiotiques est leur activité antimicrobienne et plus modestement antifongique qui les oppose de principe aux médicaments antiviraux, antihelminthiques et anti-protistes, même si certains antibiotiques ont occasionnellement des activités de ce type bien mises en évidence dans le traitement des infections opportunistes. Le plus bel exemple est celui des pneumopathies à *Pneumocystis carinii* survenant au cours du SIDA et le plus souvent parfaitement contrôlées par l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (22).

Avant les antibiotiques, le pourcentage de décès ou de séquelles graves était pratiquement de 100 % pour les méningites suppurées à pneumocoques. L'antibiothérapie a réduit ce pourcentage à 10-30 % selon les séries rapportées (24).

L'antibiothérapie seule n'est pas apte à régler toute infection bactérienne. Les indications, y compris pour les germes sensibles, doivent toujours être discutées en fonction du terrain et des circonstances qui accompagnent et parfois génèrent l'infection elle-même (25).

Si l'on fait référence au terrain, les indications d'une antibiothérapie prennent essentiellement en compte le risque potentiel d'infections graves et/ou nosocomiales sans attendre l'identification microbiologique de l'infection. C'est le type même d'indication où se confond la nature curative et préventive de l'antibiothérapie (18).

2.5. Mécanismes d'actions des antibiotiques :

A partir de la découverte de la pénicilline G par Flemming en 1928 (26,27), les découvertes de molécules nouvelles se sont succédées : céphalosporines, streptomycine, tétracyclines, chloramphénicol, etc.

L'abondance des molécules a rendu nécessaire leur classification en fonction de leur mode d'action, les différents mécanismes d'action sont résumés sur la (figure 01).

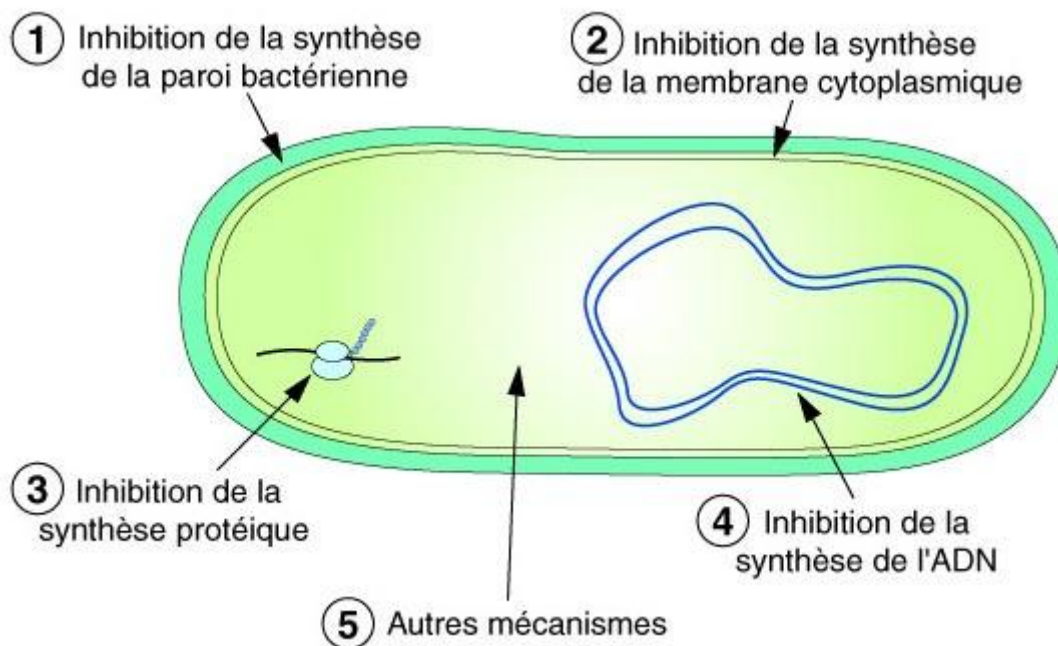


Figure 01 : mécanisme d'action des antibiotiques

2.5.1. Inhibition de synthèse de la paroi bactérienne :

Trois classes d'antibiotiques sont concernées : les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine. Les β -lactamines se fixent sur des protéines de la membrane cytoplasmique : les protéines liant les pénicillines (PLP), les β -lactamines présentent une analogie structurale avec

un constituant du peptidoglycane en formation, elles agissent en « substrat suicide » et bloquent le fonctionnement des PLP, inhibant ainsi la formation du peptidoglycane. Les glycopeptides se fixent sur la partie peptidique du peptidoglycane, cette fixation du type clé-serrure empêche le fonctionnement normal des transpeptidases et des transglycosidases, entraînant l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane et secondairement la mort de la bactérie. La fosfomycine pénètre dans le cytoplasme bactérien par transport actif, et inhibe les premières étapes de la synthèse du peptidoglycane en se fixant sur une enzyme, la pyruvyltransférase, impliquée dans la formation d'un précurseur du peptidoglycane (27).

2.5.2. Inhibition de la synthèse des protéines :

Les antibiotiques de cette catégorie les plus importants en thérapeutique sont les aminosides, les macrolides, les tétracyclines et la rifampicine.(27) Les aminosides sont des inhibiteurs de la synthèse protéique des bactéries. Ils se fixent de manière irréversible sur la sous-unité 30S du ribosome procaryote, plus précisément sur certaines des 21 protéines ribosomales de cette sous-unité ainsi que sur la molécule d'ARN ribosomique (ARNr) 16S. La fixation irréversible d'un aminoside sur le ribosome bactérien entraîne des perturbations dans la synthèse des protéines : soit en empêchant l'initiation de la traduction des molécules d'ARN messenger (ARNm) ; soit en provoquant la fin prématurée de la synthèse du polypeptide (28). Les macrolides et apparentés vont agir en inhibant la synthèse protéique bactérienne par fixation réversible à la sous-unité 50 S du ribosome, plus précisément au niveau du complexe 23S du ARNr. Ils vont ainsi inhiber la peptidyl-transférase, ce qui va empêcher l'intégration des nouveaux acides aminés formés aux chaînes peptidiques. L'arrêt de la synthèse protéique conduit à la mort de la bactérie (29). Les tétracyclines sont des inhibiteurs de traduction. Après pénétration dans la cellule par diffusion passive (membrane externe) et transport actif (membrane cytoplasmique), les tétracyclines vont se lier de façon irréversible sur un site de forte affinité de la sous-unité 30 S du ribosome et sur des sites de faible affinité des sous-unités 30S et 50S. Elles vont ainsi empêcher la liaison de l'ARN de transfert bactérien (ARNt) à son site accepteur, ce qui va empêcher l'élongation de la chaîne peptidique en cours de formation. Leur activité procède également d'une inhibition des systèmes enzymatiques par complexation ionique. Ce sont des antibiotiques bactériostatiques (30).

2.5.3. Inhibition du fonctionnement de l'ADN :

Les bactéries procèdent deux types d'ADN : ADN chromosomique et le plasmide (31), dont le premier est indispensable à la survie de la cellule (32), les antibiotiques qui provoquent un

dysfonctionnement de ce dernier sont bactéricides.(1) les quinolones sont des antibiotiques bactéricides inhibiteurs de l'ADN Gyrase qui est une enzyme qui assure le surenroulement négatif de l'ADN lors de la réplication, la bactéricide s'expliquerait par la stabilisation des coupures d'ADN qui déclencherait les phénomènes d'autolyse (27). Les antibiotiques imidazolés se fixent sur des protéines réductrices causant ainsi l'accumulation de radicaux libres toxiques, capables d'oxyder l'ADN bactérien et de le couper (33). Les sulfamides et le triméthoprim sont des inhibiteurs compétitifs de la dihydrofolate synthétase et de la dihydrofolate réductase respectivement, ils diminuent la synthèse de l'ADN, ce qui ralentit la croissance bactérienne (34).

2.5.4. Destruction de la membrane cytoplasmique :

La colistine est le représentant le plus connu, elle est capable de détruire la membrane cytoplasmique après avoir désorganisé la membrane externe des bactéries à Gram négatif (27).

2.6.Principaux modes de résistance des bactéries :

- Ne pas accumuler l'antibiotique : imperméabilité et/ou efflux.
- Inactiver l'antibiotique.
- Changer la cible.

2.7.Critères de choix du traitement antibiotique :

Le choix d'un antibiotique fait appel à des notions de bases communes à toute prescription d'antibiotique quels que soient le type d'antibiotique, l'infection à traiter ou le terrain sur lequel se développe l'infection et à des notions plus spécifiques propres à chaque situation (35).

2.7.1. Le spectre d'activité :

La sensibilité des germes aux antibiotiques s'établit selon des données expérimentales permettant de classer les antibiotiques en molécules à spectre très large, large, moyen ou étroit. Selon leur activité prédominante et souvent largement consacrés par l'usage, certains antibiotiques sont classés par affinité antibactérienne (36).

2.7.2. Modalités de l'effet antibactérien :

Les antibiotiques peuvent être classés en bactériostatiques, inhibiteurs de la croissance bactérienne et bactéricides lorsque in vitro le nombre de germes survivants après 24 heures de contact est inférieur ou égal à 0,01 %. Les infections sévères et les infections chroniques sont le plus souvent traitées avec une antibiothérapie bactéricide. Dans les associations d'antibiotiques l'effet bactéricide est de principe recherché (37).

2.7.2.1. Les antibiotiques bactéricides :

- Aminoglycosides: tobramycine, gentamicine, amikacine.
- Béta-lactamines : (penicillines, céphalosporines, carbapénèmes): Amoxicilline, céfazoline, meropenème.
- Fluoroquinolones: ciprofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine.
- Glycopeptides: vancomycine.
- Lipopeptides cycliques: daptomycine.
- Nitroimidazolés: métronidazole (38).

2.7.2.2. Les antibiotiques bactériostatiques :

- Glycylcyclines: tigecycline.
- Tétracyclines: doxycycline, minocycline.
- Lincosamides: clindamycine.
- Macrolides: azithromycine, clarithromycine, erythromycin.
- Oxazolidinones: linezolide.
- Sulfonamides: sulfaméthoxazole (39).

2.7.3. Propriétés pharmacocinétiques :

Pour qu'un antibiotique soit actif sur un germe, il est essentiel qu'il le rencontre et ce pendant le temps nécessaire à l'efficacité de l'échange. C'est dire l'importance qu'il y a à connaître les capacités d'un antibiotique à se concentrer en un site donné. La concentration tissulaire de l'antibiotique doit être au moins égale à la CMI et si possible à la concentration minimale bactéricide (CMB) de la bactérie visée. Quelle que soit la voie d'administration de l'antibiotique, les modalités de prescription doivent tenir compte de la résorption, de la diffusion, de l'élimination des molécules dont les différences peuvent être très importantes y compris pour des antibiotiques d'efficacité antimicrobienne semblable (40).

2.7.4. Modalité d'administration :

L'administration par voie parentérale et surtout intraveineuse est la modalité la plus sûre de prescription d'un antibiotique. Outre sa facilité d'observance, par cette voie l'antibiotique échappe à l'acidité gastrique ou aux actions des enzymes digestives rencontrées dans la prescription orale. De très nombreuses bêtalactamines sont inactivées par ouverture du cycle bêtalactame lors de la traversée gastrique. L'absorption d'un antibiotique par la muqueuse digestive est en grande partie conditionnée par sa liposolubilité et son degré d'ionisation. De ce fait les aminosides, les polymyxines, la vancomycine très hydrosolubles ne sont pas absorbés par la muqueuse digestive. Leur persistance dans la lumière digestive sous forme active

explique l'intérêt de leur administration orale dans la technique de décontamination digestive. Dans l'administration orale, le moment de la prise de l'antibiotique dans le nycthémère, en particulier par rapport aux repas, peut être un facteur de qualité de la biodisponibilité et de la tolérance du produit. Cependant, il existe de grandes variations dans l'absorption des antibiotiques et cette voie est peu utilisée pour traiter les infections sévères surtout lorsqu'elles s'accompagnent de troubles digestifs ou de prescriptions de médicaments antiacides. Néanmoins la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques oraux (céphalosporines, fluoroquinolones ayant une biodisponibilité souvent identique aux formes parentérales peut inciter à traiter dès le début certaines infections sévères par voie orale ou à prendre très rapidement un relais oral après un début de traitement par voie veineuse. Il en est ainsi des traitements de la plupart des pneumopathies communautaires dans le premier cas et des modalités de prescription de la plupart d'antibiotiques dans des méningites bactériennes dans le deuxième cas de figure, à condition toutefois que la posologie de l'antibiotique soit adaptée au besoin et en particulier eu égard aux concentrations tissulaires nécessaires. Dans l'administration parentérale, la voie veineuse assure rapidement un taux antibiotique efficace au site, le plus souvent avec un maximum de sécurité même en présence de troubles de l'hémostase. L'administration de l'antibiotique peut se faire en intraveineuse directe (bolus), soit le plus souvent en perfusions discontinues ou continues. L'apport d'antibiotiques en intraveineuse directe peut comporter des risques de surdosage, de toxicité, d'allergie sévère, d'arrêt cardiaque. Les injections directes lentes ou de courtes durées (30 à 90 minutes) sont habituelles. Les perfusions intermittentes de courtes durées sont ordinairement utilisées pour les bêtalactamines, les fluoroquinolones, les aminoglycosides alors que pour la vancomycine une perfusion de 2 heures assure une meilleure diffusion et une meilleure tolérance. Les perfusions intermittentes de longue durée sont utilisées pour la fusidine sodique, le cotrimoxazole (4-6 heures) la fosfomycine (4 heures). Les perfusions continues sur 24 heures sont utilisées surtout pour les antibiotiques temps dépendant à demi-vie courte lorsque des doses élevées doivent être employées ; par exemple 50 millions d'unités internationales de pénicilline G ou 12 g d'ampicilline dans le traitement d'une endocardite ou d'une méningite bactérienne. Quelle que soit la durée de la perfusion, le capital veineux doit rester la principale préoccupation. De même il faut tenir compte de la teneur en électrolytes des antibiotiques parfois très forte, en particulier en ce qui concerne l'apport sodique et potassique (41).

Le rythme d'administration des antibiotiques dépend de la demi-vie d'élimination propre à chaque antibiotique et de la nature de l'antibiotique selon qu'il est temps ou concentration

dépendant. Pour les aminosides, fluoroquinolones, métronidazole concentration dépendant, l'écart entre les doses peut être grand (12 à 24 heures) au prix d'une dose unitaire plus élevée. Pour les bêtalactamines, glycopeptides, temps dépendant, l'intervalle entre les doses est fonction de la demi-vie d'élimination. En principe, pour une antibiothérapie curative, le rythme correspond à quatre demi-vies alors que pour une antibioprophylaxie chirurgicale le rythme est plutôt d'un apport toutes les deux demi-vies (42).

2.7.5. Effets indésirables :

Comme tous les médicaments, les antibiotiques peuvent avoir des effets secondaires qui entraînent leur arrêt et sont parfois sources de réelles complications pour les patients. Un surcoût leur est attribué dont le taux peut être très élevé en fonction de la durée de la morbidité qu'ils ont créée. Ces effets indésirables sont de nature allergique imprévisibles, indépendants de la dose ou toxiques, prévisibles avec une relation effet dose reproductible. En principe, la survenue d'effets toxiques devrait être évitée dès lors que les posologies recommandées sont respectées ou adaptées évitant ainsi toute accumulation nocive. De ce point de vue, il est de plus en plus possible d'ajuster les posologies en fonction de dosage sanguin ou tissulaire des antibiotiques. Ce type de dosage est couramment réalisé pour une bonne adaptation des doses d'aminosides et des glycopeptides ou plus spécifiquement pour les doses d'ampicilline dans le traitement des méningites. Les antibiotiques peuvent être source d'interaction médicamenteuse soit avec d'autres antibiotiques, soit avec des produits non antibiotiques. Ainsi, dans le traitement de la brucellose par association de rifampicine et de doxycycline, il est nécessaire d'administrer séparément les deux antibiotiques, car la prise des deux antibiotiques diminue la demi-vie de la doxycycline (43).

2.8.Stratégie des indications :

L'indication la plus commune est celle décidée devant une infection aiguë à son début dont le diagnostic clinique ou microbiologique est des plus probables et définit de ce fait une antibiothérapie optimale antérieurement évaluée. Dans ce type d'indication, le choix de l'antibiotique se fait avant tout résultat des examens à visée microbiologique, le plus souvent mis en route dès le diagnostic évoqué, bien que de nombreux cliniciens optent sur le seul pari bactériologique pour traiter la plupart des infections communautaires de l'adulte ou lorsqu'il y a impossibilité de techniques quantitatives (maladie des griffes du chat) ou lorsque l'infection se développe dans un site habituellement contaminé (surinfection de bronchite chronique). Cette indication correspond le plus souvent à une monothérapie avec un antibiotique à spectre

le plus étroit possible. Quelques situations cliniques communautaires nécessitent en première intention une association d'antibiotiques à la seule condition que tous les prélèvements à visée diagnostique microbiologique aient été effectués, en particulier une série d'hémocultures et les prélèvements sur sites infectés (urines, liquide céphalorachidien etc...). Il s'agit des infections tuberculeuses, de la brucellose, des endocardites bactériennes, des septicémies secondaires à des thrombophlébites, des infections à germes multiples. A noter que quelques spécialités pharmaceutiques comportent dans leur formule deux antibiotiques reconnus pour leur synergie particulièrement efficace. C'est le cas des synergistines et de l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (22).

2.8.1. Association d'antibiotiques :

Une association d'antibiotiques a pour objectif un élargissement du spectre antibactérien, la recherche d'une synergie, d'un effet bactéricide maximal rapidement obtenu et la prévention de l'émergence de mutants résistants dont le risque est majeur lorsque l'inoculum est important ou lorsqu'il y a nécessité d'utiliser la rifampicine, la fosfomycine, l'acide fusidique ou les quinolones (37).

Par rapport à l'hôte, l'objectif essentiel est de favoriser l'observance donc la bonne tolérance des antibiotiques que ce soit en fonction de l'âge ou des capacités fonctionnelles des individus ou des modifications physiologiques, comme la grossesse. Le passage dans le lait maternel des antibiotiques est conditionné par leur poids moléculaire, leur forte liposolubilité et leur faible affinité aux protéines plasmatiques. Leur présence dans le lait peut être sans conséquence pour le nouveau-né. Ainsi les phénicolés sont éliminés dans le lait sous forme inactive, les aminosides ingérés ne seront pas absorbés par le tractus digestif du nourrisson et les cyclines seront complexées par le calcium alimentaire (44).

2.8.2. Immunodépression :

Le choix des antibiotiques doit également tenir compte des possibles déficits immunitaires de l'hôte. Selon le type d'immunodépression, le risque bactériologique diffère ce qui peut donc être un argument dans le choix des antibiotiques à utiliser. Ainsi une atteinte des cellules lymphocytaires T au même titre que l'immunodépression des diabétiques favorisera les infections à *Listeria monocytogenes*, à *Salmonella sp* ou à mycobactéries. Une atteinte de la lignée granulocytaire au cours d'une chimiothérapie favorisera les infections à staphylocoques ou à entérobactéries. Parmi les germes opportunistes ; certains sont ubiquitaires (*Candida sp*, *Aspergillus*), d'autres expriment une réactivation (mycobactérie, *Toxoplasma gondii*). A la

différence des infections communautaires à pyogènes, dans les infections de l'immunodéprimé les germes en cause sont habituellement en petit nombre et leur virulence plus en rapport avec le niveau d'immunosuppression (22).

2.9. Antibioprophylaxie :

Le terme d'antibioprophylaxie s'applique à tout usage d'un antibiotique ayant pour objectif de prévenir une infection ; c'est dire qu'il concerne les individus non infectés bien qu'ils puissent par ailleurs être porteurs de germes à potentiel pathogène (42).

2.9.1. Antibioprophylaxie chirurgicale :

L'antibioprophylaxie chirurgicale est indiquée chaque fois que le taux d'infections postopératoires documentées est élevé pour une chirurgie donnée et/ou chaque fois que le risque d'infection postopératoire même exceptionnel pour un type de chirurgie n'est pas acceptable compte tenu de sa gravité (42).

2.9.2. Antibioprophylaxie médicale :

A l'opposé de l'antibioprophylaxie chirurgicale, dans l'antibioprophylaxie médicale, la cible microbiologique est parfaitement identifiée. L'antibioprophylaxie peut être primaire ou secondaire. La prophylaxie primaire s'adresse à des sujets non infectés, mais à très haut risque. Il peut s'agir de sujets « contact », comme les proches d'un individu traité pour méningite à méningocoques ou de sujets que leur déficience immunitaire rend particulièrement vulnérables à telle ou telle infection (22).

Chapitre 3 :
Les inhibiteurs de
l'ADN Gyrase

3. Antibiotiques inhibiteurs de l'ADN Gyrase : les Quinolones :

3.1.Introduction :

Les pyridones β -carboxyliques ou 4-quinolones sont des agents antibactériens de synthèse qui ont été décrits en 1949. Barton et al ont breveté environ 80 molécules de cette famille chimique. En 1962, l'acide nalidixique a été décrit par Leshner et al. Les premiers travaux ont été réalisés à partir d'un contaminant d'un intermédiaire de synthèse de la chloroquine qui est une amino-4-quinoléine. L'acide nalidixique est la première molécule de la série des dérivés 1,8-naphtyridine. Le remplacement de l'atome d'azote en position 8 par un atome de carbone a donné naissance aux dérivés de type quinoléine, dont la première molécule utilisée en thérapeutique a été l'acide oxolinique. L'acide nalidixique est actif sur certaines espèces du genre des entérobactéries ; au moment de sa commercialisation en 1963, l'acide nalidixique a été réservé au traitement des infections urinaires. Malgré une tentative d'administration de l'acide nalidixique par voie intraveineuse, son usage dans le traitement des infections sévères est resté modeste du fait d'une activité modérée (concentration minimale inhibitrice [CMI] : 4 à 16 mg/L), de sa forte liaison aux protéines plasmatiques (92 à 97 %) et de sa mauvaise tolérance. Le développement des 4-quinolones s'est fait lentement, avec accroissement de l'activité antibactérienne avec la synthèse de l'acide oxolinique, qui est quatre fois plus actif que l'acide nalidixique. L'élargissement modéré du spectre antibactérien, mais non de l'activité, a été obtenu avec la synthèse de l'acide pipémidique (*Pseudomonas aeruginosa*) et de l'acide piromidique (*Staphylococcus aureus*) et de la fluméquine. L'acide pipémidique présente une résistance croisée partielle avec l'acide nalidixique. L'originalité chimique de l'acide pipémidique et de l'acide piromidique est de posséder un noyau aromatique en position 7 du cycle pyrido[2,3-b]pyrimidine. La fluméquine possède un atome de fluor. Les fluoroquinolones sont nées de l'idée d'associer un noyau aromatique en position 7, 7-pipérazine et un atome de fluor en position 6 du noyau quinoléine (péfloxacine, norfloxacine...) ou du noyau 1,8-naphtyridine (énoxacine). La norfloxacine a représenté une révolution microbiologique au sein des 4-quinolones, car elle est de dix à cent fois plus active que l'acide nalidixique et possède un large spectre antibactérien. Cependant, elle a l'inconvénient d'avoir une mauvaise biodisponibilité, ce qui empêche son utilisation dans les infections systémiques. L'introduction d'un méthyle en position 4' du cycle pipérazinique a résolu le problème cinétique, tout en diminuant modérément l'activité (péfloxacine). À partir de ces travaux initiaux, il a semblé indispensable d'optimiser l'association 7-pipérazinyle et 6-fluor. Cette optimisation a été obtenue par la substitution de l'azote en position 1 du noyau quinoléine par un groupement

cyclopropyle (ciprofloxacine) au lieu d'un groupement éthyle. D'autres substituants ont été fixés en position 1 : benzoxazine (ofloxacine), 2',4'-difluorophényle (témafloxacine), méthylamino (amifloxacine), oxétane. Les molécules obtenues possèdent un large spectre antibactérien et une activité bactéricide qui permet de traiter les infections sévères par voie orale ou parentérale (45).

3.2.Objectifs :

L'objectif de ce chapitre est de présenter l'ADN gyrase comme une cible majeure des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes, d'examiner la principale classe d'inhibiteurs de l'ADN gyrase, la classe des quinolones ; leur structure chimique, leur activité biologique, leur toxicité, etc.

3.3.Structure et nomenclature :

3.3.1. Dénomination scientifique : numérotation du squelette :

Dans toute quinolone, il est possible d'identifier un noyau commun A (acide alkyl-1 dihydro-1,4 oxo-4 pyridinecarboxylique-3) orthocondensé avec un cycle B de nature aromatique (figure 02). Bien entendu, la prééminence d'un noyau sur l'autre oriente le sens de numérotation du polycycle ainsi formé, la numérotation commence par l'azote du cycle A et enchaîne avec les autres atomes de ce cycle et passe par la suite au cycle B comme mentionné sur la (figure 02).

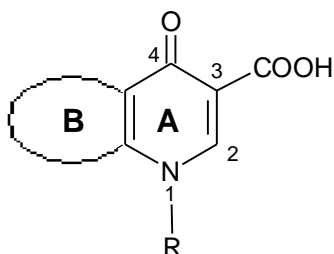
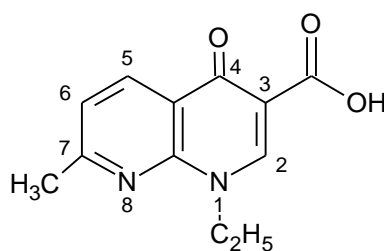


Figure 02 : structure générale des quinolones (34)

1^{er} exemple : acide nalidixique (NEGRAM)

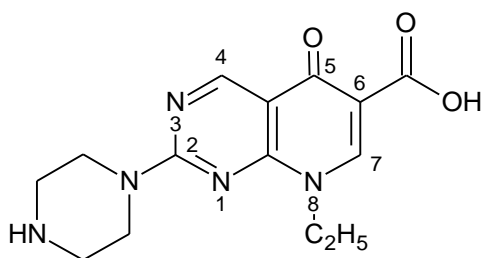


Acide ethyl-1 dihydro-1.4 méthyl-7 oxo-4 naphthyridine-1.8 carboxylique-3

Figure 03 : structure chimique de l'acide nalidixique NEGRAM[®] (34)

On notera que cette molécule, qui est à l'origine du nom générique des quinolones, ne présente pas l'architecture quinoléine (benzopyridine) mais un squelette naphthyridine-1.8 ou prido [2 ;3-b] pyridine.

2^o exemple : acide pipémidique (PIPRAM)



acide éthyl-8 dihydro-5.8 oxo-5 (pipérazinyl-1)-2 pyrido [2.3 d] pyrimidine carboxylique-6

Figure 4 : structure chimique de l'acide pipémidique PIPRAM[®] (34)

3.3.2. Dénominations communes :

- Les dérivés de quinolones de 1^{ère} génération sont généralement dénommés en rajoutant le terme acide ; Vraisemblablement d'une part, afin de rappeler la présence d'une fonction acide carboxylique sur le cycle A, qui participe avec le groupement B-carbonylé à un des mécanismes d'action (chélation des métaux) de ces antibiomimétiques, et d'autre part, afin de souligner le caractère acide ces premières quinolones : pKa1 = 5.6 à 6.4 (COOH)

- Les dérivés de quinones de 2^o génération (6-fluoro 7-pipérazine quinolones) par la présence en position 7 d'un cycle pipérazineque bénéficient au contraire d'un caractère amphotère, ce qui explique la commercialisation de certains d'entre eux sous forme de sels, et justifie l'abandon du terme « acide » pour un nouveau mode de dénomination, utilisant un segment-clef « oxacine » en suffixe.

Exemple : Ciprofloxacine introduite en thérapeutique sous forme de chlorhydrate (CIFLOX) voir (figure 05).

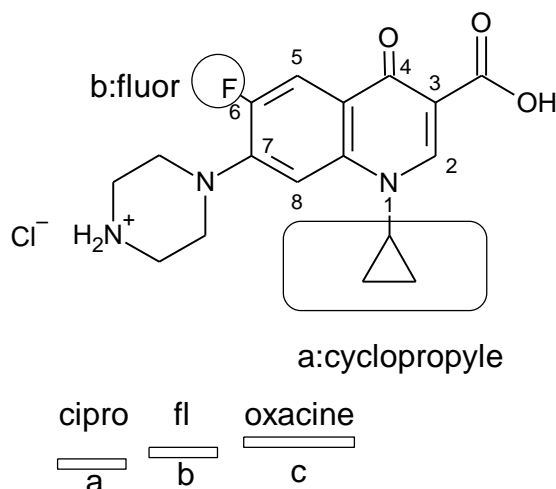


Figure 05 : dénomination commune des quinolones (34)

La partie « a » du nom provient d'un groupement spécifique à une molécule comme l'exemple sur la (figure 05), cipro provient du cyclopropyle, ou comme dans l'exemple de l'ofloxacine (figure 08) la partie « a » est représenté tout simplement par la lettre o (ofloxacine), cette dénomination provient de l'oxygène du cycle oxazinique.

La partie « b » représente le fluor présent dans la série des fluoroquinolones

La partie « c » ou oxacine peut être divisée en 3 parties « ox » par rapport à la fonction cétone en position 4, « ac » par rapport à la fonction acide en position 3 et « ine » par rapport à la fonction amine du cycle pipérazinique en position 7

3.4.Synthèse chimique : Méthode de GOULD et JACOB :

Le principe de cette méthode, mise à profit par G.LESHER pour synthétiser l'acide nalidixique, consiste à condenser une arylamine 1 avec l'éthoxyméthylènemalonate de diéthyle (EMME) en anilinométhylènemalonate de diéthyle 3 selon une réaction de Michaël (figure 06). Ce diester éthylique, soumis à un chauffage prolongé vers 250°C, conduit par cyclisation intramoléculaire aux systèmes bicycliques 4 à 6 qu'il convient d'abord d'alkyler en position 1, puis d'hydrolyser au niveau de la fonction ester-3 en acide carboxylique 8.

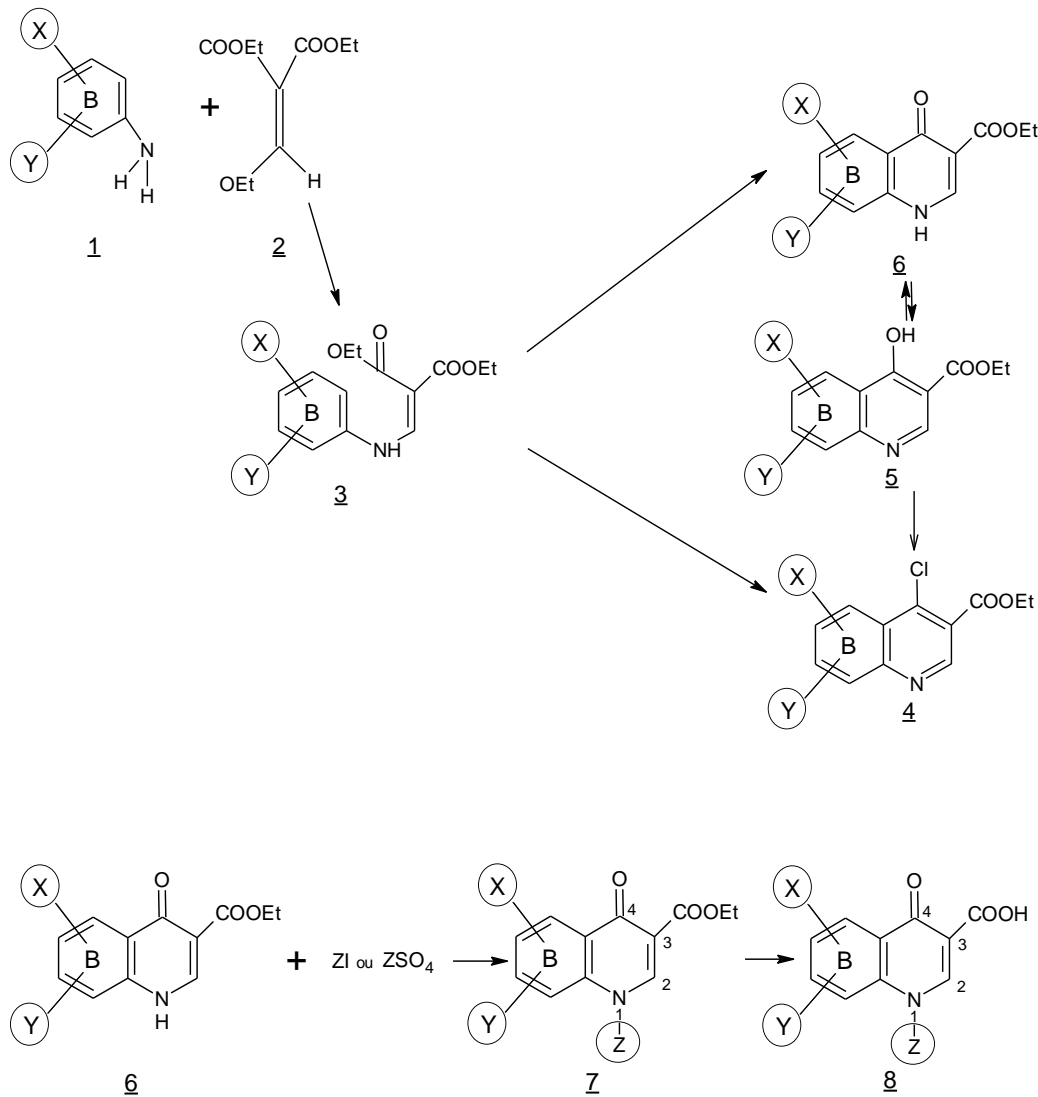


Figure 06 : synthèse chimique des quinolones (34)

La cyclisation de **3** est réalisée, soit au sein de solvant suffisamment stables à haute température (DOWTHERM*(solvant à base d'oxyde de diphenyle permettant d'atteindre une haute température), diphenyléther...), soit en présence d'agents de cyclisation (POCl_3 , acide polyphosphorique : PPA ou son ester éthylique) catalysée par divers sels (ZnCl_2 , NiSO_4 ...). L'équilibre tautomère permet d'expliquer l'obtention par alkylation de dérivés O-alkylés et N-alkylés **7** ; l'emploi de solvants aprotiques (DMF...) et de bases (K_2CO_3) favorise la N-alkylation recherchée. Par ailleurs, la nature et la position des substituants X et Y sur l'intermédiaire réactionnel **3**, oriente la fermeture du cycle. (la voie (a) de cyclisation étant dans cette exemple très favorisée, conduit à la quinolone recherchée).

Les quinolones de 2^{ème} génération, substituées en position 7 par un groupement pipérazinique, sont obtenues en mettant à profit l'activation de la position 7 par l'ensemble 4-pyridone.

La synthèse de l'ofloxacine (figure 08) utilise les différents réactifs et principes précédemment évoqués :

- constriction du cycle supplémentaire (oxacine), au départ d'un synthon préfigurant le cycle B
- création du noyau A ;
- substitution du système tricyclique par un reste pipérazinyle N-méthylé.

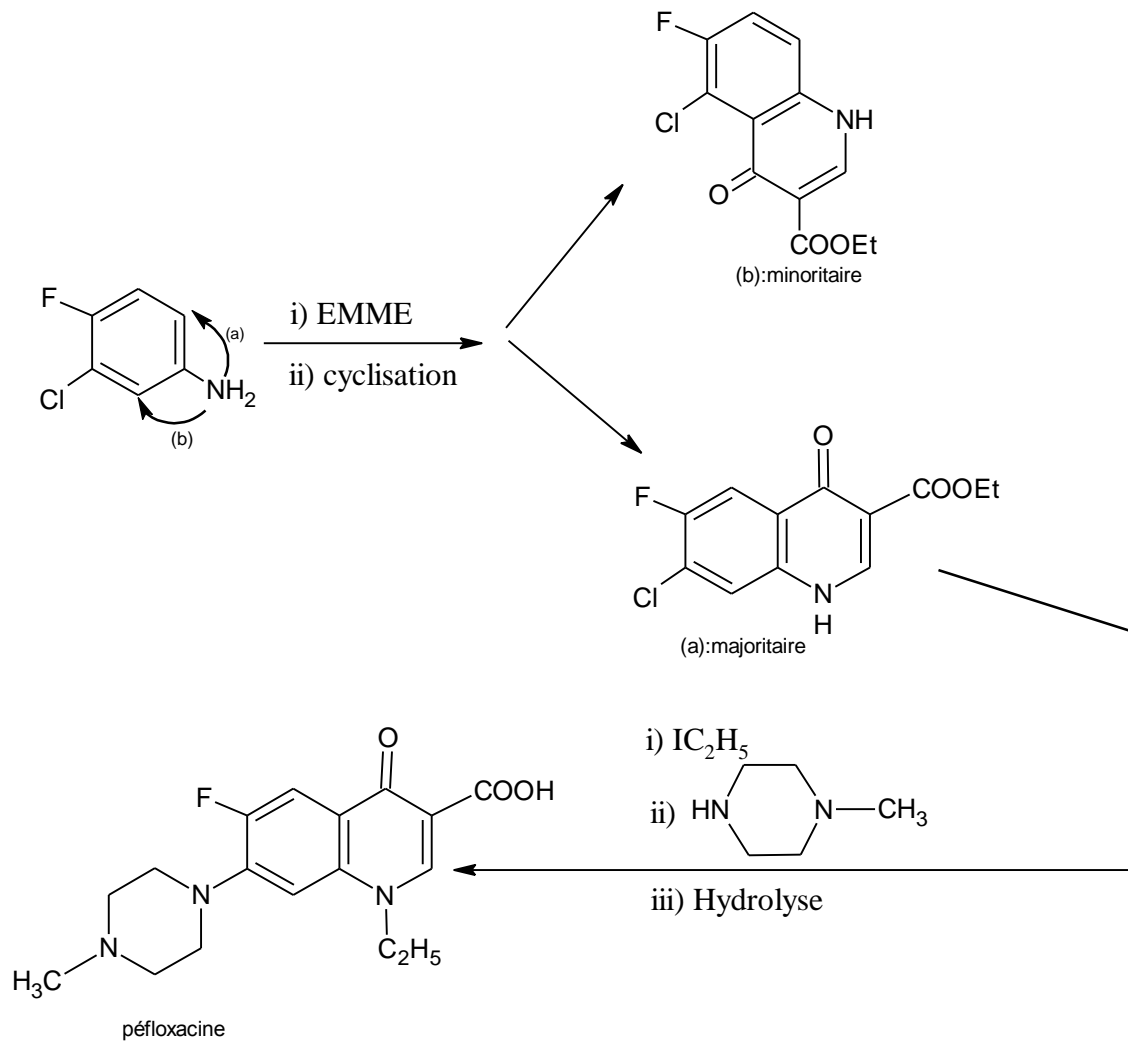


Figure 07 : synthèse de la péfloxacine(34)

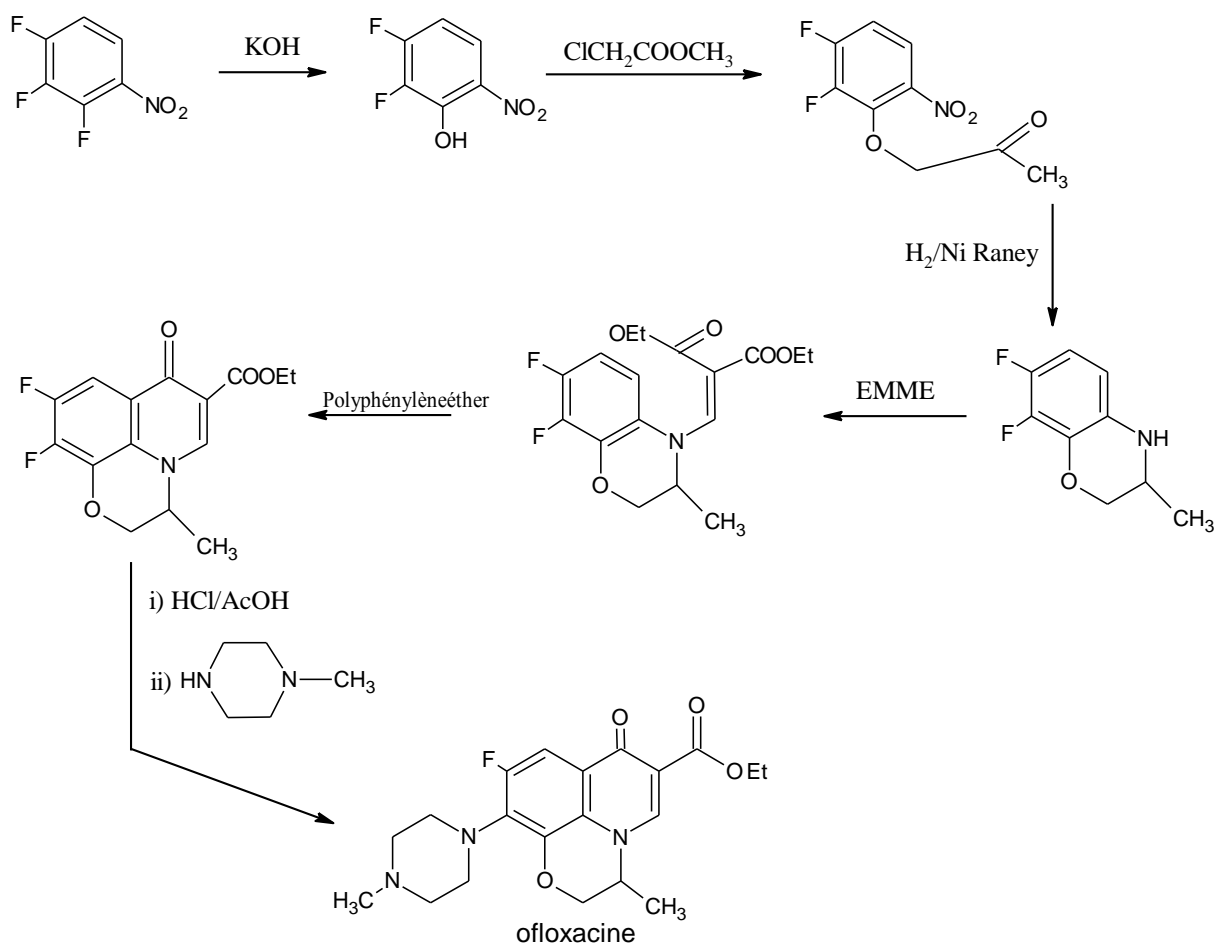


Figure 08 : synthèse de l'ofloxacin(34)

La réduction du dérivé nitré en amine conduit à une énamine cyclique réduite elle aussi dans les conditions opératoires (figure 09).

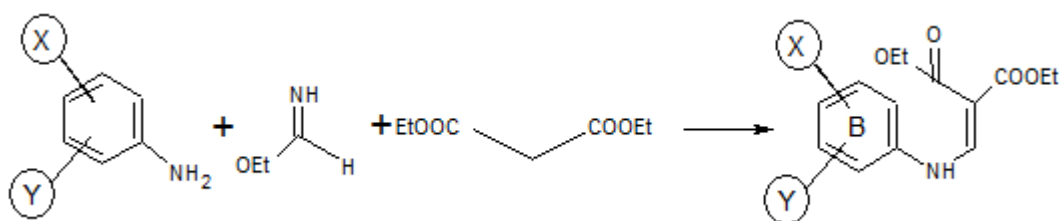


Figure 09 : synthèse de L'anilinoéthylmalonate de diéthyle (34)

L'anilinoéthylmalonate de diéthyle peut également être obtenu à partir de 1 et du mélange : formation d'éthyle 9 et malonate de de diéthyle.

Or, ce réactant, peut être aisément marqué au ^{14}C selon le schéma ci-après (figure10), et conduire avec le protocole de GOULD et JACOUB à une quinolone marquée, directement utilisable pour des études métaboliques (34).

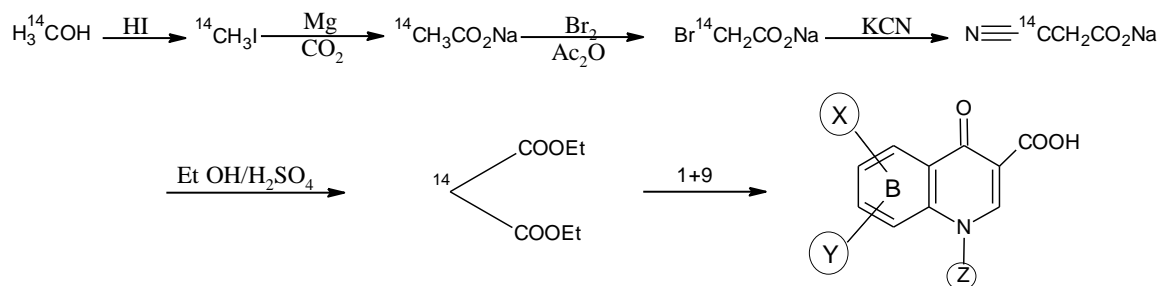


Figure 10 : marquage des quinolones avec le ^{14}C (34)

3.5.Relation structure activité :

R2 doit être un hydrogène à moins que R2 soit impliqué, avec R1, dans un cycle thiazole ou thiazoline ou avec R3 dans un cycle isothiazolinone

R1 confère un maximum d'activité s'il est di-(éthyle ; mono, di, trifluoroéthyle, vinyle) tri-(allyle, cyclopropyle) ou tétra(t-butyle) carboné, à l'exclusion du propyle. Les groupements méthoxyles ou méthylamine sont également actifs.

R3 doit obligatoirement être un radical carboxylique

R7 est un reste cycloalkylamine ; dans le cas de pipérazine, la résistance du germe est encore plus fortement affaiblie. Le spectre antibactérien inclut les Pseudomonas.

R2 doit être un hydrogène à moins que R2 soit impliqué, avec R1, dans un cycle thiazole ou thiazoline ou avec R3 dans un cycle isothiazolinone

3.5.1. Pharmacophore :

L'unité pharmacophore des pyridones β -carboxyliques consiste en un noyau pyridone et un groupement carboxylique. La structure chimique minimale nécessaire pour qu'un dérivé possède une activité antibactérienne est la présence d'une double liaison en 2-3 qui ne peut être réduite et d'une fonction kéto libre en position 4. Le groupement carboxylique en position 3 pourrait être remplacé par un bio-isostère de type thiazolidinone (46).

3.5.2. Activité antibactérienne :

Elle dépend de plusieurs facteurs : du système aromatique associé au noyau pyridone β -carboxylique, des substituants et de leur disposition spatiale (tableaux 01 et 02). Ces substituants permettent une meilleure affinité pour les enzymes cibles (acide désoxyribonucléique [ADN]-gyrase et topo-isomérase IV) mais également autorisent la pénétration de la paroi bactérienne (46).

Tableau 01 : activité in vitro des fluoroquinolones sur les entérobactéries (46)

Bactéries	CMI ₅₀ (mg/L)										
	EFL	LVX	CIP	PEF	SPA	TRO	MOX	GRE	CLIN	LOM	FLE
<i>Escherichia coli</i>	0.06	0.03	0.01	0.12	0.03	0.03	0.06	0.06	≤0.008	0.12	0.03
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.25	0.12	0.03	0.12	0.06	0.06	0.12	0.12	0.01	0.25	0.12
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.06	0.03	0.01	0.12		0.03	0.12	0.06	≤0.008	0.25	0.12
<i>Citrobacter freundii</i>	0.25	0.25	0.03	0.5	0.06	0.06	0.12	0.12	0.01	0.25	0.12
<i>Serratia marcescens</i>	0.25	0.12	0.12	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	0.03	0.25	0.25
<i>Morganella morganii</i>	0.06	0.03	0.03	0.12	0.12	0.25	0.25	0.12	≤0.008	0.5	0.03
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.12	0.06	0.01	0.12	0.03	0.06	0.12	0.06	0.01	0.12	0.12
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.25	0.06	0.03	0.12	0.03	0.06	0.12	0.06	0.01	0.25	0.12
<i>Proteus mirabilis</i>	0.12	0.06	0.03	0.25	0.25	0.06	0.25	0.25	0.01	2.0	0.12

Tableau 02 : activité in vitro des fluoroquinolones sur les bacilles Gram négatifs non fermentaires (46)

Bactéries	CMI ₅₀ (mg/L)									
	OFL	CIP	LVX	SPA	TRO	CLIN	CAZ	IMP	GAT	MOX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0.25	0.5	1	0.5	0.12	2	1	2	4
<i>P. fluorescens/putida</i>	5	0.25	1	1	1	0.25	5	2	0.5	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	16	8	8	4	8	2	8	16	4	8
<i>Alcaligenes xyloxydans</i>	16	8	8	8	32	2	16	1	8	4
<i>Acinetobacter spp</i>	0.5	0.25	0.25	0.06	0.03	0.06	4	2	0.12	0.06
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.5	0.06	0.12	0.12	4	0.01	1	0.5	0.12	0.25
<i>Brevundimonas diminuta</i>	16	16	8	1	0.25	2	128	1	-	-
<i>Ralstonia pickettii</i>	1	0.25	0.5	-	0.12	0.25	-	-	0.25	0.25

3.5.3. Influence des substituants :

Les groupements 3-carboxyliques et 4-carbonyles sont essentiels à l'expression de l'activité antibactérienne, car ils permettent la fixation de la molécule sur le complexe ADN-ADN-Gyrase de la bactérie. La position 2 doit rester libre car elle est trop proche du site de fixation sur l'enzyme. L'inhibition de la Gyrase et la pénétration intrabactérienne sont augmentées par l'atome de fluor en position 6. Le substituant en position 7 est responsable d'un accroissement

de l'activité antibactérienne. Les substituants en position 7 jouent un rôle très important dans la phase de pénétration intrabactérienne ; la présence d'un groupement basique augmente l'activité antibactérienne. Ils permettraient une meilleure fixation au niveau des sites enzymatiques. Dans une série de dérivés, il a été mis en évidence que l'activité antibactérienne sur les bactéries à Gram négatif augmente dans l'ordre croissant suivant :

3'-hydroxypyrrolidinyle < 4'-méthylpipérazinyle \leq 3'-méthylpipérazinyl < pipérazinyle < 3'-aminopyrrolidinyl, alors que l'activité sur les bactéries à Gram positif se fait selon la séquence croissante suivante : pipérazinyle < 3'-méthylpipérazinyl \leq 4'-méthylpipérazinyl < 3'-hydroxypyrrolidinyle < 3'-aminopyrrolidinyle. L'activité antibactérienne est fortement influencée par l'encombrement stérique du substituant en position 1. Les composés ayant un groupement éthyle sont plus actifs que ceux possédant une chaîne alkyle plus courte ou plus longue. Lorsque l'encombrement stérique d'un substituant en position 1 est comparable à celui du groupement éthyle, l'activité antibactérienne est similaire (fluoroéthyle-fléroxacine). La ciprofloxacine possède en N-1 un cyclopropyle qui est plus large que le groupement éthyle, ce qui est en contradiction avec la théorie précédente. Il en est de même du substituant t-butyle (BMY 40062). Cette molécule possède une bonne activité sur les bactéries à Gram positif. En dehors de l'encombrement stérique, d'autres facteurs interviennent comme la position spatiale et l'interaction électronique. La contribution du substituant en position C-5 peut permettre une augmentation de l'activité antibactérienne quelle que soit la nature du substituant en C-7 dans l'ordre suivant : $\text{OH} \leq \text{F} \leq \text{OCH}_3 < \text{NH}_2 < \text{CH}_3$. Cependant, le facteur important quant à l'activité des composés ayant un substituant en C-5 est l'encombrement stérique (47).

3.6. Classification :

Les pyridones β -carboxyliques peuvent être classées en fonction de leur structure chimique ou de leurs propriétés biologiques. Les propriétés physicochimiques permettent également de les différencier. Les quinolones d'origine naturelle sont à part (45).

Les 4-quinolones peuvent être séparées en fonction de leur spectre antibactérien et de leur métabolisme. Trois groupes peuvent être décrits. Chaque groupe est lui-même sous-divisé en fonction du métabolisme (< 5 à 10 %) de la molécule. Le groupe I est composé de molécules qui possèdent un spectre antibactérien limité aux entérobactéries. Le groupe IA comprend les molécules métabolisées comme l'acide nalidixique, l'acide oxolinique, l'acide piromidique, la fluméquine, la miloxacine. Le groupe IB est composé de molécules non métabolisées (< 5 %) comme l'acide pipémidique ou lacinoxacine. Les molécules possédant un spectre antibactérien

élargi sont regroupées dans les groupes IIA et IIB. Leur activité antibactérienne ne couvre pas les bactéries à développement anaérobie strict ou aérotolescentes (streptocoques, y compris les pneumocoques). Dans ce groupe, le nombre de molécules est important, notamment dans le groupe IIA qui contient les molécules métabolisées. Il peut être divisé en six sous-groupes en fonction de l'hétérocycle fixé en position 7 du noyau quinoléine ou 1,8 naphtyridine : IIA1, dérivés 7-pipérazinyles(ciprofloxacine, norfloxacine, péfloxacine, fléroxacine) ; IIA2 : 7-pyrrolyle ;IIA3 : 7-pyrryle ; IIA4 : 7-divers qui comprend des dérivés de type 7-morpholine, 7-pipéridinyle (balofloxacine), 7-azétidinyle...Le groupe III comprend des molécules dont le spectre antibactérien et l'activité englobent les streptocoques et *S. pneumoniae* et, de façon variable, les bactéries à développement anaérobie strict. Il est également divisé en sous-groupes IIIA et IIIB en fonction du métabolisme des molécules (45).

3.7.L'enzyme ADN gyrase et le mécanisme d'action des quinolones :

Les quinolones sont des inhibiteurs de l'enzyme bactérienne ADN gyrase, c'est une enzyme de type II de la topoisomérase(48), ce qui signifie qu'elle peut induire une cassure double-brin dans l'ADN. Elle est composée de quatre sous-unités protéiques, deux sous-unités A (GyrA) et deux sous-unités B (GyrB), qui sont assemblées en une structure fonctionnelle tetramérique(7,49).

Les sous-unités GyrA et GyrB possèdent des domaines fonctionnels distincts et interagissent pour catalyser l'activité de l'enzyme(50). La sous-unité GyrA est composée d'un domaine N-terminal, d'un domaine central et d'un domaine C-terminal, tandis que la sous-unité GyrB est composée d'un domaine ATPase N-terminal et d'un domaine C-terminal(51).

Le domaine N-terminal de GyrA contient une région de liaison à l'ADN qui permet à l'enzyme de reconnaître et de se lier à une région spécifique de l'ADN appelée site de reconnaissance de l'ADN gyrase. Le domaine central de GyrA contient une région appelée le site actif de la cassure double-brin, qui est responsable de l'induction de la cassure double-brin de l'ADN(52).

Le domaine ATPase N-terminal de GyrB contient une région qui se lie à l'ATP, tandis que le domaine C-terminal de GyrB est responsable de l'interaction avec la sous-unité GyrA. L'interaction entre les sous-unités GyrA et GyrB est essentielle pour la catalyse de l'activité enzymatique de l'ADN gyrase(53).

La structure de l'ADN gyrase a été résolue à une résolution élevée par cristallographie aux rayons X. Les cristallographies ont montré que les sous-unités GyrA et GyrB sont organisées en deux domaines distincts reliés par une charnière flexible. Les domaines ATPase N-terminal

de GyrB et domaine central de GyrA sont en contact étroit, tandis que les domaines N-terminal de GyrA et C-terminal de GyrB sont également en interaction(54).

3.7.1. Mécanisme d'action de l'ADN gyrase :

L'ADN gyrase est une enzyme qui joue un rôle important dans la réplication et la régulation de l'ADN chez les bactéries. Son mécanisme de fonctionnement est le suivant :

Liaison de l'ADN : l'ADN gyrase se lie à une double hélice d'ADN qui doit être modifiée. L'enzyme se fixe à une région spécifique de l'ADN appelée site de reconnaissance de l'ADN gyrase(55).

Introduction d'une cassure double-brin : une fois que l'ADN gyrase est liée à l'ADN, elle induit une cassure double-brin dans la molécule d'ADN(53).

Passage de l'ADN : l'enzyme passe ensuite une autre molécule d'ADN à travers la cassure. Cela permet à la molécule d'ADN de se dérouler pour faciliter la réplication ou la transcription de l'ADN(56).

Réparation de la cassure : après que l'ADN est passé à travers la cassure, l'ADN gyrase répare la cassure en reconnectant les brins d'ADN.

Relâchement de l'ADN : une fois que la cassure est réparée, l'ADN gyrase se détache de l'ADN et libère la molécule d'ADN modifiée(56).

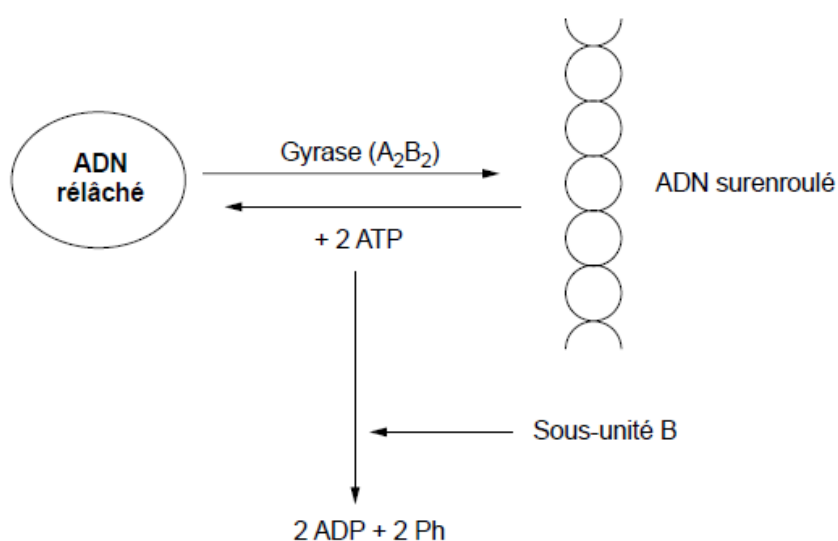


Figure 11 : mode d'action de l'ADN Gyrase

3.7.2. Mécanisme d'action pharmacologique des quinolones :

Les quinolones, une classe synthétique d'antibactériens, sont actives in vitro contre les bactéries Gram négatif (où leur cible moléculaire est l'ADN Gyrase) et les bactéries Gram-positives (où leur cible moléculaire est la Topo-isomérase IV) (figures 112 et 13). Les quinolones ont une valeur clinique substantielle contre plusieurs pathogènes à Gram négatif (y compris *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* et *S. pneumoniae*) et contre *Mycobacteria sp.*

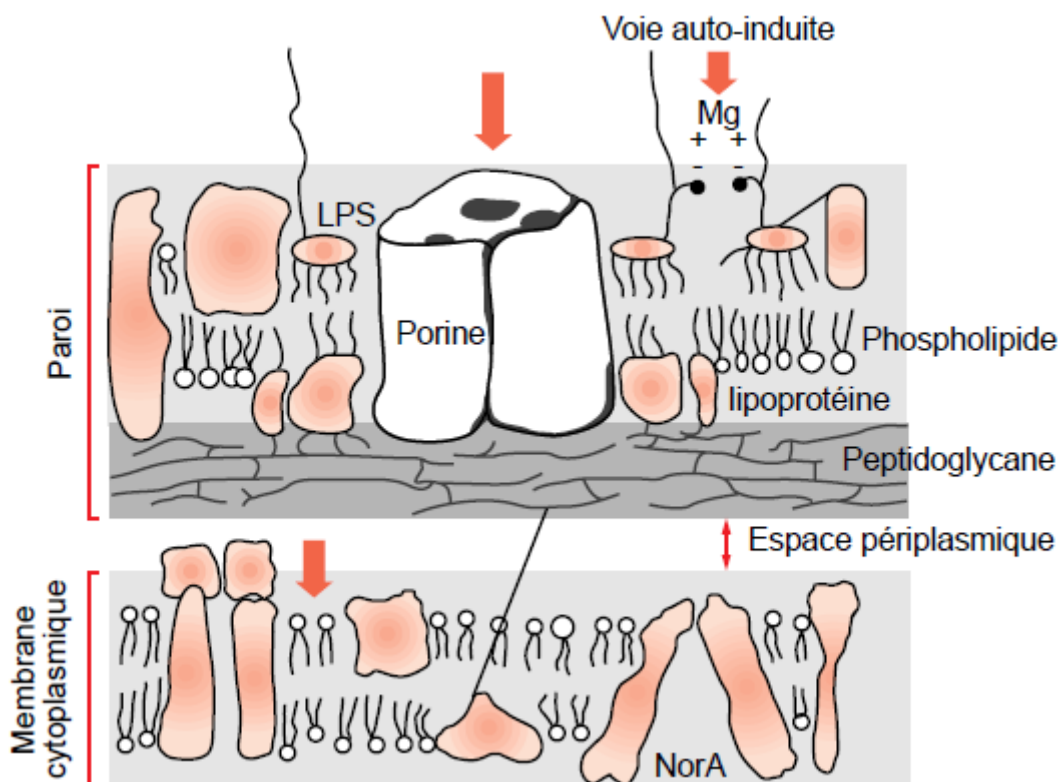


Figure 12 : pénétration des quinolones vers l'intérieur des bactéries

Au cours des cinq décennies qui ont suivi leur découverte, la structure chimique du noyau de la quinolone a connu plusieurs générations. L'incorporation d'un substituant 6-fluoro dans les structures des quinolones de deuxième génération (illustrée par la Ciprofloxacine) a donné naissance à la sous-classe éponyme des quinolones, les fluoroquinolones, et a permis une augmentation significative de la puissance des quinolones à la fois contre leur cible moléculaire et contre ces pathogènes (57).

Ils sont des antibiotiques bactéricides agissant par inhibition des topo-isomérases II bactériennes, les Gyrases (chez les bactéries à Gram négatif) ainsi que des topo-isomérases IV (chez les bactéries à Gram positif). Ces enzymes sont impliquées dans la réplication de

l'ADN en raison de leur implication dans le surenroulement de la molécule d'ADN et la décondensation de la chromatine. Leur inhibition va entraîner la lyse bactérienne. Les quinolones hydrophiles atteignent leur cible intracellulaire en pénétrant la membrane au travers de porines tandis que les quinolones lipophiles passent au travers des lipides membranaires. La fixation d'un atome de fluor en position 6 sur le noyau quinolone a permis d'obtenir des quinolones de 2^e génération ou fluoroquinolones. Les fluoroquinolones sont plus lipophiles et ont ainsi une diffusion plus large, y compris intracellulaire, que les quinolones de première génération. Leur activité est également augmentée vis-à-vis de bacilles à Gram négatif sur lesquels les quinolones de 1^{re} génération sont inactives. Certaines fluoroquinolones présentent également une activité élargie vers certains CGP (moxifloxacine et lévofloxacine).⁽⁵⁸⁾ Le mécanisme des quinolones est une liaison réversible au complexe enzyme-ADN binaire, au stade de l'intermédiaire covalent tyrosine-phosphoester impliqué dans le clivage transitoire du brin d'ADN ⁽⁵⁷⁾.

Jusqu'à récemment, on présumait que le mécanisme était la création de lésions d'ADN et le blocage de la réplication, résultant directement de l'inhibition de la Gyrase (topoisomérase) par la quinolone. En opposition à cette présomption, Dwyer et al. observent que le mécanisme causal de la mort bactérienne est en aval de l'inhibition de la Gyrase (topoisomérase), et est le résultat de dommages oxydatifs initiaux à leurs centres d'azote-soufre et de dommages oxydatifs intracellulaires étendus qui s'ensuivent ⁽⁵⁷⁾.

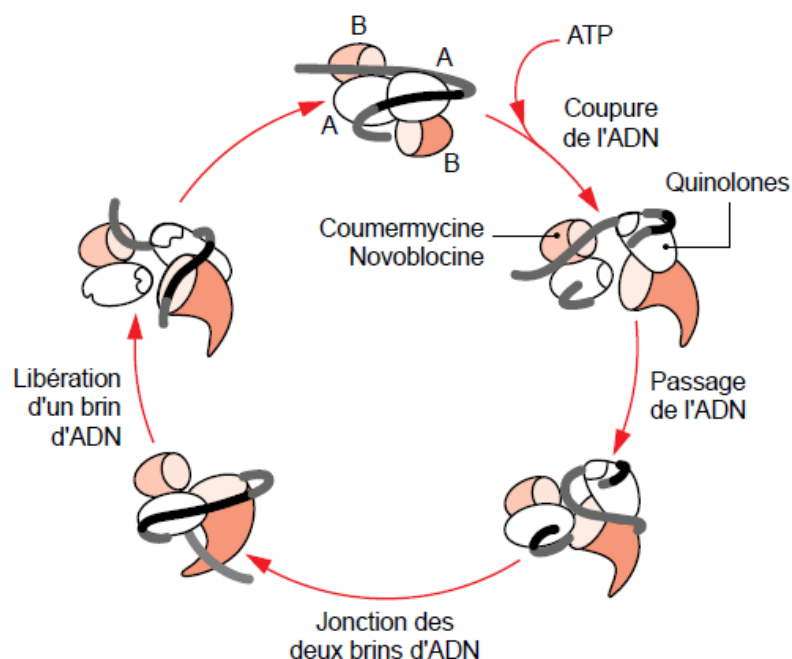


Figure 13 : mode d'action des quinolones

3.8.Mécanisme de résistance des bactéries aux quinolones :

La résistance aux quinolones se développe selon plusieurs processus différents. Le principal mécanisme de résistance aux quinolones est l'acquisition de transporteurs pour l'efflux actif de la quinolone couplée à une mutation spontanée des cibles (figure 14). Étant donné que les deux processus (efflux actif et mutation spontanée de la cible) qui sont les principaux mécanismes (à ce jour) de la résistance aux quinolones n'impliquent pas la transformation de la molécule anti-infectieuse, les quinolones n'auraient pas été discutées auparavant en relation avec le développement enzymatique de la résistance. Leur inclusion dans cette discussion est justifiée. La base est l'apparition récente de plasmides multirésistants contenant un facteur de résistance enzymatique spécifique aux quinolones. Le phénomène de la résistance aux quinolones médiée par les plasmides est en train d'être évalué de près. Deux facteurs distincts de résistance aux quinolones (QRDR, quinolone resistance-determining regions) sont trouvés sur ces plasmides. Le premier facteur est une protéine de liaison à la Gyrase (et aussi à la topoisomérase), appelée Qnr, qui est membre de la grande famille des protéines à répétition pentapeptidique (PRP). Ces protéines sont caractérisées par un repliement en hélice quadrilatérale droite, qui agit comme un mimétique de l'ADN-B pour se lier à l'activité de la Gyrase et ainsi l'inhiber in vitro. Les mécanismes possibles par lesquels le complexe Qnr-gyrase (et le complexe Qnr-topoisomérase) échappe à l'activité inhibitrice de la quinolone vis-à-vis de ces enzymes sont suggérés. Le deuxième facteur de résistance est en effet la modification covalente de la quinolone par une enzyme. L'enzyme qui accomplit la réaction covalente de la quinolone est, remarquablement, l'une des acétyltransférases des aminoglycosides (l'enzyme AAC-Ib) qui représente également un déterminant majeur de la résistance aux antibiotiques aminoglycosides. Après la reconnaissance et la liaison de la quinolone par cette acétyltransférases, le transfert d'acétyle (à partir de l'acétyl-CoA) se produit sur l'amine secondaire du substituant pipérazine que l'on trouve sur de nombreuses quinolones. Comme toutes les quinolones ne possèdent pas ce substituant pipérazine, cette réaction n'est donc pas un mécanisme général de résistance aux quinolones. Maurice et al. et Vetting et al. ont réussi à modéliser la ciprofloxacine dans le site actif de cette acétyltransférases, dans une position appropriée pour le transfert de l'acétyle sur le cycle pipérazine. En raison de la diversité des mécanismes utilisés pour la résistance aux quinolones, un examen de la génétique et de la protéomique de la résistance aux quinolones a été entrepris, donnant des résultats intéressants. Les quinolones et les aminoglycosides induisent tous deux des réponses de type SOS (mutations dérivées d'erreurs) à des concentrations sous-inhibitrices. -La résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* en essaim aux

quinolones (ainsi que la résistance à la topolymyxine et aux aminoglycosides) était supérieure à celle de leurs homologues planctoniques, et corrélée à une virulence accrue. On peut soutenir que l'une des observations les plus intéressantes concerne le mécanisme moléculaire bactéricide des quinolones (57).

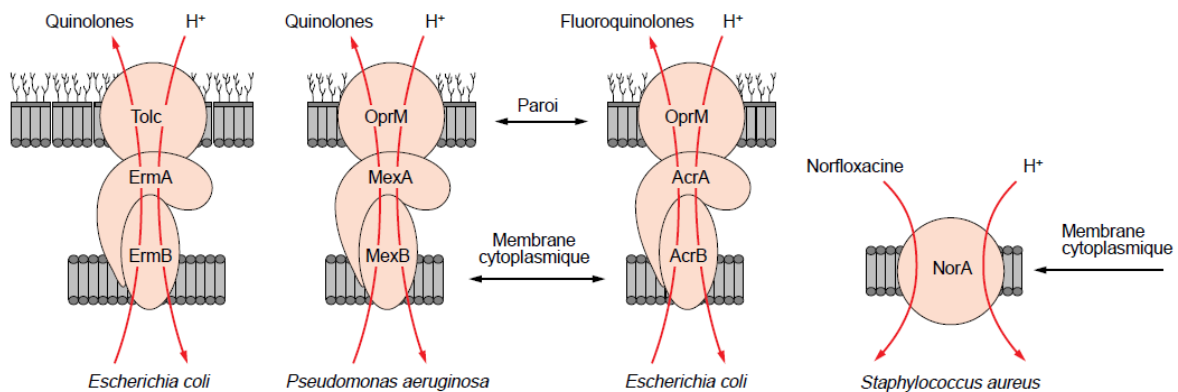


Figure 14 : résistance aux quinolones par efflux

3.9. Propriétés pharmacocinétiques :

Les fluoroquinolones possèdent, comme principales caractéristiques, d'être absorbées par voie orale et, pour certaines, d'être administrables par voie parentérale. Elles sont éliminées par voie rénale ou biliaire, mais certaines d'entre elles subissent un important métabolisme hépatique. Leur absorption est variable, expliquant pour partie la différence de posologie unitaire entre les différentes molécules. Les posologies unitaires les plus faibles per os sont celles de l'ofloxacin (200 mg), car très active in vitro et non métabolisée ($\leq 5\%$), et de la trovafloxacin (200 mg). La plupart des molécules sont administrées per os, à la posologie unitaire de 400 mg : péfloxacin, norfloxacin, loméfloxacin, énoxacin, fléroxacin, témafloxacin. Celle de la ciprofloxacin est de 500 ou 750 mg et celle de la lévofloxacin de 500 mg. La posologie quotidienne de la sparfloxacin est de 200 mg en une prise après une dose de charge de 400 mg le premier jour. La biodisponibilité absolue des différentes quinolones n'est pas toujours connue du fait de l'impossibilité d'obtenir une formulation intraveineuse, comme par exemple pour la norfloxacin ou la sparfloxacin. La biodisponibilité varie de 40 à 100 % (59).

3.10. Spectre antibactérien :

3.10.1. Quinolones de première génération :

Les quinolones de première génération sont actives sur la plupart des entérobactéries :

- *E. coli* , *P. vulgaris*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersina*.
- *Klebsiella*, *Providentia* et *Serratia* (activité variable).

3.10.2. Les quinolones de deuxième génération : (les fluoroquinolones)

L'activité des fluoroquinolones est accrue sur les entérobactéries par rapport aux quinolones de première génération, y compris sur *Klebsiella* et *Providentia*.

Le spectre est élargi à *P. aeruginosa* et, à un degré moindre aux autres *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. A l'origine, elles présentent une excellente activité sur *S. aureus* et sur les staphylocoques à coagulase négative. Suite à leur utilisation intensive en milieu hospitalier, on observe actuellement l'apparition des mutants résistants, en particulier des staphylocoques méti-R, *Pseudomonas* et *Acinétobacter*. Le principal intérêt des fluoroquinolones réside dans leur activité sur *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* et *Enterococcus faecalis*.(27)

3.11. Interactions médicamenteuses :

3.11.1. Diminution de l'absorption ou de la biodisponibilité des quinolones :

Ce sont principalement les fluoroquinolones qui sont concernés :

- Interactions avec les cations métalliques : les quinolones chélatent les cations polyvalents ($\text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \dots$) ce qui se traduit par une diminution de leur absorption ;
- Interaction avec les antiacides : l'augmentation du pH gastrique diminue l'absorption des quinolones.
- Interaction avec le charbon : la biodisponibilité de la moxifloxacin peut être réduite de plus de 80%)

3.11.2. Compétition au niveau de la liaison aux protéines plasmatiques :

Par une compétition au niveau de la liaison aux protéines plasmatiques, les quinolones de première génération fortement liées aux protéines plasmatiques sont susceptibles de déplacer les anticoagulants coumariniques de leur liaison protéique, exposant à un risque hémorragique. Les fluoroquinolones à l'exception de l'ofloxacin, requièrent des précautions d'emploi lors de l'association aux anticoagulants mais par un mécanisme inconnu.

3.11.3. Effet sur le cytochrome P450 :

La ciprofloxacine inhibe l'isoforme 1A2 du cytochrome P450, responsable du métabolisme de la théophylline, de la caféine et du ropinirole. L'administration simultanée de théophylline et

de ciprofloxacine se traduit par une diminution de clairance de la théophylline avec une possible apparition d'effets indésirables centraux pouvant aller jusqu'à des convulsions (27).

3.12. Effets indésirables :

Les nouvelles quinolones présentent les mêmes effets indésirables que les composés de première génération.

Sont observés :

3.12.1. Des accidents neuropsychiques :

Surtout avec l'acide nalidixique, l'acide oxolinique et la fluméquine.

Les symptômes les plus fréquents sont représentés par des céphalées, vertiges, hallucination, insomnies, etc...

Des troubles visuels sont aussi décrits (altération de la vision des couleurs, halos brillants, troubles de l'accommodation).

Des convulsions ont été rapportées, ainsi que des syndromes pyramidaux et extrapyramidaux.

Ces incidents peuvent être en partie évités en respectant les contre-indications et les précautions d'emploi (sujets prédisposés, insuffisance circulatoire cérébrale).

3.12.2. Des réactions cutanées :

Soit d'origine toxique : la photodermatose bulleuse.

C'est la forme la plus courante qui se manifeste après exposition au soleil sous forme de phlyctènes au niveau des régions exposées. Elle survient même cessation du traitement et persiste plusieurs moi.

Soit d'origine allergique : érythème, urticaire, prurit et, même, syndrome de LYELL.

3.12.3. Des troubles digestifs :

(Surtout avec l'acide nalidixique et la fluméquine).

Ils se traduisent par des nausées, vomissements, douleurs abdominales, anorexie, plus rarement des diarrhées et régressent avec la diminution des doses.

Les quinolones de 2ème génération sembleraient mieux tolérées.

3.12.4. Des troubles hématologiques :

Liés à une origine toxique : déficit en G6PD responsable d'une anémie hémolytique.

Liés à une origine allergique : leucopénie, éosinophilie, thrombopénie.

Des manifestations musculaires et/ou articulaires caractérisées par des douleurs musculaires associées ou non à des arthralgies :

Les effets indésirables apparaissent généralement pour des posologies élevées et surtout chez la femme. Ils régressent après diminution des doses ou arrêt du traitement (34).

Chapitre 4 :

Docking

moléculaire

4. Docking moléculaire :

4.1.Introduction :

Le docking moléculaire est une méthode de modélisation informatique qui permet de prédire l'interaction entre une molécule cible, telle qu'une protéine, et une molécule ligand, telle qu'un médicament potentiel. C'est une technique largement utilisée dans la recherche en chimie médicinale et en conception de médicaments pour comprendre et prédire les interactions moléculaires au niveau atomique. Le docking moléculaire repose sur des algorithmes de calcul qui évaluent la complémentarité géométrique et énergétique entre les deux molécules pour prédire leur positionnement relatif optimisé et leur affinité respective. Cette approche permet d'étudier la façon dont les molécules interagissent avec leur cible biologique, d'identifier les sites de liaison potentiels, de prédire les affinités de liaison et d'optimiser la structure des ligands pour améliorer leur activité biologique. Dans ce chapitre, nous explorerons les bases du docking moléculaire, y compris les méthodes et les algorithmes couramment utilisés, les principales applications dans la recherche pharmaceutique, les avantages et les limites de cette approche, ainsi que les défis et les perspectives futures. La compréhension du docking moléculaire est essentielle pour les chercheurs et les professionnels de la santé impliqués dans la découverte et le développement de nouveaux médicaments, ainsi que dans la compréhension des interactions moléculaires au niveau atomique.

4.2.Objectif :

L'objectif de ce chapitre est d'expliquer le principe du docking moléculaire comme une méthode *in silico* utilisée pour prédire les interactions entre les molécules, notamment les antibiotiques et les inhibiteurs de l'ADN gyrase, et leur cible moléculaire, de présenter les différentes approches de docking moléculaire et de discuter des avantages, des limitations et des applications du docking moléculaire dans la de nouveaux médicaments.

4.3.Contexte :

Dans de nombreux domaines scientifiques et technologiques, il est nécessaire de concevoir des molécules pour des objectifs spécifiques. Par exemple, dans le domaine de l'ingénierie chimique, de nombreuses applications exigent de trouver de nouveaux matériaux présentant une résistance particulière à la contrainte ou à la température, en partant d'un composé moléculaire connu, mais en s'orientant souvent vers de nouvelles structures qui répondent mieux aux spécifications ou aux contraintes du problème. En chimie organique, un chercheur peut s'intéresser à la découverte de la protéine responsable d'un processus cellulaire et à la

manière d'accélérer ce processus dans les cas où la protéine a été altérée par des mutations dans le génome. Dans le contexte de la médecine, les chercheurs s'intéressent à la découverte de nouvelles molécules ou d'approches moléculaires pour guérir les maladies. L'approche consiste souvent à fouiller dans une base de données de médicaments pour trouver la molécule qui est le meilleur ligand pour une protéine cible et qui présente certains niveaux de toxicité compatibles avec le traitement en cours de conception. Deux types de molécules sont généralement impliqués dans le processus de docking : (i) le ligand et (ii) la molécule cible. Le ligand, qui vient du terme latin "ligare", fait référence à la propriété de la molécule de se lier à une autre molécule. En chimie moderne, un ligand désigne une molécule qui interagit avec une autre molécule par le biais de forces non covalentes. L'interaction n'implique donc pas la formation de liaisons chimiques, ce qui pourrait entraîner des modifications chimiques pertinentes à la fois dans le ligand et dans la cible, qui est souvent plus complexe et de plus grande taille. Le composé final peut être un complexe supramoléculaire, contenant de multiples agrégats du ligand et de la cible. Les principales forces impliquées dans le processus dépendent principalement de la forme des deux molécules et de l'influence du solvant ou de l'environnement (60).

Le docking moléculaire n'est plus une étape inconnue de la découverte de médicaments depuis quelques décennies. Comme le temps et les coûts financiers sont des facteurs cruciaux dans la découverte et le développement de médicaments, il est important de réformer constamment le circuit de découverte de médicaments avec de nouvelles technologies, telles que le criblage et le docking virtuels, qui permettent de trouver les meilleurs candidats, l'approche *in silico* a été largement appliquée au stade préliminaire et a permis de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de la protéine-ligand. La dernière décennie a été marquée par une croissance phénoménale des capacités de calcul qui permettent à l'amarrage computationnel d'accélérer la découverte de nombreux inhibiteurs potentiels, son application potentielle dans la découverte d'inhibiteurs potentiels pour des maladies infectieuses mortelles (61).

4.4.Définition :

Les études moléculaires d'amarrage sont des analyses utilisées pour prédire l'affinité de liaison, la posture de liaison préférée et l'interaction du complexe ligand-récepteur avec un minimum d'énergie libre. Les interactions protéine-ligand, protéine-nucléotide et protéine-protéine sont toutes possibles dans les études d'amarrage (figure 15) (8).

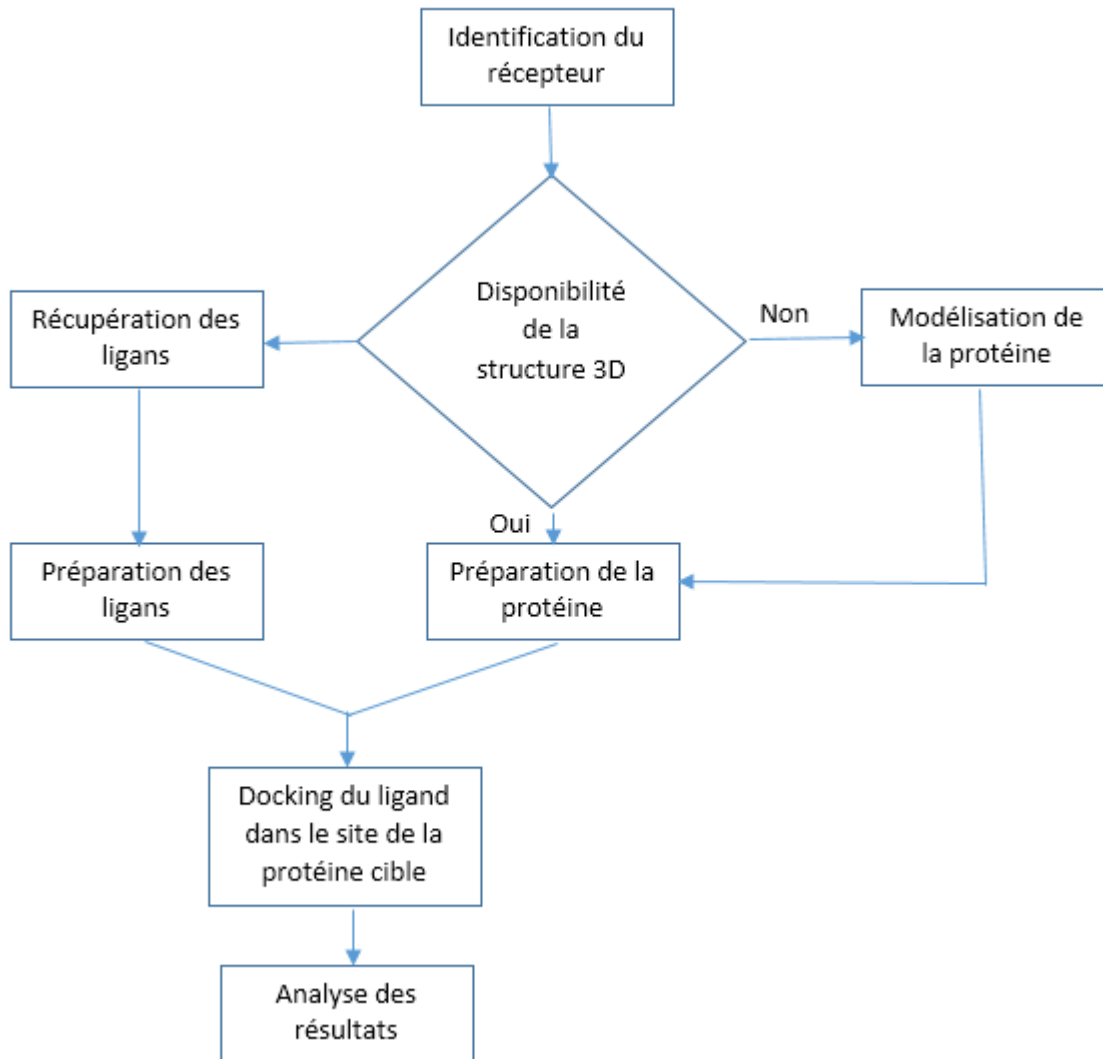


Figure 15 : les étapes du docking (8)

4.5. Modèles pour les mécanismes de liaison des protéines :

Le modèle clé-serrure est le modèle le plus ancien et aussi le plus simple pour expliquer la reconnaissance moléculaire dans les actions enzymatiques. Il a été proposé pour la première fois par Fischer en 1894. Le modèle clé-serrure suppose que l'enzyme (serrure) reconnaît le substrat (clé) par la complémentarité de forme entre le site actif de l'enzyme et le substrat. Ce modèle est perspicace, mais trop simple pour refléter la réalité. En général, l'enzyme (c'est-à-dire une protéine) et le substrat (par exemple, un petit composé ou une protéine) sont des entités dynamiques, comme le révèlent de nombreuses expériences. La comparaison entre les structures d'une protéine dans des complexes et les structures de protéines non liées démontre que la protéine subit souvent certains changements de conformation lorsqu'elle forme la structure complexe avec son partenaire de liaison. Le modèle de l'ajustement induit a été

proposé pour la première fois par Koshland en 1958 pour expliquer les changements de conformation des protéines dans le processus de liaison. Ce modèle suggère qu'une enzyme, lorsqu'elle se lie à son substrat, optimise l'interface par des interactions physiques pour former la structure complexe finale. Le modèle de l'ajustement induit est soutenu par le fait que de nombreux ligands sont enfouis dans les sites de liaison des protéines dans les structures de complexes protéine-ligand de la Banque de données des protéines (PDB), ce qui suggère que ces ligands peuvent très probablement être enveloppés par les résidus du site de liaison après l'événement de liaison initial. Cependant, les changements de conformation tels que les mouvements collectifs du squelette, les réarrangements de domaine et la transition du désordre à l'ordre pour les protéines hautement flexibles ne peuvent pas être entièrement expliqués par ce modèle. À la fin des années 1990, le modèle de sélection conformationnelle a été proposé par plusieurs chercheurs. Le modèle de sélection conformationnelle suggère que le récepteur protéique non lié fluctue entre plusieurs états conformationnels, dont les probabilités d'occupation sont déterminées par leurs énergies libres relatives selon la distribution de Boltzmann. Seul un sous-ensemble de ces états permet la liaison de son partenaire. La rencontre avec son partenaire de liaison déplace la distribution vers ces états pour former la structure complexe finale. La principale différence entre le modèle d'ajustement induit et le modèle de sélection conformationnelle est de savoir si la holostructure préexiste à la formation du complexe. Une illustration schématique des trois modèles de liaison est fournie à la (figure 16) (62).

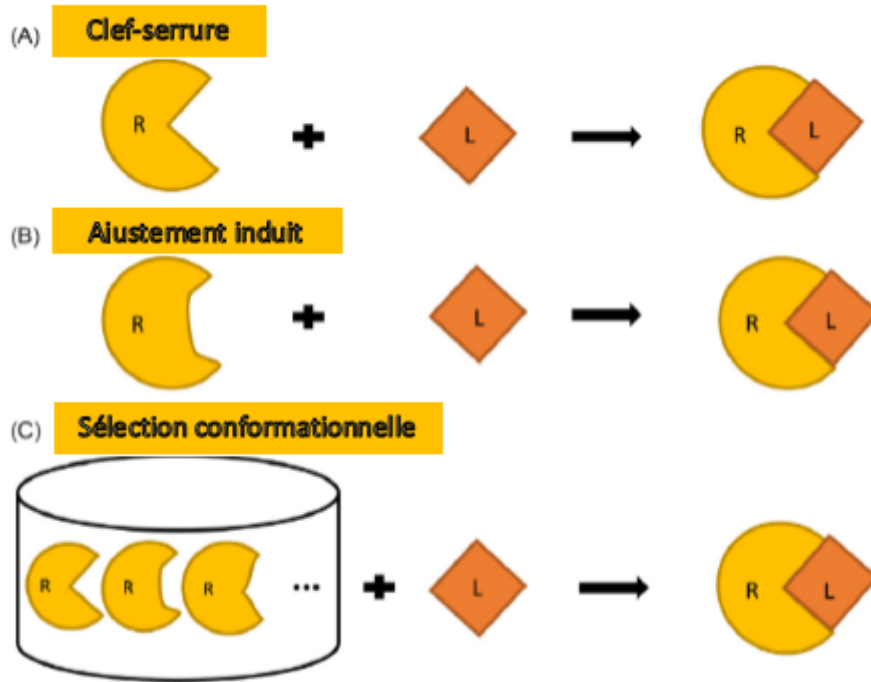


Figure 16 : Diagrammes schématiques des trois modèles de liaison. (A) Le modèle clé-serrure, (B) le modèle d'ajustement induit, et (C) le modèle de sélection conformationnelle (62)

4.6. Données structurales :

Les exigences de base pour les études d'amarrage comprennent l'information structurale de la cible ainsi que du ligand et du support informatique. Dans le cas d'une protéine, si la structure est connue, cette information est fournie par des techniques cristallographiques à rayons X ou RMN, et si la structure est inconnue, la modélisation de l'homologie joue un rôle important. La structure des ligands peut être conçue ou une bibliothèque de composés peut être utilisée. La protéine est généralement considérée comme rigide dans la plupart des algorithmes d'amarrage et le ligand comme flexible.

4.7. Méthodes de docking :

Les méthodes d'amarrage peuvent être classées de la façon suivante :

4.7.1. Ligand rigide et récepteur rigide :

La molécule réceptrice et le ligand ont une géométrie interne rigide/fixe et présentent une liaison étroite entre eux.

4.7.2. Ligand flexible et récepteur rigide :

Comme son nom l'indique, le ligand est flexible et la molécule réceptrice est maintenue rigide pour l'amarrage.

4.7.3. Amarrage flexible du ligand et du récepteur :

Sur la base de l'amarrage induit, le récepteur et le ligand sont conformationnellement flexibles pour maximiser les forces de liaison entre eux. À chaque rotation, l'énergie et l'occupation de la cellule de surface sont calculées ; puis la pose la plus favorable est choisie.

4.7.4. Amarrage d'ensemble :

Cette approche met l'accent sur la complexité et la flexibilité de la conformation des protéines qui sont en corrélation avec la théorie de la sélection conforme. Il utilise plusieurs structures protéiques rigides qui sont accrochées séparément au ligand, et les résultats sont combinés en fonction de la méthode de choix.

4.7.5. Méthode hybride :

Il s'agit d'une stratégie qui tient également compte de la flexibilité du récepteur. Il utilise diverses méthodes ensemble pour l'amarrage (63).

4.8.Types d'interactions :

Les interactions entre un ligand et une molécule réceptrice peuvent s'expliquer par les forces entre les particules, qui sont principalement de quatre types :

4.8.1. Forces électrostatiques :

Forces dues à des entités chargées résidant dans la matière. Les exemples les plus courants sont dipôle-dipôle, charge-dipôle et charge-charge.

4.8.2. Forces électrodynamiques :

Ce sont principalement les interactions de van der Waals.

4.8.3. Forces stériques :

Ces interactions sont générées lorsque des atomes de différentes particules se trouvent à proximité l'un de l'autre et affectent la réactivité de l'autre. Le système d'énergie libre et les réactions chimiques sont affectés par les forces résultantes. Ceci est généralement causé par l'entropie.

4.8.4. Liaison hydrogène :

Les interactions hydrophiles (liaisons hydrogène) sont des représentants de cette catégorie (64).

4.9.Mécanisme du docking moléculaire :

L'amarrage s'effectue par deux étapes inter reliées, la réalisation d'un programme d'amarrage dépend de ces deux perspectives.

4.9.1. Algorithmes de recherche :

Un algorithme de recherche se compose de toutes les conformations et orientations possibles d'un ligand lié à une protéine réceptrice. Les algorithmes de recherche sont utilisés pour explorer l'énergie libre impliquée dans la détermination de la meilleure posture de ligand. La conformation expérimentale ligand-récepteur, c'est-à-dire le mode de liaison natif, correspondra aux minima globaux d'énergie (65).

4.9.2. Fonctions de notation (scoring) :

La fonction de notation est une méthode mathématique utilisée pour prédire l'affinité et la force des liaisons non covalentes du complexe récepteur-ligand. Par diverses hypothèses et simplifications, au lieu de calculer, la fonction de notation se rapproche de l'affinité de liaison entre les complexes amarrés. La méthode a également été mise au point pour estimer la force d'autres types d'interactions intermoléculaires, comme protéine-protéine, protéine-médicament ou les complexes d'ADN- protéine (66).

4.10. Analyses post-docking :

La fonction de notation joue un rôle important dans l'identification des effets potentiels du médicament par criblage virtuel. Mais, une limitation majeure des fonctions de notation actuelles est l'incapacité de prédire l'énergie de liaison précise, ce qui compromet la qualité du score d'amarrage. Pour le moment, l'examen visuel continue d'être utile pour l'analyse après le docking ; cependant, à mesure que la taille de l'échantillonnage augmente, la technique devient proportionnellement moins efficace. Ces dernières années, pour éliminer les faux positifs, un certain nombre de méthodes ont été conçues pour améliorer le taux de succès dans la suite de l'essai in vitro.

4.11. Applications du docking :

Bien qu'il ne soit pas certain que l'arrimage soit un problème résolu, nous pouvons affirmer avec certitude que l'arrimage est un outil utile dans l'arsenal du chimiste médicinal. Le docking et la conception de médicaments basée sur la structure (SBDD) sont devenus un outil essentiel dans l'arsenal du chimiste médicinal. L'aliskirène, le zanamivir, le lopinavir et le ritonavir sont autant de médicaments commercialisés qui ont été découverts grâce au docking. On pense que le captopril a été le premier médicament pour lequel le docking a joué un rôle majeur dans sa découverte. Il existe de nombreux exemples publiés de programmes réussis qui ont été aidés et encouragés par des études de docking. Une revue récente a mis en évidence de nombreux exemples où les études de docking ont contribué de manière significative à l'aboutissement d'un projet par le biais d'un criblage virtuel. Il existe également de nombreux exemples dans la littérature qui mettent en évidence des programmes de chimie médicinale dans lesquels le docking joue un rôle dans un programme d'optimisation structurelle. En effet, lorsque des études de docking sont réalisées, elles obtiennent rarement plus qu'une ligne superficielle dans une publication pour noter que la méthode a été utilisée et les conséquences de son utilisation. Les auteurs ont fait un choix synthétique clé pour augmenter l'affinité de leur composé après que le docking ait montré que les changements proposés conduiraient à des interactions acceptables avec le site de liaison. Comme c'est généralement le cas dans les publications, les études de docking ne sont pas décrites de manière significative, comme c'est généralement le cas dans les publications de ce type, les études de docking ne sont pas décrites de manière significative, cela reflète le succès du docking en tant qu'approche de la chimie médicinale (67).

4.12. Limites du docking moléculaire :

Nous notons qu'il y a encore d'autres domaines où le docking pourrait avoir un impact mais où les solutions proposées jusqu'à présent sont quelque peu limitées. Certains logiciels offrent la possibilité d'effectuer un docking covalent, par exemple, mais les méthodes utilisées pourraient être considérablement améliorées. De plus, nous ne connaissons pas actuellement de solutions qui tentent de s'attaquer aux changements conformationnels importants lors de la liaison covalente à la protéine d'une manière agnostique par rapport à la structure. En général, l'utilisateur final doit informer un programme de la nature de la liaison covalente avant le docking et configurer le docking de manière appropriée plutôt que de permettre au logiciel de faire des choix concernant la nature de toute liaison covalente, ou de reconnaître que la réaction chimique réelle se produit. Un autre domaine d'intérêt serait la reconnaissance automatique des changements dynamiques dans l'état tautomère et l'état de protonation des ligands qui

pourraient se produire lors de la liaison. Actuellement, les états de tautomérie et de protonation sont généralement pris en compte lors de la création de l'entrée, et dépendent donc des choix de l'utilisateur pour donner de bons résultats. Un défi à plus long terme réside dans l'utilisation de l'amarrage pour identifier les petites molécules qui pourraient provoquer une perturbation des interfaces protéine-protéine. Ce domaine d'intérêt croissant a sa propre communauté, et a fait l'objet de son propre effort de collaboration dans l'évaluation des méthodes pour aider au développement d'approches nouvelles et existantes. Enfin, l'amarrage protéine-protéine est en soi un domaine de recherche très actif qui devient de plus en plus intéressant avec le développement de thérapies biologiques. Bien que l'accent soit mis ici sur la chimie médicinale, il convient de noter que l'amarrage peut être appliqué à une grande variété d'autres problèmes. Par exemple, l'amarrage de substrats dans des cadres métallo-organiques ou des zéolites, ou de clivages dans des cavités de surface de cristaux de petites molécules pourrait être utile dans une variété d'applications chimiques plus larges, telles que la compréhension du comportement des inhibiteurs de croissance cristalline. De tels problèmes présentent leurs propres défis : en particulier, une gamme plus large de types d'atomes nécessite une paramétrisation, les effets de solvation sont moins prévisibles, en raison du choix plus large de solvants utilisés dans la cristallisation, et la nature des problèmes en question signifie que les chercheurs doivent considérer le comportement à des températures et pressions non ambiantes. Ce sont là des domaines de recherche inexploités potentiellement riches pour une future génération de développeurs de docking (67).

4.13. Quelques logiciels de criblage virtuel disponibles :

Tableau 03 : exemples de logiciels utilisés pour le docking

Logiciel de Docking	Algorithme	Licence
Molegro Virtual Docker	MolDock	Académique
DockVision	Monte Carlo	Commerciale
AutoDock	Algorithme Génétique	Gratuite
GOLD	Algorithme Génétique	Commerciale
FlexX	Construction Incrémentale	Commerciale
FLOG	Algorithme de Correspondance	Académique
ParDock	Monte Carlo	Gratuite

Chapitre 5 :

Modélisation

QSAR

5. Modélisation QSAR (relation structure-activité quantitative) :

5.1.Introduction :

La modélisation QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) est une approche de modélisation informatique qui vise à établir une relation quantitative entre la structure chimique d'une molécule et son activité biologique. Elle permet de prédire l'activité biologique de nouvelles molécules basées sur des propriétés physico-chimiques, des descripteurs moléculaires ou des propriétés structurales. La modélisation QSAR est largement utilisée dans la recherche pharmaceutique et la conception de médicaments pour évaluer l'activité biologique potentielle de nouvelles structures chimiques, optimiser la structure des ligands et aider à la compréhension des mécanismes d'interaction moléculaire. Dans ce chapitre, nous aborderons les bases de la modélisation QSAR, y compris les méthodes et les techniques couramment utilisées, les avantages et les limites de cette approche, ainsi que les applications dans la découverte de médicaments et la recherche pharmacologique. Nous discuterons également des défis et des perspectives futures de la modélisation QSAR, ainsi que des considérations éthiques liées à l'utilisation de ces modèles pour la conception de médicaments. La compréhension de la modélisation QSAR est essentielle pour les chercheurs et les professionnels de la santé impliqués dans la conception et la découverte de nouveaux médicaments, ainsi que dans la compréhension des relations entre la structure chimique et l'activité biologique des molécules.

5.2.Objectif :

L'objectif de ce chapitre est d'expliquer le principe de la modélisation QSAR pour permettre au lecteur de comprendre les bases théoriques de la modélisation QSAR et les différentes approches utilisées pour développer et valider des modèles prédictifs fiables de l'activité biologique des molécules chimiques.

5.3.Définition :

Les relations quantitatives structure-activité (QSAR) sont des modèles statistiques empiriques qui relient une description quantitative des caractéristiques de la structure chimique d'une série de molécules aux réponses que ces molécules présentent dans un système expérimental (figure 17). Les QSAR sont des modèles empiriques car ils sont basés sur des tendances et des corrélations observées entre les descripteurs chimiques et les variables de réponse, plutôt que sur un modèle physique a priori. Bien que de nature empirique, un modèle QSAR robuste peut être utilisé pour proposer une hypothèse physique qui sous-tend une relation observée. Les

relations structure-activité en chimie médicinale sont basées sur des comparaisons sérielles entre les changements structuraux et les changements d'activité. Le modèle QSAR adopte une approche complémentaire et tente d'identifier comment les changements structuraux d'une série de molécules sont liés à leur activité.(68) En chimie thérapeutique un modèle QSAR est une relation mathématique qui prédit l'activité biologique en fonction des propriétés structurales des molécules (69).

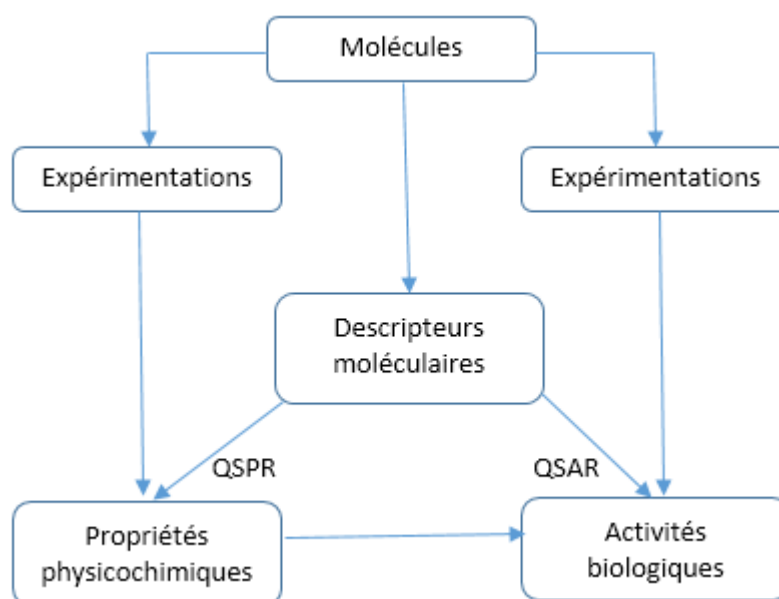


Figure 17 : schéma général de la philosophie QSAR (69)

5.4.Historique :

Le concept de QSAR a commencé il y a un siècle, en 1868, Crum-Brownand et Fraser ont proposé que l'activité physiologique dépend de la composition des molécules. L'effet thénarcotique des alcools primaires en fonction du poids moléculaire a été étudié par Richardson en 1869. Ensuite, des études sur les composés organiques simples en fonction de la solubilité dans l'eau , Meyer en 1899 a étudié la variation de l'activité des composés narcotiques, Hammett en 1937 a fait une étude de la réactivité chimique des benzènes substitué, Ferguson en 1939 a étudié les effets des narcotiques en se basant sur la thermodynamique de Pandlog, ensuite Taft en 1952 a utilisé les propriétés chimiques physico-organiques pour établir des relations d'énergie stérique linéaire, enfin Hansch et Fujita en 1964 ont créé le premier modèle de relations d'énergie libre linéaire. L'année 1964 était marquée aussi par les travaux de Free et Wilson avec leur modèle QSAR basé sur les fragments de molécules, mais il fallait attendre

jusqu'à 1971 pour la conception du premier modèle de relation structure activité basé sur la substitution. Le développement du 2D-QSAR a commencé au début des années 1970 et celui du 3D-QSAR au début des années 1980. Avec l'arrivée de nouvelles technologies et perspectives, le QSAR est maintenant devenu multidimensionnel. Des approches QSAR plus robustes et plus précises ont été mises en pratique avec une dimensionnalité accrue comme 4D, 5D et 6D, ce qui a permis d'augmenter la prévisibilité, la fiabilité et la précision des modèles (70).

5.5.Crédibilité des modèles QSAR :

Le QSAR reste une technique populaire, il est désormais un outil totalement intégré dans la découverte de médicaments. Mais l'utilisation des modèles QSAR est semée d'embûches et de complexité. De nombreux modèles QSAR issus de la littérature et présentant des statistiques attrayantes peuvent en réalité n'encoder rien de plus que des relations fortuites. Plus que des relations fortuites, les algorithmes statistiques appliqués sont des outils très puissants qui permettent de trouver des modèles de corrélation dans les ensembles de données. Les algorithmes statistiques appliqués sont des outils très puissants qui permettent de trouver des modèles de corrélation dans les ensembles de données et le concepteur du modèle peut ne pas savoir s'il s'agit de véritables relations sous-jacentes ou d'erreurs statistiques qui ne permettent pas de prédire l'avenir, c'est-à-dire l'utilisation dans la vie réelle. Par exemple, dans l'article de Stouch et al. intitulé " In silico ADME/Tox : why models fail ", les auteurs soulignaient l'expérience de Bristol-Myers Squibb qui a essayé de valider les modèles construits par les fournisseurs. L'expérience de Bristol-Myers Squibb qui a tenté de valider des modèles QSAR pour l'inhibition de l'hERG, la perméabilité de Caco-2, l'inhibition du cytochrome P450 2D6. Les auteurs ont conclu que même dans le meilleur des cas, les constructeurs et les utilisateurs peuvent avoir des critères de réussite différents, et que le manque d'expérience dans ce domaine est un obstacle majeur. Des critères de réussite différents, et un manque d'appréciation de la qualité et de la portée du modèle. Dans le pire des cas, les modèles n'avaient aucune valeur. Par exemple, dans le modèle hERG, ils ont identifié, en utilisant des composés de validation mesurés dans les deux essais, que l'essai utilisé pour les données hERG de l'ensemble de formation donnait des résultats très différents des mêmes composés testés dans leur test hERG interne. Dans le modèle Caco-2, qui n'était pas prédictif, ils ont identifié que les composés de test-set interne étaient très différents des composés de training-set ; composés de l'ensemble d'apprentissage

Cependant, un modèle QSAR soigneusement construit et validé peut être un outil puissant pour guider la conception des médicaments. Par exemple, chez AstraZeneca, les modèles QSAR pour les hERG ont contribué à la réduction du nombre de composés synthétisés, qui est passé de 25,8% de tous les composés testés en 2003 à seulement 6% en 2010 (68).

5.6. Les descripteurs moléculaires :

Au cours des dernières décennies, de nombreux domaines de recherche ont bénéficié de l'utilisation de ce que l'on appelle les descripteurs moléculaires, qui sont des valeurs qui captent et convertissent, par une voie théorique, l'information codée dans la structure moléculaire ils sont généralement utilisés pour établir des relations quantitatives entre les structures et les propriétés, les activités biologiques ou d'autres propriétés expérimentales. Formellement, les descripteurs moléculaires sont des représentations mathématiques d'une molécule obtenues par un algorithme bien spécifié appliqué à une représentation moléculaire définie ou à une procédure expérimentale bien spécifiée : "Le descripteur moléculaire est le résultat final d'une procédure logique et mathématique qui transforme l'information chimique encodée dans une représentation symbolique d'une molécule en un nombre utile ou en le résultat d'une expérience normalisée. Les descripteurs moléculaires jouent un rôle fondamental dans la chimie, les sciences pharmaceutiques, la toxicologie, l'écotoxicologie, la recherche en santé et le contrôle de la qualité. La preuve de l'intérêt de la communauté scientifique pour les descripteurs moléculaires est fournie par le nombre considérable de descripteurs proposés au cours des dernières décennies : des milliers de descripteurs dérivant de différentes théories et approches ont été définis et sont calculables à l'aide d'outils logiciels dédiés. Chaque descripteur moléculaire ne code qu'une petite partie de l'ensemble des informations chimiques de la molécule réelle et, par conséquent, le nombre de descripteurs disponibles ne cesse d'augmenter avec la demande croissante d'études approfondies sur les systèmes chimiques et biologiques. La disponibilité des descripteurs moléculaires n'a pas seulement été une nouvelle occasion de rechercher de nouvelles relations structure-activité, mais elle a également déterminé un grand changement de paradigme de recherche : l'utilisation de descripteurs moléculaires théoriques a permis pour la première fois de lier les connaissances expérimentales aux informations théoriques provenant de la structure de la molécule. Alors que jusqu'aux années 60-70, la modélisation moléculaire consistait principalement à rechercher des relations mathématiques entre des quantités mesurées expérimentalement, aujourd'hui, la prédiction QSAR peut s'appuyer uniquement sur des propriétés déterminées par calcul (c'est-à-dire des descripteurs), ce qui accélère le temps de calcul, permettant d'effectuer des prédictions pour de grandes

bibliothèques de composés virtuels et réduit fortement les coûts associés.(9) En général, les descripteurs moléculaires doivent satisfaire à certaines exigences de base suggérées par Randic (71).

Milan Randic a proposé plusieurs recommandations pour les études QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship). Voici une liste de quelques-unes de ces recommandations :

Utiliser des descripteurs moléculaires appropriés qui décrivent de manière adéquate les structures moléculaires étudiées.

Utiliser des données de qualité pour l'ensemble de données d'apprentissage et de test.

Appliquer des méthodes statistiques appropriées pour l'analyse des données et la construction du modèle QSAR.

Valider le modèle QSAR de manière rigoureuse en utilisant des méthodes de validation croisée, de validation externe et de permutation.

Évaluer la robustesse du modèle QSAR en testant sa capacité à prédire de manière fiable les activités biologiques de composés structurellement similaires mais non inclus dans l'ensemble de données d'apprentissage.

Évaluer la domain of applicability (DOA) du modèle QSAR pour déterminer les limites de sa validité.

Documenter clairement les méthodes utilisées pour construire le modèle QSAR et la qualité des données utilisées.

5.7.Conception d'un modèle QSAR :

Le flux de travail typique pour le développement d'un modèle QSAR/QSPR nécessite trois parties fondamentales (Figure 18) :

- 1- un ensemble de données fournissant des mesures expérimentales d'une activité ou d'une propriété biologique pour un groupe de produits chimiques (c'est-à-dire la variable dépendante du modèle) ;
- 2- des descripteurs moléculaires, qui codent des informations sur les structures moléculaires (c'est-à-dire les variables indépendantes du modèle) ;
- 3- des méthodes mathématiques pour trouver les relations entre une propriété/activité de la molécule et la structure moléculaire (9).

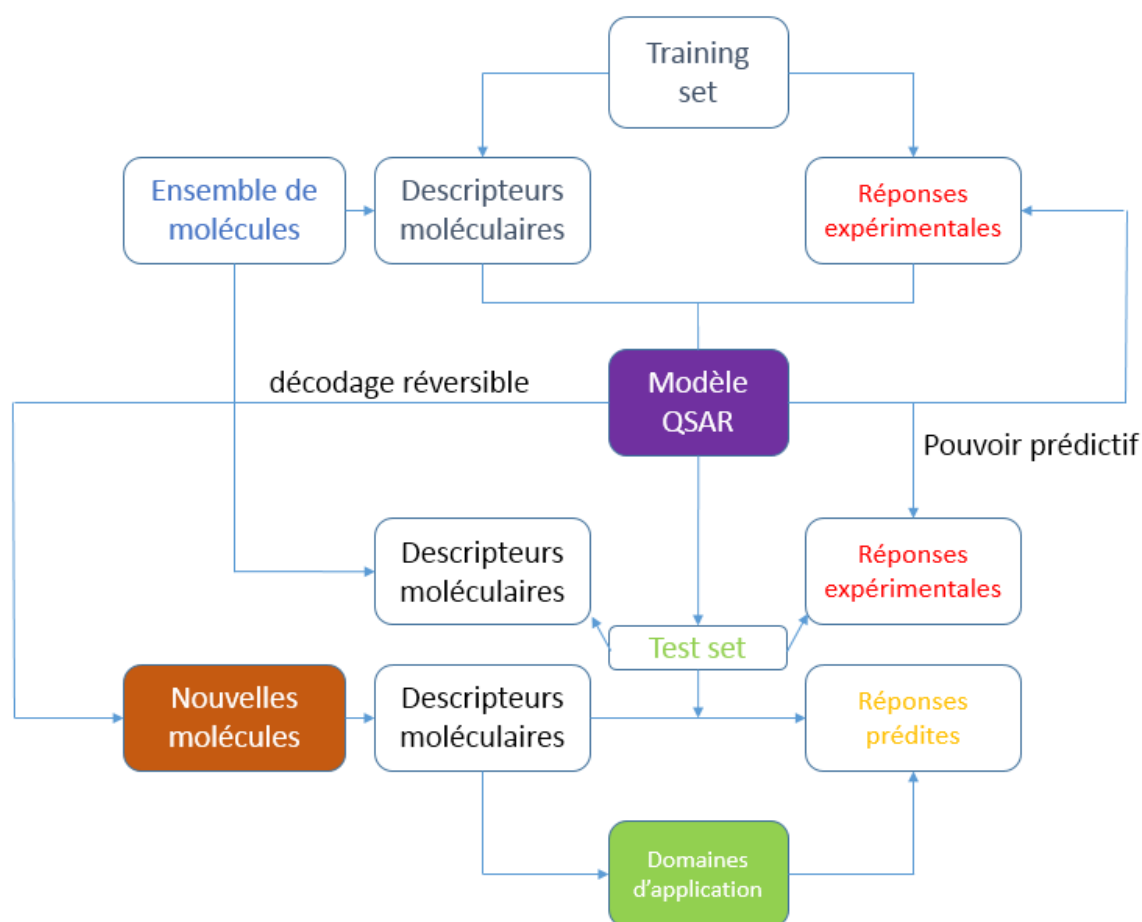


Figure 18 : schéma de la stratégie QSAR (9)

Pour construire un modèle QSAR, on utilise un ensemble de molécules avec des structures et des réponses biologiques connues, qui est divisé en deux sous-ensembles : le `training_set` (sous-ensemble pour construire le modèle) et le `test_set` (sous-ensemble pour valider le modèle). Chaque molécule dans l'ensemble de données a une structure et une réponse biologique connues, qui sont utilisées pour créer une formule mathématique (modèle QSAR) prédisant la réponse biologique en fonction des descripteurs moléculaires, qui sont des paramètres physico-chimiques des molécules. Le modèle est ensuite validé en utilisant le `test_set`. Une fois le modèle validé, il peut être utilisé pour prédire la réponse biologique de nouvelles molécules dont la structure est connue en calculant leurs descripteurs moléculaires et en appliquant ces données sur le modèle.

5.7.1. Préparation de la base de données :

Le développement d'un modèle QSAR (relation structure activité-quantitative) ou bien d'un modèle QSPR (relation structure-propriété quantitative) est un processus assez complexe,

comme le montre la (figure 18) (9). Certaines méthodes d'apprentissage automatique sont sensibles à la plage numérique des données de chaque descripteur. La régression PLS (Partial Least Squares en français : Moindres carrés partiels) en est un exemple : les descripteurs qui ont une plage plus large en raison des unités choisies peuvent indûment influencer l'ajustement des descripteurs aux données de réponse (y) en utilisant la méthode d'apprentissage statistique choisie. Par conséquent, l'ensemble de données est souvent «normalisé» ou «mis à l'échelle par unité» en soustrayant la valeur moyenne de chaque valeur de descripteur et en divisant par l'écart type de la colonne de descripteurs. Dans les méthodes sensibles à l'échelle, ce processus donne à chaque descripteur un poids égal pour contribuer au modèle (68).

5.7.2. Génération de la training-set et de la data-set :

L'ensemble de données est divisé en training-set et test-set. Le training-set est utilisé pour définir la relation mathématique, ou corrélation, entre la réponse (y) et les descripteurs (x), en utilisant la méthode d'apprentissage automatique choisie. Le test-set est utilisé pour évaluer la qualité du modèle QSAR par sa capacité à prédire un ensemble de molécules qui ne faisaient pas partie de la training_set. Étant donné que la plupart des méthodes d'apprentissage automatique utilisées pour définir les modèles QSAR sont très efficaces pour ajuster les descripteurs x aux données de réponse y, la qualité du modèle est généralement mieux évaluée en fonction de sa capacité à prédire un ensemble de tests indépendant, plutôt qu'en fonction de son ajustement aux composés du training-set. Certaines méthodes nécessitent un training-set, un tuning-set et un test/validation-set, où le tuning-set est utilisé pour la validation interne du modèle et le test-set pour la validation externe du modèle QSAR. Dans ce cas, l'ensemble de réglage est utilisé pour arrêter la phase de formation du modèle, ou pour choisir entre différents modèles, tandis que le validation-set est un test indépendant de la performance du modèle. Le test/validation-set peut être sélectionné à partir de l'ensemble de données d'origine de plusieurs manières, y compris par sélection aléatoire, par regroupement et sélection d'exemples représentatifs de l'ensemble de données d'origine, ou d'une manière qui satisferait Nils Bohr, en sélectionnant dans l'ordre chronologique, de sorte que les composés les plus récents constituent l'ensemble de test. Lorsque le modèle doit être utilisé dans un environnement de conception-fabrication-test, un ensemble de test ordonné dans le temps reflète le plus fidèlement la façon dont le modèle sera utilisé, pour prédire les nouveaux composés. La taille du test-set sélectionné dépend souvent de la quantité de composés sur lesquels vous disposez de données d'activité. Les composés sélectionnés pour le test-set limitent la quantité d'informations que vous mettez à la disposition de la méthode d'apprentissage automatique pour construire un modèle. Une

approche courante consiste à sélectionner 20 à 30 % de votre ensemble de données comme test-set. Si un QSAR a été utilisé dans un environnement conception-fabrication-test, semaine après semaine, et que la confiance a été établie dans sa prédictivité, un test-set beaucoup plus petit pourrait être utilisé lors de reconstructions ultérieures, afin de maximiser sa capacité à prédire le composé de demain (68).

5.7.3. Calcul des descripteurs moléculaires :

Les informations sur la structure des molécules, définies par des descripteurs moléculaires obtenus à partir de différentes représentations telles que 2D, 3D, etc. sont intégrées dans le modèle QSAR. Les conformations moléculaires utilisées doivent être correctes pour obtenir un meilleur modèle prédictif. Il existe différents types de descripteurs, comme les descripteurs de comptage (0D), les empreintes digitales (1D), les descripteurs topologiques (2D), géométriques (3D), basés sur une grille (4D), etc. La complexité des informations et le pouvoir de discrimination entre des structures similaires fournies par différents descripteurs augmentent avec la dimensionnalité. Les descripteurs 0D et 1D fournissent des informations de base comme la masse moléculaire et le nombre d'éléments constitutifs qui sont directement dérivés de la formule moléculaire. La charge nette de la molécule est un descripteur 1D. Les indices topologiques qui sont calculés à partir de la formule structurale sont des descripteurs 2D. Ils sont basés sur la théorie des graphes et reflètent les connexions dans la structure. Le descripteur topologique le plus largement utilisé est l'indice de connectivité proposé par Randić (2001) ; Li et Shi (2008) ; Kier (1985). Les autres indices topologiques sont l'indice W de Wiener (Ivanciuc, 2000 ; Wiener, 1947), les indices de connectivité (Kier et al., 1975), la forme de Kier (Kier, 1985), l'indice J de Balaban (Balaban, 1982) et les indices de Zagreb (Gutman et Trinajstić, 1972). Les descripteurs 3D sont basés sur les coordonnées tridimensionnelles des atomes composant les molécules. Certaines méthodes couramment utilisées pour calculer les descripteurs 3D sont CoMFA, CoMSIA, CoMBINE, GERM, CoMMA, GRIND, WHIM, HoloQSAR et CoSA. Les descripteurs 4D, 5D et 6D sont des descripteurs multidimensionnels, qui incluent les paramètres impliqués dans la structure et la flexibilité du site de liaison du récepteur en conjonction avec la topologie du ligand. Les descripteurs 4D sont basés sur des grilles de référence et des simulations de dynamique moléculaire. Les descripteurs calculés à partir de multiples conformations, orientations, états de protonation et isostériomères du ligand constituent des descripteurs 5D. Les termes de solvation constituent des descripteurs 6D. Les descripteurs moléculaires peuvent être calculés à l'aide de divers logiciels, dont certains sont énumérés dans le (tableau 04) (70).

Tableau 04 : exemples de logiciels utilisés dans le QSAR (70)

Logiciels	Description	disponibilité
ACD/LogP Freeware	Prédiction du logP par un algorithme basé sur les fragments	Gratuit
Dragon	Calcul des descripteurs topologiques, constitutionnels et géométriques	Commercial
MOLGEN	Calcul des descripteurs topologiques, constitutionnels et géométriques	Gratuit
PaDEL Descriptors	Calcul des descripteurs 2D et 3D	Gratuit

5.7.4. Construction du modèle QSAR :

La sélection des descripteurs à utiliser suit la méthode d'accumulation (ajout d'un descripteur à la fois) ou la méthode de réduction (suppression d'un descripteur à la fois). Quelle que soit la méthode choisie pour développer des modèles prédictifs, il est important de tenir compte des statistiques sur la qualité du modèle et de s'assurer qu'une méthodologie de modélisation correcte est utilisée, par exemple en testant le modèle par rapport à un ensemble de tests externes et non vus pour s'assurer qu'il ne s'adapte pas trop à l'ensemble d'apprentissage. L'extrapolation du modèle est un autre problème qui survient fréquemment lorsque les modèles sont appliqués en dehors de l'espace à partir duquel ils ont été générés. Là encore, il existe de nombreuses statistiques sur les modèles qui peuvent indiquer si de nouveaux points de données, à partir desquels les réponses doivent être prédites, peuvent être appliqués au modèle. Deux types de méthodes d'apprentissage supervisé sont largement utilisés pour construire des modèles en chimio-informatique et en toxicologie : la classification et la régression. Les méthodes de classification assignent les nouveaux objets, dans notre cas les molécules, à deux classes ou plus - le plus souvent soit biologiquement actives, soit inactives. Les méthodes de régression tentent d'utiliser des données continues, telles qu'une variable de réponse biologique mesurée, pour corréler les molécules avec ces données afin de prédire une valeur numérique continue pour les molécules nouvelles et inconnues en utilisant le modèle généré. Les méthodes les plus souvent utilisées pour la classification sont les moindres carrés partiels, l'analyse discriminante linéaire, le classificateur Naive Bayesian, les arbres de décision, le partitionnement récursif et les machines à vecteurs de support, tandis que pour la modélisation de la régression, la régression linéaire multiple, les moindres carrés partiels, les machines à vecteurs de support et les réseaux neuronaux artificiels sont souvent utilisés (72).

5.7.5. Validation du modèle QSAR :

Dans de nombreux cas, les modèles QSAR publiés mettent en œuvre la procédure de validation croisée leave-one-out :

5.7.5.1. Validation interne :

Se fait par calculent le coefficient de détermination R^2 validé par croisement, appelé q^2 . Si y_{pi} et y_i sont les valeurs de propriété prédites et observées, y_{pi}^m et y_i^m , respectivement, sont les valeurs moyennes des valeurs de propriété prédites et observées, le coefficient de détermination est défini comme suit :

$$R^2-1 = [\sum (y_{pi}-y_i)^2 / \sum (y_{pi}^m - y_i^m)] \quad (\text{équation 01})$$

Une valeur élevée de q^2 (par exemple, $q^2 > 0,5$) est considérée comme un indicateur ou même comme la preuve ultime que le modèle est hautement prédictif. Un q^2 élevé est la condition nécessaire pour qu'un modèle ait un pouvoir prédictif élevé ; cependant, ce n'est pas une condition suffisante. Outre les critères largement acceptés de vérification de q^2 , des conditions supplémentaires plus strictes sont souvent utilisées [19]. En effet, différents paramètres et valeurs ont été proposés. Indépendamment des valeurs absolues, nous devons nous rappeler que la performance statistique de tout modèle est liée à l'incertitude et à la variabilité des données originales utilisées pour construire le modèle.

5.7.5.2. Validation externe :

Les métriques de validation employées dans la validation externe sont les suivantes :

- R^2 prédictif qui peut également être donné comme Q^2 indique la corrélation des données observées et prédites. On dit que le modèle a un bon pouvoir prédictif si la valeur de Q^2 est supérieure à 0,5 (Roy et al. 2015b).
- Q^2 en utilisant la moyenne de l'ensemble de données de test et de l'ensemble de données de formation (SchüÛ Rmann et al., 2008). Pour la validation du modèle QSAR, une valeur seuil de 0,5 est définie pour les deux métriques (Roy et al., 2015b).
- Les critères de Golbraikh et Tropsha établissent des conditions pour la sélection des ensembles de données d'entraînement et de test. Pour avoir un bon pouvoir prédictif, le modèle QSAR doit satisfaire aux conditions suivantes (Golbraikh et Tropsha, 2002 ; Veerasamy et al., 2011) : i. $Q^2_{\text{training}} \geq 0,5$ ii. $R^2_{\text{test}} \geq 0,6$ iii. $(r^2 - r^2_0) / r^2_0 \geq 0,1$ ou $(r^2 - r^2_0) / r^2_0 \geq 0,1$, où r^2_0 est R^2 des activités prédites par rapport aux activités observées et r^2_0 est R^2 des activités

observées par rapport aux activités prédites. iv. $0,85 \leq k \leq 1,15$ ou $0,85 \leq k_0 \leq 1,15$, où k et k_0 sont les pentes des lignes de régression passant par l'origine.

d) Les autres métriques incluent l'erreur quadratique moyenne de prédiction (RMSEP) pour calculer l'erreur de prédiction du modèle QSAR (Roy et al., 2015b) ; le coefficient de corrélation de concordance (CCC), la mesure la plus restrictive et la plus prudente, avec une valeur idéale de 1 (Chirico et Gramatica, 2011) ; r^2 (rang) qui permet de faire des prédictions par ordre de rang (Roy et al., 2015b) ; et r^2 m (test) pour comprendre la relation entre les valeurs observées et prédites (Roy et Mitra, 2011 ; Roy et al., 2015b). (70)

5.8. Interprétation et domaines d'applications :

Les paramètres ou descripteurs utilisés dans le modèle doivent être interprétables. L'interprétation mécaniste du modèle QSAR construit aide à comprendre l'influence des descripteurs dans l'activité prédite. L'analyse du domaine d'applicabilité nous aide à comprendre si le modèle QSAR construit peut être utilisé pour n'importe quel ensemble de composés. Le modèle du domaine d'applicabilité est construit sur la région théorique présente dans l'espace chimique des descripteurs et de l'activité modélisée. Il permet de comprendre la faisabilité de l'activité ou de la prédiction de l'activité ou de la réponse par le modèle QSAR construit pour un ensemble donné de composés. Ainsi, la prédiction du modèle QSAR pour un ensemble de composés n'est fiable que si l'espace chimique ou le domaine d'applicabilité de ces composés tombe dans le domaine d'applicabilité des composés utilisés pour la formation. des composés utilisés pour l'apprentissage du modèle. (73) La région théorique dans l'espace chimique est identifiée ou estimée par différentes méthodes. L'évaluation du domaine d'application se fait par le biais de la distribution de densité de probabilité, de méthodes géométriques, de méthodes basées sur la distance, de plages dans l'espace des descripteurs lorsque l'espace des descripteurs est utilisé, et de la plage de la variable de réponse lorsque l'espace de réponse modélisé est utilisé (74).

5.9. Utilisations des modèles QSAR en chimie thérapeutique :

De nombreux chimistes médicaux voudront utiliser des modèles QSAR plutôt que de construire les leurs. De nombreux modèles QSAR pour les paramètres ADMET sont disponibles dans le domaine public, sous forme de logiciels gratuits ou de logiciels commerciaux. Ils sont basés sur des ensembles de données de la littérature et, en l'absence de données issues de leur propre chimie ou d'expertise pour construire leurs propres modèles QSAR, ce sont les seuls modèles auxquels de nombreux chimistes médicaux peuvent avoir

accès. La confiance que l'on peut avoir dans les prédictions de ces modèles doit être mûrement réfléchie. Si les composés que vous prédisez ne ressemblent pas à ceux de l'ensemble d'apprentissage du modèle, vous pouvez vous inquiéter de la qualité de la prédiction. Avant d'utiliser le modèle pour classer vos cibles synthétiques par ordre de priorité et d'engager des ressources précieuses pour synthétiser les cibles choisies, considérez les conseils et les astuces donnés. Pour un chimiste médicinal qui utilise un modèle QSAR, les étapes suivantes sont recommandées :

- Examinez la distribution des composés dans le training-set et le test-set sur la gamme de réponses. Les données sont-elles distribuées de manière homogène ou existe-t-il une région de l'espace d'activité ou de propriété qui contient une meilleure couverture, indiquant où de meilleures prédictions sont susceptibles d'être faites ?
- Examinez le Q^2 et le RMSE de test-set utilisé pour valider le modèle. Le modèle possède-t-il la résolution nécessaire pour résoudre le problème de votre projet ? Un r^2 ou q^2/Q^2 élevé semble impressionnant, mais si la fourchette de training-set ou de test-set est très large, l'erreur résiduelle inexpliquée du modèle peut encore être importante. Examinez donc la RMSE du modèle.
- Examinez l'erreur de prédiction des composés de test-set qui sont "les plus proches" du composé que vous prédisez (sur la base des mesures de distance au modèle). Vous pouvez constater que cela vous donne plus ou moins confiance dans le modèle. Vous pouvez constater qu'au sein du test-set, les composés qui sont plus similaires au training-set sont mieux prédits que la moyenne du test-set. Si ces composés sont similaires à votre composé cible, cela vous donnera plus de confiance dans la capacité du modèle à prédire votre composé.
- Le modèle QSAR peut être utilisé comme un filtre pour une bibliothèque virtuelle, ou interprété pour influencer la conception du composé. Examinez les caractéristiques de contrôle du modèle QSAR, cela peut vous donner une indication sur la façon dont vous pouvez modifier rationnellement vos molécules pour améliorer la propriété que vous essayez d'optimiser.
- Les variables importantes sont-elles similaires lorsque de nouveaux composés sont ajoutés au modèle, ou lorsque des composés sont retirés du modèle, ou lorsque des sous-modèles sont construits pendant la validation croisée ? L'instabilité des variables sélectionnées peut être le signe d'un modèle QSAR médiocre, erroné ou instable.

- Les nouveaux composés sont-ils bien prédits par votre modèle ? C'est le test ultime de tout modèle.
- Au fur et à mesure que de nouveaux composés sont synthétisés et mesurés dans votre essai, demandez à votre chimiste informaticien de mettre à jour le modèle QSAR afin de minimiser la distance entre les composés que vous allez concevoir et le domaine d'applicabilité du modèle QSAR. Continuez à surveiller vos prédictions au fur et à mesure que les composés synthétisés sont ensuite mesurés dans le test que votre modèle QSAR est censé prédire. Cela peut vous donner une plus grande confiance dans le modèle, ou mettre en évidence de nouvelles caractéristiques de vos molécules qui n'ont pas été identifiées dans le modèle (par exemple, si elle est étonnamment mal prédite alors que les composés précédents avaient été bien prédits). Les modèles QSAR peuvent être mis à jour automatiquement, ce qui garantit que votre modèle contient toujours vos derniers composés (AutoQSAR) (68).

Partie expérimentale

Introduction et objectifs :

La partie pratique de notre travail est divisée en cinq chapitres, chacun ayant un objectif spécifique. Le premier chapitre se concentre sur le docking moléculaire, qui utilise des outils de modélisation informatique pour comprendre la liaison moléculaire entre le ligand et l'ADN gyrase. Nous allons évaluer la force et la stabilité de cette liaison en utilisant des méthodes de simulation de docking moléculaire, identifier les sites de liaison et les résidus clés impliqués dans la liaison moléculaire, et optimiser la structure de la molécule ligand pour améliorer son affinité et sa spécificité pour la cible.

Le deuxième chapitre se concentre sur la modélisation QSAR, qui vise à construire un modèle QSAR pour prédire la concentration minimale inhibitrice d'une nouvelle molécule candidate inhibitrice de l'ADN gyrase. Nous allons valider le modèle en utilisant des méthodes de validation internes et externes, prédire la concentration minimale inhibitrice de la molécule exprimée en mg/L, et discuter des avantages et des limites de la modélisation QSAR.

Le troisième chapitre concerne la synthèse du produit candidat inhibiteur de l'ADN gyrase issu du docking moléculaire. Nous allons synthétiser le produit candidat en utilisant des techniques de synthèse organique, le purifier pour éliminer les impuretés qui pourraient affecter son activité inhibitrice, et calculer et discuter le rendement de la réaction.

Le quatrième chapitre est consacré à l'identification du produit synthétisé obtenu après la réaction de synthèse et la purification. Nous allons utiliser des techniques d'analyse physico-chimique telles que la spectroscopie de masse, la spectroscopie infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour identifier le produit synthétisé, confirmer sa pureté et sa stabilité, et vous assurer que la molécule obtenue correspond bien à la structure théorique conçue pour inhiber l'ADN gyrase.

Enfin, le cinquième chapitre porte sur l'évaluation de l'activité antibiotique de la nouvelle molécule candidate synthétisée contre différentes souches de bactéries en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la molécule. Nous allons utiliser la méthode de dilution en milieu liquide pour déterminer la CMI de la molécule contre différentes souches de bactéries, évaluer son efficacité en tant qu'antibiotique potentiel contre des souches de bactéries ciblées, comparer son activité à celle de la ciprofloxacine, qui représente un antibiotique de référence, et essayer d'expliquer le mécanisme de résistance des bactéries à cette molécule en étudiant les mécanismes de résistance bactérienne connus

Chapitre 1 :

Docking

moléculaire

Chapitre 1 : docking

1.1.Introduction :

La partie expérimentale de cette thèse sur la conception d'un antibiotique par docking moléculaire et modélisation QSAR comprend une étude de docking visant à comprendre la liaison moléculaire entre le ligand et l'ADN gyrase. L'objectif de cette partie est de mieux comprendre les mécanismes de liaison moléculaire impliqués dans l'interaction entre le ligand et l'ADN gyrase, une cible importante pour le développement d'antibiotiques efficaces. L'intérêt spécifique de cette étude inclue l'évaluation de la force et de la stabilité de la liaison moléculaire, l'identification des sites de liaison et des résidus clés impliqués dans l'interaction moléculaire, l'optimisation de la structure du ligand pour améliorer l'affinité et la spécificité de la liaison, et enfin la contribution à la découverte de nouveaux médicaments inhibiteurs de l'ADN gyrase. Cette partie de la thèse fournira des informations précieuses pour la conception et l'optimisation de composés antibiotiques ciblant l'ADN gyrase.

1.2.Objectifs :

Le chapitre de docking moléculaire a pour objectif de comprendre la liaison moléculaire entre le ligand et l'ADN gyrase en utilisant des outils de modélisation informatique. Nous allons évaluer la force et la stabilité de la liaison moléculaire entre le ligand et l'ADN gyrase en utilisant des méthodes de simulation de docking moléculaire à l'aide du logiciel Molegro(75). Ensuite, nous allons identifier les sites de liaison et les résidus clés impliqués dans la liaison moléculaire afin de mieux comprendre le mode d'action de la molécule candidate. Nous allons également optimiser la structure de la molécule ligand pour améliorer l'affinité et la spécificité de la liaison avec l'ADN gyrase. L'objectif final de cette partie de la recherche est de contribuer à la découverte de nouveaux médicaments inhibiteurs de l'ADN gyrase en identifiant des molécules candidates potentielles ayant une forte affinité et une spécificité élevée pour la cible. Cette partie de la recherche est cruciale pour la conception de médicaments et peut aider à accélérer le processus de découverte de nouveaux médicaments.

1.3. Matériel et méthodes :

1.3.1. Matériel :

1.3.1.1 Base de données :

A- La protéine cible utilisée dans le criblage :

La protéine data base utilisée dans notre étude est la 2XCT qui représente La structure jumelée 3.35A° du complexe *S. aureus* Gyrase avec la ciprofloxacine et l'ADN, (76) cette protéine a été choisie selon les critères mentionnés ci-dessous et qui a été téléchargée depuis la protéine data base (77).

Critères de choix :

Pour choisir la protéine cible la plus appropriée pour notre étude, nous avons établi des critères de sélection. Tout d'abord, nous avons choisi des complexes protéiques dans lesquels le ligand avait été testé in vitro pour garantir leur pertinence biologique. Nous avons également sélectionné des complexes contenant un ligand de référence commun (ciprofloxacine), pour faciliter les comparaisons entre les complexes. Ensuite, nous avons utilisé la valeur de Root Mean Square Deviation (la déviation quadratique moyenne) la plus basse après le redocking du ligand dans le site actif (tableau 05) comme critère pour évaluer la qualité de l'interaction ligand-protéine. Enfin, nous avons vérifié que les fichiers Proteine Data Base (PDB) des complexes ne présentaient aucune erreur après leur ouverture dans le logiciel de docking, afin d'éviter tout biais dans notre analyse. En prenant en compte ces différents critères, nous avons identifié les complexes ligand-protéine les plus appropriés pour notre étude.

Tableau 05 : Protéines utilisées, identifiant du ligand et résolution (75)

PDB	Ligand	Enzyme	Moyenne des RMSD	Résolution
2XCS	GSK299423	ADN gyrase de <i>S. aureus</i>	4.231	2.1A°
5NPK	Tiophène	ADN gyrase de <i>S. aureus</i>	5.611	1.98A°
2XCT	Ciprofloxacin	ADN gyrase de <i>E. coli</i>	1.716	3.35A°
3ILW	E60211	Sous unité N-terminale de l'ADN gyrase de <i>E. coli</i>	5.728	1.60A°
4Z2C	Moxifloxacin	ADN Gyrase de <i>S. pneumoneae</i>	4.315	2.80A°

Le RMSD (Root Mean Square Deviation) est une mesure de l'écart entre deux structures moléculaires superposées. Plus précisément, il mesure la moyenne des écarts entre les positions des atomes dans les deux structures, en tenant compte de leur distance. Dans notre cas, nous avons effectué un redocking et mesuré le RMSD de chaque protéine. Les valeurs que nous avons obtenues indiquent l'écart entre la structure d'origine de la protéine et la structure de la protéine après le redocking. En général, un RMSD inférieur à 2 Å est considéré comme une bonne correspondance entre les deux structures, tandis qu'un RMSD supérieur à 4 Å indique une différence significative entre les deux structures. En examinant ces résultats, il semble que la protéine 2XCT a la correspondance la plus précise avec une valeur RMSD de 1.716, tandis que la protéine 3ILX a la moins bonne correspondance avec une valeur RMSD de 5.728. Les autres protéines se situent quelque part entre ces deux extrêmes, avec des valeurs RMSD allant de 4.231 à 4.315 pour la 2XCS et 4Z2C, respectivement, et une valeur de 5.611 pour la 5NPK.

B- Les ligands :

Dans notre étude, les ligands ont été sélectionnés à partir de la banque de données PubChem. Au total, 1662 ligands ont été téléchargés au format SDF (Structure Data File). Les critères de

sélection ont inclus un taux de similarité de 90% avec le ligand de référence, la ciprofloxacine. L'originalité des molécules n'a pas été considérée dans le choix des ligands à docker. Cette méthode de sélection a permis de réduire le nombre de ligands à une taille gérable pour le docking.

1.3.1.2. Ordinateurs :

Notre docking moléculaire a été lancé à l'aide d'une machine dotée d'un processeur Intel Core i7 2630QM, équipée d'une carte graphique NVIDIA GeForce GT 540M Cuda 2Go et d'une mémoire ram de 8 Go.

1.3.1.3. Logiciels :

Dans le cadre de cette étude, le docking moléculaire a été effectué en utilisant le logiciel MOLEGRO VIRTUAL DOCKER(75). Ce logiciel est spécialement conçu pour prédire les interactions entre deux molécules, telles que les protéines et les ligands. Pour garantir la qualité des résultats obtenus, la correction de la structure de la protéine cible a été effectuée à l'aide du logiciel DeepView/Swiss-PdbViewer(78). Cette étape de préparation de la structure est cruciale car elle permet de s'assurer de la qualité des données utilisées pour le docking, et donc de la fiabilité des résultats obtenus.

1.3.2. Méthodes :

Principe du docking moléculaire :

Il s'agit d'une topologie du site actif par une représentation tridimensionnelle, en précisant la géométrie de distance et les énergies des différents types de liaisons qui influencent sensiblement la stéréochimie dont l'interaction ligand-récepteur en dépend.(79)

Le but du développement de médicaments contre les organismes pathogènes est l'inhibition totale, menant à la mort du pathogène. Les cibles des médicaments antimicrobiens devraient être essentielles, avoir une fonction unique, être présentes seulement dans l'agent pathogène et pouvoir être inhibées par une petite molécule. La cible doit être connue, car elle fait partie d'un cycle crucial dans la cellule, et son élimination doit conduire à la mort de l'agent pathogène. La cible doit être unique ; aucune autre voie ne doit pouvoir compléter la fonction de la cible et surmonter la présence de l'inhibiteur. Si la macromolécule répond à tous les critères décrits pour être une cible médicamenteuse, mais qu'elle fonctionne aussi bien dans des cellules humaines saines que dans un pathogène, la spécificité peut souvent être intégrée dans

l'inhibiteur, en exploitant les différences structurales ou biochimiques entre les formes pathogène et humaine. Enfin, les enzymes sont souvent d'excellentes cibles médicamenteuses parce que les composés peuvent être conçus pour se tenir dans la poche du site actif.(80)

La première étape de sélection, consiste 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 (79).

La deuxième étape est le scoring, qui consiste à évaluer l'affinité ligand/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 (81).

Les types de programmes de Docking automatisés peuvent être répartis-en :

- Exhaustive : un grand nombre de conformations sont générés pour chaque ligand, et tous sont évalués (ex : Fred) ;
- Stochastique : seules quelques solutions sont évaluées ; les résultats peuvent ne pas être reproductibles (63).

Le docking est la méthode « structure based » utilisée pour mesurer l'affinité des ligands pour la protéine ADN gyrase, elle permet la prédiction de la fixation d'un ligand sur son site d'action et ses interactions avec la protéine (figures 19,20) et avec l'ADN (figure 21), elle permet aussi de générer les différentes poses, leurs positions, orientations et conformations dans le site actif (64).

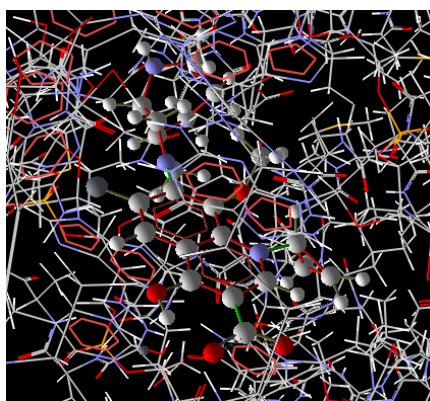


Figure 19 : site de fixation du ligand de référence capturé par le programme Molegro

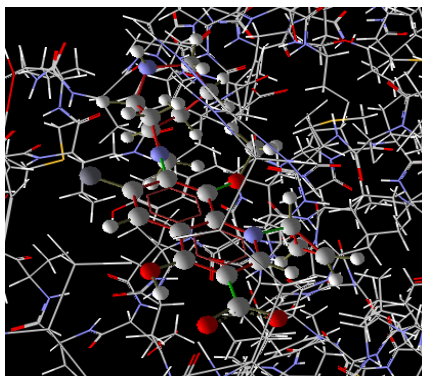


Figure 20 : interaction Ligand-Proteine simulée par le programme Molegro

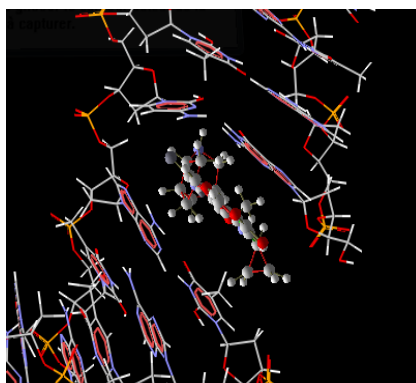


Figure 21 : interaction Ligand-ADN simulée par le programme Molegro

Dans le cadre de notre étude, l'algorithme de recherche employé est le GPU screening CUDA, qui permet une recherche efficace et rapide des configurations les plus stables des ligands au sein des protéines cibles. La fonction de score utilisée pour évaluer la qualité des complexes protéine-ligand est MolDock, une fonction de score bien établie qui prend en compte à la fois les interactions intermoléculaires et intramoléculaires pour fournir une estimation précise de l'énergie de liaison. Ces outils ont été sélectionnés pour leur capacité à fournir des résultats de haute qualité et leur efficacité à exécuter des simulations de docking de manière fiable (75).

1.4.Résultats et discussion :

1.4.1. La validation du programme :

Les valeurs de RMSD (Root-mean-square deviation) obtenues lors du redocking des protéines selon le (tableau 05) varient de 1.716 jusqu'à 5.728. On a choisi la valeur la plus basse qui correspond à la PDB 2XCT dont le ligand est la ciprofloxacine qui est un antibiotique de référence de la famille des fluoroquinolones (46).

1.4.2. Les énergies d'interaction enzyme-ligand (tableau 06) :

Dans notre étude de docking utilisant l'ADN gyrase d'*E. coli* comme protéine cible et 1662 molécules comme ligands, nous avons retenu les 10 molécules présentant les meilleures interactions avec la protéine cible et l'ADN.

Les 10 molécules prises en considérations, représentées sur le (tableau 06), sont les molécules qui présentent les énergies de liaisons les plus basses, ce qui correspond aux complexes ligand-enzyme les plus stables (67).

Les molécules sélectionnées dans notre étude sont plus actives que la molécule de référence, elles présentent toutes des énergies de liaison plus basses que celle de la ciprofloxacine, ce qui signifie qu'elle forment des complexes avec l'ADN gyrase plus stable que ceux formés entre la ciprofloxacine et l'ADN gyrase.

L'énergie de liaison du ligand de référence (ciprofloxacine) avec l'ADN du complexe enzymatique présente une valeur de -136,532 qui est nettement inférieure à la valeur de sa liaison avec la protéine qui est de -17,741 ; l'activité inhibitrice de l'ADN gyrase, est donc conditionnée par une valeur d'énergie de liaison avec l'ADN plus basse que celle de la liaison avec la protéine. Les dix molécules retenues (tableau 06) ont montré une interaction intéressante avec l'ADN gyrase, avec des énergies totales comprises entre -227,36 et -203,842. Ces molécules ont formé un nombre variable de liaisons hydrogène avec la protéine et l'ADN, allant de 1 à 6, et ont interagi avec l'ADN gyrase à des énergies externes protéine-ligand allant de -120,338 à -38.5 et des énergies externes ADN-ligand allant de -182,521 à -130,173.

Parmi les 10 molécules sélectionnées, la molécule 58344411 a la plus basse énergie totale de -227,36, ce qui suggère une interaction forte avec la protéine cible. Cette molécule a également formé le plus grand nombre de liaisons hydrogène avec la protéine (5) et l'ADN (4). Les autres molécules sélectionnées ont également une énergie totale négative et ont formé des liaisons hydrogène avec la protéine et/ou l'ADN.

En se basant sur ces données, on a pris en considération les molécules avec les énergies de liaison Ligand-ADN les plus basses ayant un nombre de liaison hydrogène plus élevé dont les Identifiant de ces derniers sur la base de données PubChem sont : 67941830, 56838103, 58180731.

1.4.3. Comparaison des interactions des ligands sélectionnés avec le ligand de référence :

En comparant le nombre de liaison hydrogène des ligands sélectionnés qui passe de 4 à 5 avec celui du ligand de référence qui est égal à 1, on remarque que les complexes formés avec ces molécules sont plus stables que celui formé par le ligand de référence (ciprofloxacine).

1.4.4. Identification de l'activité biologique avec les ligands sélectionnés :

67941830; la molécule possède une activité antituberculeuse prometteuse (82).

56838103 ; la molécule présente une activité antimicrobienne, elle est brevetée sous le brevet US8329908B2

58180731 ; la molécule présente une activité antimicrobienne contre *E. coli* mais son activité antituberculeuse n'est pas encore prouvée.

Notre criblage nous a permis donc de sélectionner 3 molécules théoriquement actives, les deux premières sont déjà décrites dans la littérature (67941830 et 56838103).

Notre étude peut être poursuivie par une mise en évidence de l'activité antituberculeuse de la molécule 58180731 récemment découverte.

Tableau 06 : Les énergies de liaison enzyme-ligand des dix premières molécules de la base de données (75)

Identifiant du ligand sur PubChem	Énergie Totale	Énergie Externe		Énergie interne	Nombre de liaisons Hydrogène avec la protéine	Nombre de liaisons Hydrogène avec l'ADN
		Protéine-ligand	ADN-ligand			
Ciprofloxacine	-117,462	-17,741	-136,532	36	1	1
58344411	-227,36	-120,338	-130,173	23,152	5	4
67311808	-217,146	-63,992	-169,68	16,526	2	3
58180731	-212,910	-70,067	-180,520	40,677	2	5
42641770	-210,317	-59,723	-168,259	17,666	5	4
59650039	-207,700	-63,468	-160,613	16,381	6	2
24879259	-206,421	-60,637	-163,113	17,328	2	1
67941830	-206,193	-50,752	-172,302	16,861	2	4
68795618	-205,889	-66,895	-170,371	31,377	3	2
14457298	-205,604	-38,5	-182,521	15,417	1	2
56838103	-203,842-	-67,890	-175,343	39,391	1	4

1.4.5. Design de nouvelles molécules :

Selon les résultats précédents (tableau 06), les molécules qui contiennent des groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogènes sur le cycle azoté en position 7 sont les plus actifs, avec les valeurs des énergies de liaisons les plus basses, et un nombre important de liaisons avec l'ADN et/ou la protéine, la plupart des médicaments commercialisés prennent cette structure de base.(46)

Sur cette base nous allons faire un design de molécules appartenant à la série des 7-pipérazine fluoroquinolones qui n'est pas totalement exploitée notamment les dérivés N-acylés et N-chloroalkylés

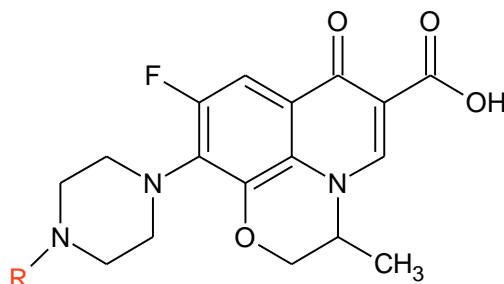


Figure 22 : structure générale des 7-pipérazine fluoroquinolones N-substituées

Dans le but de bien exploiter cette série, 10 molécules ont été proposées en remplaçant le radical R (figure 22) par des groupements qui ont tendance à former des liaisons hydrogène, dont 2 sont déjà commercialisées, 4 sont déjà synthétisées et leurs activités antibiotiques sont connues, et 4 nouvelles molécules qui n'ont jamais été synthétisées auparavant, ces molécules ont été dockées avec l'ADN gyrase PDB 2XCT avec MOLEGRO VIRTUAL DOCKER via l'algorithme GPU scoring cuda et les résultats sont représentés dans le (tableau 07).

Tableau 07 : Les énergies de liaison enzyme-ligand des molécules issues du design (75)

R	Ligand-ID Dci/pubchem	Energie totale	Energie externe		Energie interne	Liaisons hydrogènes avec la protéine	Liaisons hydrogènes avec les fragments d'ADN
			Protéine -ligand	ADN- ligand			
/	Ciprofloxacin	-118.638	-22.101	-128.481	31.944	Ser 1084 (B) Arg 1122 (B)	F, H, G
Méthyle	Ofloxacin	-157.771	-68.846	-112.971	24.047	Gly 459 (B) Arg 1122 (D)	E
Propanoyle	Molécule originale	-192.273	-67.982	-144.490	20.199	Gly 459 (B) Arg 1122 (B)	2xG, H, E
Chlorométhyle	Molécule originale	-178.398	-36.479	-167.615	25.696	Arg 1122 (G)	2xG, 2xH
Chloroéthyle	Molécule originale	-177.652	-32.372	-180.007	34.727	0	3xH, G, E
Acétyle	452725	-175.495	-68.971	-132.509	25.985	Arg 1122 (D) Gly 459 (B)	G, H, E
Ethyle	13060060	-174.166	-33.342	-173.772	32.947	0	3xH, G
Propyle	452724	-171.016	-69.501	-128.495	26.980	Gly 459 (B) Arg 1122 (D)	E
Isobutyle	Molécule originale	-169.618	-29.911	-173.588	33.881	Ser 1084 (B) Arg 1122 (D)	G, H
Isopropyle	13400660	-166.719	-39.977	-160.967	34.224	Ser 1084 (B) x2 Arg 1122 (D)	G
Tertiobutyle	Molécule originale	-165.901	-54.223	-150.634	38.955	Arg 1122(D) Gly 459 (B)	G, E

Selon les résultats du (tableau 07) :

Les groupements C=O du cycle quinolone, l'OH de l'acide et l'oxygène du cycle oxazinane sont communs entre tous les dérivés et sont indispensables pour l'activité inhibitrice de l'ADN gyrase, le type de liaison varie d'un composé à l'autre, les groupements C=O du cycle quinolone et l'oxygène oxazinanique forment des liaisons avec les acides aminés (figure 23), tandis que l'OH de la fonction acide se lie avec le fragment E de l'ADN, ce qui concorde avec les résultats de l'étude réalisée par Fedorowicz, J. 2019.(83)

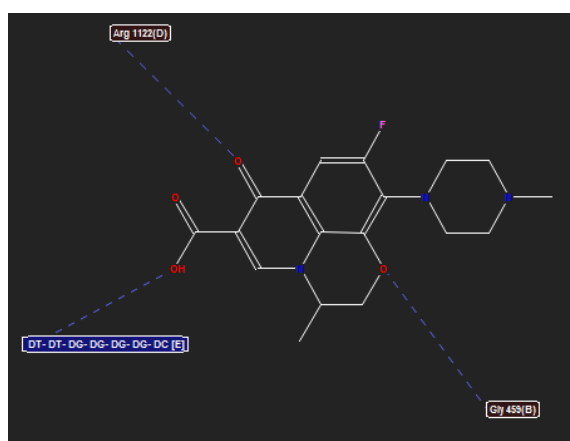


Figure 23 : carte de ligand de l'interaction du dérivé N-méthyle (ofloxacin) avec l'ADN gyrase

Les substituants donneurs d'électrons dont l'isopropyle, l'isobutyle, le propyle, le tertibutyle favorisent la formation d'une liaison hydrogène entre le fragment G de l'ADN de l'enzyme et l'azote pipérazinique, cela est peut-être dû à l'interaction stérique entre le groupement isopropyle et le résidu Arg 458 (B) comme le montre la figure 24.

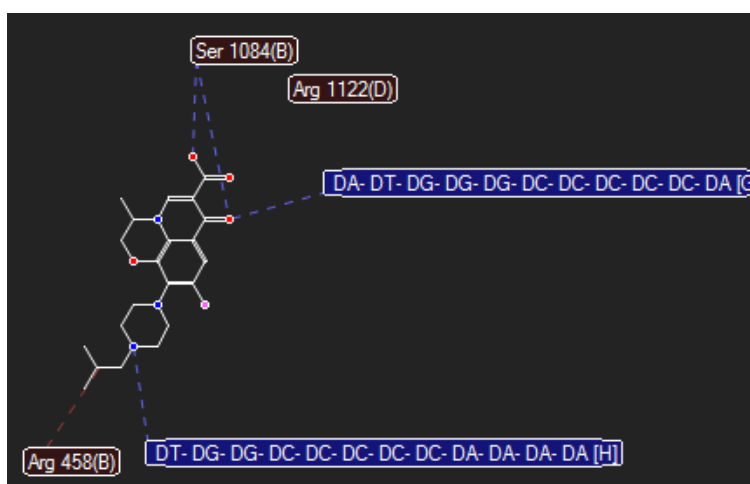


Figure 24 : carte de ligand de l'interaction du dérivé N-Isobutyle avec l'ADN gyrase

Le groupement C=O des dérivés N-Acylés permet d'établir des liaisons supplémentaires avec l'ADN ce qui justifie les valeurs très basses des énergies de liaisons entre ces derniers et l'ADN gyrase (tableau 07), et accorde la formation de complexes stables (ADN, molécule et enzyme) favorisant ainsi l'activité inhibitrice de l'enzyme ADN gyrase.

Les dérivés substitués sur l'atome d'azote N du cycle pipérazinique, par des groupements électroattracteurs tels que les groupements chloro dans le chlorométhyle et le chloroéthyle, favorisent la formation de liaisons stériques entre le cycle pipérazinique et le résidu Arg 1122 (D)

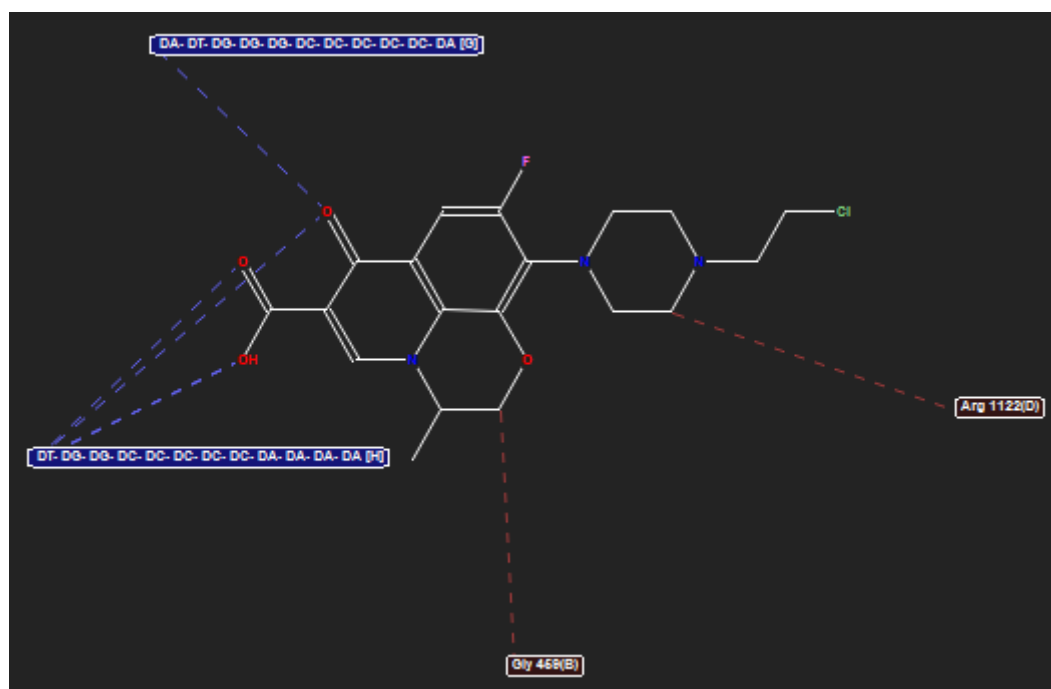


Figure 25 : carte de ligand de l'interaction du dérivé N-chloroéthyle avec l'ADN gyrase

Dans le contexte du docking moléculaire, une carte de ligand représente le ligand (c'est-à-dire la molécule qui se lie à une protéine cible) à l'intérieur d'un site de liaison de la protéine. Cette carte peut être générée à partir des informations obtenues à partir de structures cristallographiques de la protéine ligandée, ou calculée à partir de simulations de dynamique moléculaire en précisant le nombre et la nature des liaisons intermoléculaires entre le ligand et la protéine. Dans le cas du programme Molegro, les liaisons hydrogènes sont représentées par des traits discontinus en bleu, et les interactions hydrophobes sont représentées par des traits discontinus en marron.

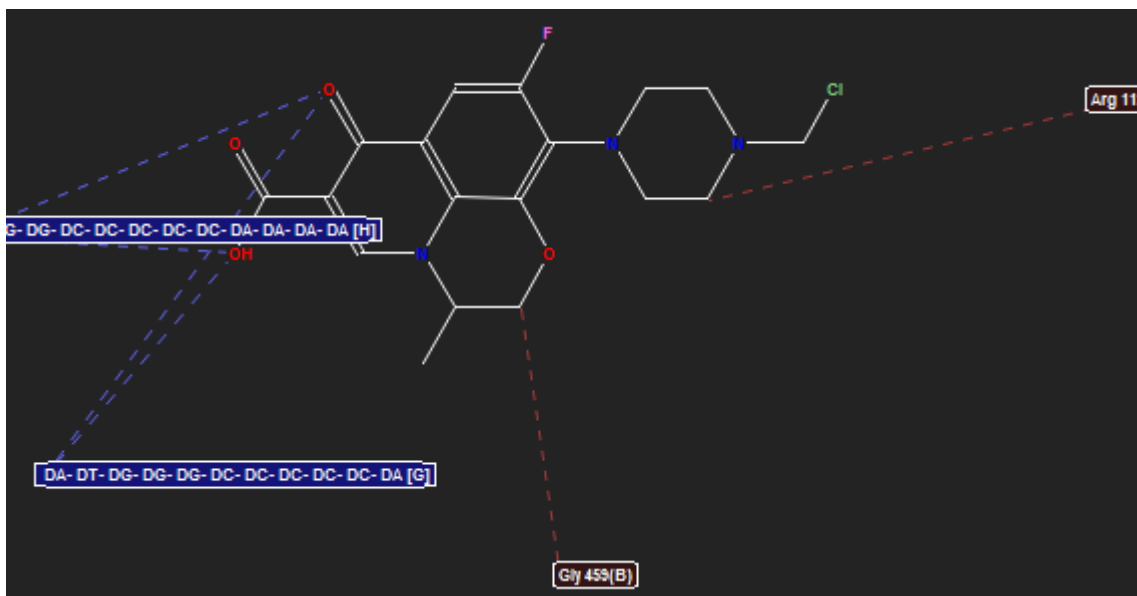


Figure 26 : carte de ligand de l'interaction du dérivé N-chlorométhyle avec l'ADN gyrase

Dans cette étude nous avons fait un essai de docking sur une série de molécules sélectionnées selon leurs structures proches des inhibiteurs de références et qui sont susceptibles d'interagir avec l'ADN gyrase in-silico, l'analyse des différentes structures des 10 premières molécules dont les scores d'énergies de liaisons sont les plus bas nous a orienté vers les dérivés de la 7-pipérazine quinolone. Les résultats de mesures des scores d'énergies d'interactions après docking de ces dernières molécules ont démontré que les dérivés N-propanoylé (molécule 01) et N-chloroéthylé (molécule 02) de la 7-pipérazine quinolone (figure 27) sont prometteurs et s'avéraient actives in-silico avec une activité prédite plus importante que celle des molécules de référence, notamment la ciprofloxacine et l'ofloxacine, ces deux molécules candidates doivent faire l'objet d'une synthèse et d'essais biologiques in vitro.

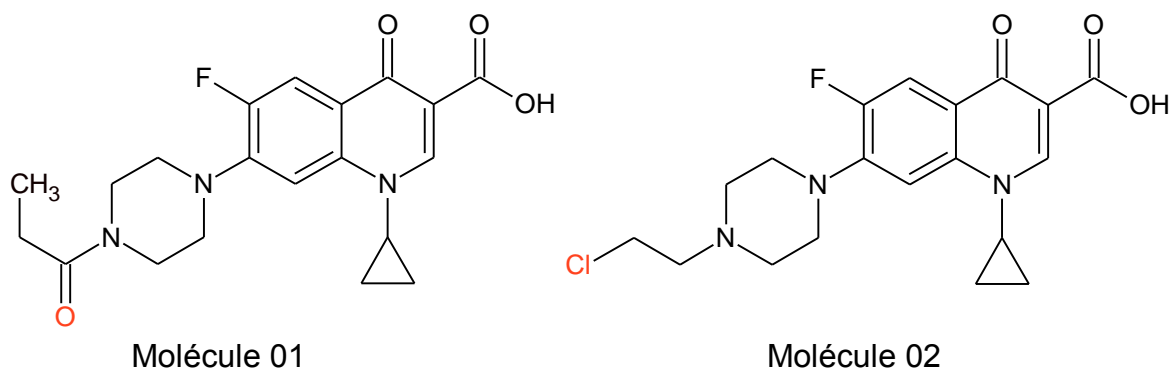


Figure 27 : structure des deux molécules candidates issues du docking

1.5. Conclusion :

En conclusion, notre étude de docking a permis d'identifier parmi les 1662 molécules similaires à la ciprofloxacine avec taux de similarité de 90%, les 10 molécules les plus actives comme inhibitrice de l'ADN gyrase (tableau 06), en se basant sur leur énergie de liaison et leur capacité à former des liaisons hydrogènes avec l'enzyme. En général, notre étude suggère que la substitution de groupes donneurs ou accepteurs d'électrons sur le cycle pipérazine en position 7 pourrait être une stratégie efficace pour concevoir de nouvelles molécules inhibitrices de l'ADN gyrase. Ensuite, nous avons proposé un design de 10 nouvelles molécules (tableau 07) dont les 02 les plus actives sont : une première molécule substituée par un propanoyle (molécule 01), et la deuxième substituée par un chloroéthyle, nous avons synthétisé et testé l'activité antibiotique de la molécule 01, mais malheureusement, nous n'avons pas pu synthétiser la molécule 02 en raison de contraintes matérielles.

En fin, notre travail de thèse a fourni des informations utiles pour la conception et le développement de nouvelles molécules anti-infectieuses ciblant l'ADN gyrase. Les résultats de notre étude pourraient être utilisés pour orienter de futures recherches dans ce domaine.

Chapitre 2 :

QSAR

Chapitre 2 : QSAR :

2.1. Introduction :

Le QSAR est une technique populaire, et est désormais un outil totalement intégré dans la découverte de médicaments. Mais la dérivation et l'utilisation des modèles QSAR sont semées d'embûches et de complexité. De nombreux modèles QSAR de la littérature, avec des statistiques apparemment attrayantes, ne codent en réalité que des relations fortuites. Les algorithmes statistiques appliqués sont des outils très puissants pour trouver des schémas de corrélation dans les ensembles de données, et le constructeur du modèle peut ne pas savoir s'il s'agit de véritables relations sous-jacentes ou d'aléas statistiques qui ne parviennent pas à prédire dans le temps, c'est-à-dire dans la vie réelle. Par exemple, dans l'article de Stouch et de ses collègues intitulé " In silico ADME/Tox : why models fail " (ADME/Tox in silico : pourquoi les modèles échouent), les auteurs mettent en avant l'expérience de Bristol-Myers Squibb qui a tenté de valider des modèles QSAR construits par des fournisseurs pour l'inhibition hERG, la perméabilité Caco-2, l'inhibition du cytochrome P450 2D6 et la solubilité aqueuse. Les auteurs ont conclu que même dans les meilleurs cas, les constructeurs et les utilisateurs peuvent avoir des critères de réussite différents et un manque d'appréciation de la qualité et de la portée du modèle. Dans le pire des cas, les modèles n'avaient aucune valeur. Par exemple, dans le modèle hERG, ils ont identifié, en utilisant des composés de validation mesurés dans les deux tests, que le test utilisé pour l'ensemble des données hERG de la formation donnait des résultats très différents des mêmes composés testés dans leur test hERG interne. Dans le modèle Caco-2, qui n'était pas prédictif, ils ont identifié que les composés de l'ensemble de test interne étaient très différents des composés de l'ensemble d'entraînement issus de la littérature (sur la base de la similarité bidimensionnelle), ceci peut avoir une implication importante sur la performance du modèle QSAR. En effet, si le modèle est construit à partir d'un ensemble de données d'entraînement qui ne représente pas bien la diversité des composés que l'on cherche à prédire, alors le modèle risque d'être biaisé et peu performant pour prédire la structure de nouveaux composés(70,84,85).

2.2. Objectifs :

La partie QSAR de notre étude vise à construire un modèle QSAR pour prédire la concentration minimale inhibitrice d'une nouvelle molécule candidate inhibitrice de l'ADN gyrase. Nous allons valider le modèle par des méthodes de validation internes et externes et interpréter les résultats de la modélisation QSAR. Nous allons également discuter les avantages et les limites

de la modélisation QSAR et sa contribution au domaine de la chimie médicinale. En utilisant le modèle QSAR développé, nous allons prédire la concentration minimale inhibitrice de la molécule exprimée en mg/L afin d'avoir une idée de la réponse biologique de la molécule synthétisée contre les différentes souches de bactéries. Cette partie de notre travail permettra d'optimiser la conception de nouveaux antibiotiques en utilisant des méthodes de modélisation moléculaire avancées, ce qui permettra d'élargir la gamme de composés potentiels et de réduire le temps et les coûts associés à la synthèse et aux essais expérimentaux.

2.3. L'intérêt de la modélisation QSAR :

La modélisation QSAR, qui fait partie de notre travail sur la conception d'un antibiotique par docking moléculaire et modélisation QSAR, présente une importance particulière car elle permet de prédire la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la molécule à synthétiser. Cette information est essentielle pour évaluer l'activité biologique de la molécule contre différentes souches de bactéries. La CMI représente la plus petite concentration d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance de la bactérie cible, et est donc un indicateur clé de l'efficacité de l'antibiotique. En utilisant des méthodes de modélisation QSAR, il est possible de prédire la CMI d'une molécule sans avoir à effectuer des tests *in vitro* coûteux et chronophages. Cette approche peut également être utilisée pour prédire l'activité de nouvelles molécules qui n'ont pas encore été synthétisées, ce qui peut accélérer le processus de découverte de nouveaux antibiotiques. En outre, la modélisation QSAR permet de comprendre les relations quantitatives entre la structure chimique de la molécule et son activité biologique, ce qui peut fournir des informations précieuses pour la conception de nouveaux composés antibiotiques plus efficaces et sélectifs. Globalement, l'utilisation de la modélisation QSAR dans notre étude vise à optimiser l'efficacité des antibiotiques en aidant à prédire leur activité contre différentes souches de bactéries et en fournissant des informations pour la conception de nouveaux composés antibiotiques efficaces et sélectifs.

2.4. Matériels et méthodes

2.4.1. Matériel :

A. Ordinateur :

Nous avons utilisé un ordinateur avec un processeur : intel inside CORE™ i7 2630QM, une carte graphique NVIDIA GeForce 540M et une mémoire vive de 8.00 Go.

B. Logiciels :

Dans notre étude nous avons utilisé le logiciel Microsoft Excel qui est logiciel sous licence Microsoft office qui nous a permis de traiter des données(86), pour la conversion de fichiers de données chimiques entre différents formats nous avons utilisé le logiciel OpenBabel qui est un logiciel libre de chimie informatique (87), le calcul des descripteurs moléculaires a été fait à l'aide du logiciel Padel 2.21 qui est un logiciel libre (88).

Le développement du modèle QSAR a été fait à l'aide du programme Molegro qui est un logiciel sous licence qui permet le traitement de données et la construction des modèles QSAR par la méthode de régression linéaire multiple et la validation par la méthode 'leave one out'(89). La visualisation et l'organisation des données a été faite par le logiciel Accelrys Discovery studio 2.5 (90).

C. Sélection de la cible biologique :

Il s'agit de l'ADN gyrase comme cible biologique dans notre étude.

D. Base de données :

L'ensemble de données utilisé pour construire et valider les modèles QSAR (dataset) se compose de 173 composés téléchargés à partir de la base de données en ligne ChEMBL(91) dont l'activité inhibitrice de l'ADN gyrase a été mesurée et décrite dans la littérature. Leurs activités consistent à l'inhibition de l'ADN gyrase d'*Escherichia coli*.

Les concentrations minimales inhibitrices exprimées en $\mu\text{g/mL}$, sont converties en $\mu\text{M/mL}$ à l'aide du logiciel MS Excel.

On retient pour chaque molécule :

- L'identifiant ChEMBL (le matricule de la molécule dans la base de données ChEMBL)(91)
- Le poids moléculaire.
- La structure.
- La CMI exprimée en $\mu\text{M/mL}$
- La référence

L'activité anti ADN gyrase a été quantifiée par la mesure de la CMI de chaque molécule par la même méthode.

2.4.2. Méthodes :

A. Optimisation géométrique :

Les structures des molécules sont générées par le logiciel OpenBabel à partir des smiles (Simplified Molecular Input Line Entry System), qui est un format de représentation linéaire de structures moléculaires en chimie, il permet de représenter les molécules sous forme de chaînes de caractères, ce qui les rend facilement utilisables pour le stockage, la recherche et la transmission de données moléculaires.

B. Génération des descripteurs moléculaires :

La génération des descripteurs moléculaires est faite à l'aide du logiciel Padel à partir des structures moléculaires sous format smile (*.smi)(68).

C. La méthodologie de génération des descripteurs :

Le programme Padel se base sur des algorithmes et des simulations pour générer les descripteurs qui sont des paramètres physico-chimiques des molécules de la Dataset (88).

D. Construction du modèle QSAR :

La relation entre les descripteurs moléculaires basés sur la structure et l'activité biologique des composés de l'ensemble de données est déterminée à l'aide de la méthode de régression linéaire multiple(70). La régression linéaire multiple permet de modéliser une relation linéaire entre la variable dépendante et plusieurs variables indépendantes. Pour construire un modèle QSAR, les variables indépendantes correspondent à des descripteurs moléculaires.

Principe de la régression linéaire multiple :

Le principe de la régression linéaire multiple pour développer un modèle QSAR consiste à utiliser des données d'entraînement pour trouver une relation linéaire entre les descripteurs moléculaires et la variable de réponse. Le modèle résultant peut ensuite être utilisé pour prédire l'activité biologique ou la propriété physique de molécules inconnues à partir de leurs descripteurs moléculaires.

Le processus de régression linéaire multiple consiste à ajuster une équation linéaire à un ensemble de données d'entraînement. L'équation prend la forme :

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_nx_n + \varepsilon \text{ (équation 02)}$$

où y est la variable de réponse, β_0 est l'ordonnée à l'origine, $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ sont les coefficients de régression qui indiquent la contribution de chaque descripteur moléculaire à la prédiction de la variable de réponse, x_1, x_2, \dots, x_n sont les descripteurs moléculaires et ε est l'erreur aléatoire.

Le but de la régression linéaire multiple est de trouver les coefficients de régression $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ qui minimisent la somme des carrés des résidus, c'est-à-dire la différence entre la valeur prédite par le modèle et la valeur réelle de la variable de réponse pour chaque observation dans l'ensemble de données d'entraînement.

Une fois que les coefficients de régression ont été trouvés, le modèle peut être utilisé pour prédire la variable de réponse pour de nouvelles molécules à partir de leurs descripteurs moléculaires (73).

D.1. Les étapes de la construction du modèle à l'aide du logiciel Molegro :

Chargement des données sur Molegro Data Modeller à partir du fichier dataset.csv qui contient les descripteurs moléculaires pour chaque composé.

D.2. Critères de sélection des descripteurs :

La sélection des descripteurs est une étape cruciale dans le développement d'un modèle QSAR car elle a un impact direct sur la performance du modèle et sa capacité de généralisation à de nouvelles données. Les critères de sélection des descripteurs peuvent varier en fonction du contexte de l'étude et des données disponibles (72).

La première étape de sélection consiste à éliminer les descripteurs qui se corrèlent entre eux avec un coefficient de détermination R^2 supérieur ou égal à 0.90.

D.3. Préparation des données :

Tout d'abord, les cellules invalides sont supprimées afin d'obtenir un ensemble de données cohérent et propre. Ensuite, les colonnes constantes sont retirées, car elles ne contribuent pas à la modélisation et peuvent encombrer l'ensemble de données. Un facteur de corrélation est ensuite configuré à 0,90 pour éliminer les colonnes hautement corrélées et ainsi éviter toute redondance dans les données. Ensuite, une colonne pMIC est ajoutée pour représenter la puissance de l'activité antimicrobienne, mesurée par le logarithme négatif de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette colonne est ajoutée pour faciliter l'analyse et la modélisation de l'activité antimicrobienne. Ainsi, ces étapes de préparation des données pour un modèle QSAR permettent d'obtenir un ensemble de données cohérent et optimisé pour la modélisation

de l'activité antimicrobienne, la dernière étape de préparation consiste à une division de l'ensemble de données (173 molécules) en deux sous-ensembles :

- Sous ensemble de construction du modèle qui représente les 80% de l'ensemble des données (139 molécules)
- Sous ensemble de validation qui représente 20% des molécules de l'ensemble des données (34 molécules)

D.4. Construction du model en utilisant Molegro Data Modeller :

En utilisant la méthode MLR, on va établir le modèle, la deuxième étape de sélection des descripteurs consiste à choisir les descripteurs les plus pertinents et qui ont une forte influence sur la réponse, la sélection est basée aussi sur la régression linéaire multiple (68).

D.5. Le choix du meilleur modèle avec le nombre optimal des variables :

Ainsi, pour sélectionner le modèle optimal, nous calculons le coefficient de détermination R^2 pour chaque modèle en utilisant différents nombres de descripteurs. Le modèle qui présente le meilleur R^2 pour un nombre optimal de descripteurs est choisi comme le meilleur modèle (70).

E. Evaluation et validation du modèle :

L'objectif de la validation est de déterminer la précision générale du modèle et de s'assurer qu'il peut être utilisé pour des applications réelles sans sur-ajustement. Les métriques couramment utilisées pour évaluer la précision du modèle incluent la corrélation entre les valeurs prédites et expérimentales, la sensibilité, la spécificité et la précision

La validation du modèle se fait par 2 méthodes :

Validation interne (leave one out):

La validation interne leave-one-out (LOO) est une méthode de validation croisée utilisée pour évaluer la performance d'un modèle QSAR en utilisant les données d'entraînement disponibles. La méthode LOO consiste à retirer un seul échantillon de la base de données d'entraînement à la fois, à construire un modèle sur les échantillons restants et à utiliser le modèle pour prédire la valeur du même échantillon retiré (69).

Validation externe :

Afin d'effectuer une validation plus réaliste du pouvoir prédictif des modèles, une validation externe a également été réalisée. À cette fin, les composés de l'ensemble de données ont été

divisés en un ensemble d'entraînement (139 molécules de la data_set) utilisé pour construire le modèle) et un ensemble de test (34 molécules) utilisé pour la prédiction externe. La répartition des composés dans ces deux ensembles a été faite de façon aléatoire par le logiciel Molegro Data Modeller, l'ensemble de test était composé d'environ 1/5 des composés de l'ensemble de données et l'ensemble d'entraînement du reste (72).

2.5. Résultats et discussion :

2.5.1. Le modèle QSAR :

$$\text{pMIC} = (2.63495 \times \text{ATSC7c}) + (3.53977 \times \text{GATS2v}) - (44.4255 \times \text{ASP-1}) + (0.641928 \times \text{nHCsat}) + (0.0672126 \times \text{minHBint6}) + 18.2874 \text{ (équation 03)}$$

Il s'agit d'une équation de modèle de prédiction pour la concentration minimal inhibitrice (CMI) pour une mesurer l'efficacité d'un composé à inhiber la croissance d'un micro-organisme. Les coefficients de l'équation sont les poids associés à chaque descripteur, qui déterminent la contribution de chaque descripteur à la prédiction de la concentration minimale inhibitrice.

L'équation ci-dessus (équation 03) indique que la CMI est une fonction linéaire combinant les descripteurs ATSC7c, GATS2v, ASP-1, nHCsat, minHBint6 et une constante. Les valeurs de ces descripteurs pour une molécule donnée peuvent être utilisées pour prédire sa CMI.

Avec :

ATSC7c : Complémentarité de forme par auto-torsion avec les sphères de van der Waals à échelle de volume et de charge.

GATS2v: Complémentarité de forme par auto-torsion généralisée avec des sphères de van der Waals à volume réduit

ASP-1 : Potentiel de surface atomique

nHCsat : Nombre de donneurs et d'accepteurs de liaisons hydrogène d'une unité tautomérique

minHBint6: Énergie minimale d'interaction de la liaison hydrogène pour 6 tautomères (88).

Il est important de noter que (l'équation 03) a été développée à partir d'un ensemble de données d'entraînement, et sa performance peut varier en fonction des données d'entraînement utilisées, de la qualité des descripteurs et de la méthodologie utilisée pour développer le modèle. Par conséquent, il est souvent nécessaire de valider le modèle avec des données indépendantes pour évaluer sa robustesse et sa fiabilité.

2.5.2. Validation du modèle :

A. Validation interne :

La validité de notre modèle QSAR a été prouvée par une validation interne Leave-one-out (LOO) qui est une technique de validation croisée couramment utilisée pour évaluer la performance d'un modèle prédictif, cette technique consiste à retirer un seul échantillon de l'ensemble de données d'entraînement à chaque itération et à évaluer la performance du modèle sur l'échantillon retiré. La valeur de coefficient de détermination (R^2) est calculée à l'aide du programme Molegro Data Modeler(89) la valeur du coefficient de détermination est de 0.812016 ($R^2 = 0.812016$). La validation croisée a également été utilisée, où le coefficient de prédiction Q^2 , qui est calculé aussi à l'aide du programme Molegro Data Modeler était de 0.81084. La valeur de Q^2 supérieure à 0,5 révèle la validité de notre modèle QSAR (7).

B. Validation externe :

La validation externe du modèle QSAR a été réalisée à l'aide de l'ensemble de validation du modèle, qui est un groupe de molécules indépendantes qui n'ont pas été utilisés pour le développement du modèle. Les résultats obtenus ont montré un coefficient de détermination R^2 de 0,853157 et un coefficient de prédiction Q^2 de 0,837605. Il est important de noter qu'une valeur de Q^2 supérieure à 0,5 indique la validité d'un modèle QSAR. Ces résultats confirment donc la robustesse et la fiabilité de notre modèle QSAR pour la prédiction des activités biologiques des molécules étudiées.

Le coefficient de détermination R^2 et le coefficient de prédiction Q^2 sont calculés à l'aide du programme Molegro Data Modeler.

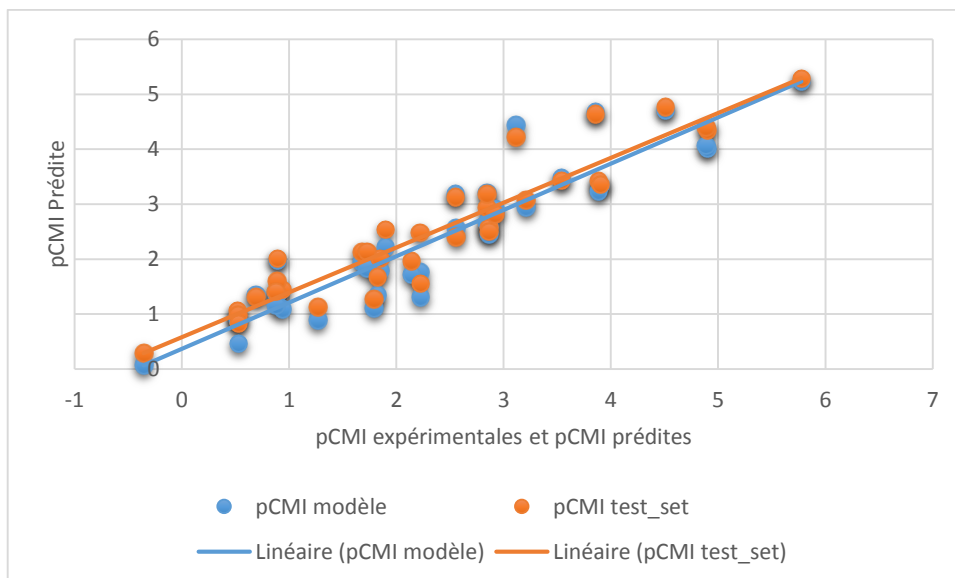


Figure 28 : La pCMI prédite de l'ensemble de validation par rapport à la pCMI expérimentale

2.5.3. Analyse des descripteurs :

ATSC7c (AutoTorsion Shape Complementarity with Volume and Charge-scaled van der Waals spheres) est un descripteur moléculaire qui prend en compte non seulement la forme et la complémentarité des molécules, mais aussi leurs propriétés volumétriques et électriques.

Comme pour ATSC2v, ATSC7c est généré à partir de la superposition de deux molécules et de la mesure de la complémentarité de forme entre elles. Cependant, il utilise des sphères de van der Waals ajustées en fonction du volume moléculaire et de la charge pour représenter les propriétés volumétriques et électriques des atomes et des groupes d'atomes.

ATSC7c est utilisé pour prédire les interactions moléculaires et les activités biologiques, en particulier dans les études de liaison protéine-ligand.

Dans notre cas le coefficient multiplicateur de ce descripteur est important, ce qui reflète l'importance du volume, la forme et les propriétés électriques du cycle quinolone, pour avoir une activité optimale, dans le cas de notre molécule il est égal à -0.125

Cependant, dans notre matrice toutes les molécules prennent une valeur inférieure à 1 ce qui explique l'impact négatif de ce paramètre sur l'activité anti ADN gyrase

GATS2v (Generalized AutoTorsion Shape Complementarity with Volume-scaled van der Waals spheres) est un descripteur moléculaire généré à partir de la superposition de plusieurs molécules plutôt que de deux.

GATS2v mesure la complémentarité de forme entre plusieurs molécules et utilise des sphères de van der Waals ajustées en fonction du volume moléculaire pour représenter la taille des atomes et des groupes d'atomes.

Ce descripteur est utilisé pour prédire les activités biologiques et les interactions moléculaires, en particulier dans les études de liaison protéine-ligand.

ASP-1 (Atomic Surface Potential) est un descripteur moléculaire qui mesure la répartition de la charge sur la surface externe d'une molécule. Il est généré en utilisant une méthode appelée potentiel de surface atomique qui assigne une valeur de charge à chaque atome dans une molécule en fonction de sa position par rapport aux autres atomes.

ASP-1 est utilisé pour prédire les propriétés physico-chimiques des molécules, telles que la solubilité, la stabilité thermique et la toxicité.

Il est important de noter que ASP-1 est un descripteur global qui prend en compte l'ensemble de la molécule, et non pas des propriétés locales de chaque atome ou groupe d'atomes. Par conséquent, il est souvent utilisé en combinaison avec d'autres descripteurs pour une meilleure prédiction des propriétés moléculaires et biologiques.

Dans notre cas le ASP-1 présente la variable avec la plus grande valeur du coefficient multiplicateur (44.4255), mais cette valeur est négative, ce qui signifie que le potentiel atomique des molécules doit avoir une valeur basse pour une activité antibiotique optimale, dans notre molécule il prend une valeur de 0.4322.

nHCsatu (Number of Hydrogen Bond Donors and Acceptors of a Tautomeric Unit) est un descripteur moléculaire qui mesure le nombre d'atomes dans une molécule qui peuvent donner ou accepter des liaisons hydrogène. Les liaisons hydrogène sont des interactions intermoléculaires qui se produisent entre des atomes de l'hydrogène et d'autres atomes, tels que l'azote ou l'oxygène.

nHCsatu est utilisé pour prédire les propriétés physico-chimiques des molécules, telles que la solubilité et la stabilité thermique. Il peut également être utilisé pour prédire les activités biologiques, en particulier dans les études de liaison protéine-ligand.

Il est important de noter que nHCsatu ne prend en compte que le nombre d'atomes qui peuvent donner ou accepter des liaisons hydrogène, et non la force ou la qualité de ces interactions. Par conséquent, il est souvent utilisé en combinaison avec d'autres descripteurs pour une meilleure prédiction des propriétés moléculaires et biologiques.

Dans notre cas le nHCsatu prend une valeur de 0.6419, ce qui explique l'influence de la présence des groupements donneurs et accepteurs tel que le groupement amide (figure 29) sur l'activité antibiotique comme dans le cas de notre molécule (la molécule 01 issue du docking) qui présente une fonction amine sur le cycle pipérazine (figure30). Le coefficient multiplicateur de cette variable est relativement faible (0.6419), ce qui explique la faible différence d'activité biologique entre les molécules qui possèdent ce type de groupements chimiques et celles qui n'en possèdent pas.

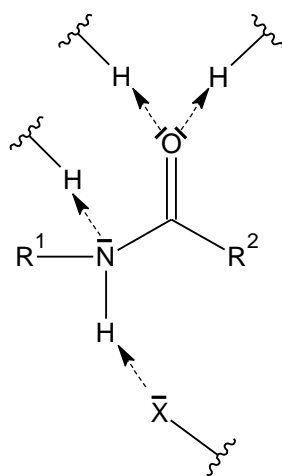


Figure 29 : l'impact de la fonction amide sur le descripteur nHCsatu

minHBint6 (Minimum Hydrogen Bond Interaction Energy of 6 Tautomers) est un descripteur moléculaire qui mesure l'énergie minimale de la liaison hydrogène entre six tautomères d'une molécule. Les tautomères sont des formes alternatives d'une molécule qui diffèrent par la distribution des groupes fonctionnels ou des charges sur les atomes.

minHBint6 est utilisé pour prédire les propriétés physico-chimiques des molécules, telles que la stabilité thermique et la solubilité. Il peut également être utilisé pour prédire les activités biologiques, en particulier dans les études de liaison protéine-ligand.

Il est important de noter que minHBint6 ne prend en compte que l'énergie minimale de la liaison hydrogène entre six tautomères, et non pas les autres formes d'interactions intermoléculaires qui peuvent se produire. Par conséquent, il est souvent utilisé en combinaison avec d'autres descripteurs pour une meilleure prédiction des propriétés moléculaires et biologiques.

Dans notre cas, le minHBint6 prend la valeur la plus basse du coefficient multiplicateur, la fonction cétone en position 4 est présente chez toutes les molécules, et le rajout d'une ou deux autres fonctions cétones ne va pas influencer trop sur l'activité antibiotique.

En comparant notre modèle avec celui obtenu dans l'étude de El Gamal et al (7) dont l'équation est la suivante :

$$pMIC = -4.151 + 0.249 ALogP - 5.787 MR - 2.171 J.WPSA1 + 9.055 MSA + 1.107 M.V. + 0.246 ShadY - 1.753 J.WNSA1 \text{ (équation 04)}$$

Avec :

AlogP : logarithme décimal du coefficient de partage octanol-eau

MR : Rayon moléculaire, il est défini comme la somme des rayons atomiques de tous les atomes qui composent une molécule.

J.WPSA1 : Weighted Polar Surface Area, il fait référence à la première aire de surface pondérée de la molécule.

MSA: Mean Surface Area, est un indicateur de la taille d'une molécule en termes de surface.

M.V. : volume moléculaire

ShadY : ombre moléculaire

J.WNSA1 : Weighted Non-Polar Surface Area, il fait référence à la première aire de surface non polaire pondérée de la molécule

On remarque que les descripteurs de chaque modèle ont des caractéristiques différentes. Le modèle de El Gamal et al (7) utilise des descripteurs tels que AlogP, MR, J.WPSA1, MSA, M.V. et ShadY qui sont principalement basés sur des propriétés physico-chimiques de la molécule. D'un autre côté, notre modèle utilise des descripteurs tels que ATSC7c, GATS2v, ASP-1, nHCsatu et minHBint6, qui sont plus basés sur la structure moléculaire.

2.6. Prédiction de l'activité biologique :

Si on applique la formule QSAR à notre molécule on obtient une valeur de CMI de 0.79 mg/L

Il est important de noter que cette valeur n'est qu'une estimation et qu'elle doit être confirmée par des expériences en laboratoire.

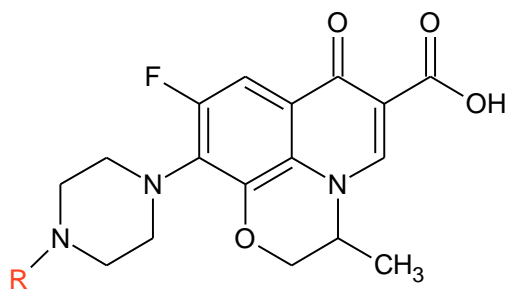


Figure 30 : structure générale des 7-pipérazine fluoroquinolones N-substituées

Tableau 08 : prédiction de la CMI de quelques molécules issues du docking

R	CMI prédite (mg/L)
Chlorométhyle	0.196
Chloroéthyle	0.184
Isobutyle	1.43
Tertiobutyle	0.91

Selon notre modèle QSAR l'activité augmente dans l'ordre suivant : isobutyle, tertiobutyle, chlorométhyle et chloroéthyle.

Selon les résultats du docking l'activité augmente dans l'ordre suivant : tertiobutyle, isobutyle, chloroéthyle et chlorométhyle.

Les résultats obtenus à partir des approches QSAR et docking présentent des différences significatives dans l'ordre de l'activité des molécules étudiées. La raison principale de cette différence est que les deux méthodes sont basées sur des principes différents. Le QSAR prend en compte plusieurs paramètres tels que la pénétration dans la bactérie et l'atteinte du site d'action, tandis que le docking ne considère que l'interaction protéine-ligand.

Le QSAR est une méthode de modélisation qui permet de prédire l'activité biologique d'une molécule à partir de ses propriétés physicochimiques et structurales. Cette approche prend en compte plusieurs paramètres tels que la lipophilie, la solubilité, la polarité et la taille de la molécule. Cela permet de prédire l'activité biologique de la molécule dans un système biologique donné. Cependant, le QSAR ne prend pas en compte les interactions moléculaires spécifiques entre la protéine cible et le ligand.

Le docking, quant à lui, est une méthode de simulation moléculaire qui permet de prédire l'interaction entre une protéine et un ligand. Cette approche simule l'interaction entre les deux molécules pour prédire la conformation et l'énergie de liaison du complexe protéine-ligand.

Cependant, le docking ne prend pas en compte les interactions avec d'autres molécules ou facteurs qui peuvent influencer l'activité biologique de la molécule.

Il est recommandé de combiner les approches QSAR et docking pour fournir une prédiction plus précise de l'activité biologique d'une molécule. En utilisant le QSAR, on peut prendre en compte plusieurs paramètres physicochimiques et biologiques de la molécule, y compris la pénétration dans la bactérie et l'atteinte du site d'action. Ensuite, en utilisant le docking, on peut simuler l'interaction protéine-ligand et prédire la conformation et l'énergie de liaison du complexe. Cette approche combinée peut fournir des informations plus complètes sur l'activité de la molécule en tenant compte à la fois des propriétés intrinsèques de la molécule et de son interaction avec la protéine cible. Par conséquent, l'utilisation de ces deux approches combinées peut améliorer la précision de la prédiction de l'activité biologique d'une molécule et ainsi aider à la découverte de nouveaux médicaments

2.7. Limites des études QSAR:

Nous avons remarqué une différence entre CMI réelle et prédictive avec des valeurs plus hautes de CMI pour des molécules plus actives et vice versa.

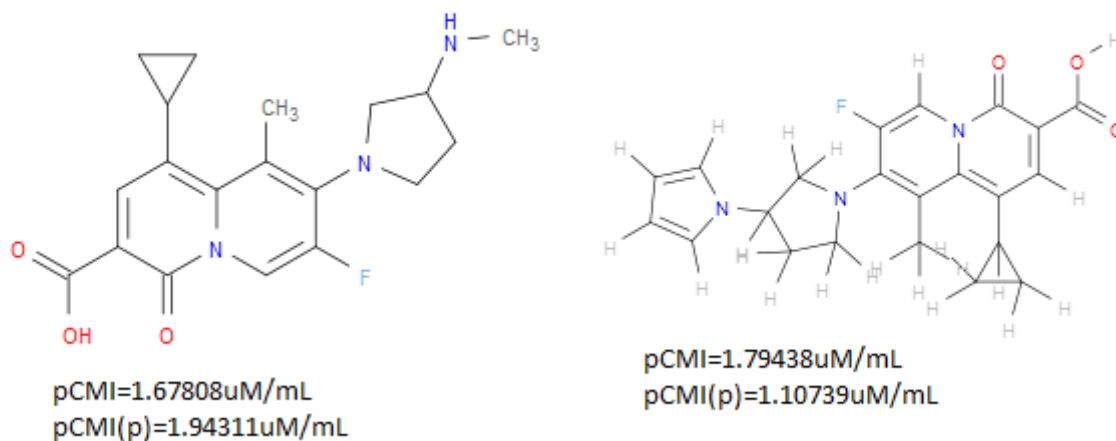


Figure 31 : QSAR entre valeur réelles et valeur prédictives

Avec :

pCMI : la concentration minimale inhibitrice réelle

pCMI(p) : la concentration minimale inhibitrice prédite

Les CMI ne sont pas mesurées de façon exacte ; cela est dû à la méthode de dilution $\frac{1}{2}$ utilisée dans la majorité des études publiées.

Les méthodes *in silico* sont des méthodes d'orientation, les méthodes *in vitro* sont indispensables pour avoir une idée réelle sur l'activité biologique d'une molécule.

2.8. Conclusion :

En conclusion, notre étude QSAR a permis de construire un modèle prédictif de la concentration minimale inhibitrice des molécules. Ce modèle a été validé à la fois par des méthodes de validation internes et externes, ce qui renforce sa robustesse et sa capacité à prédire avec précision l'activité des molécules.

L'utilisation de la méthode QSAR a permis d'interpréter les résultats de manière à mieux comprendre les relations entre la structure chimique des molécules et leur activité biologique notamment le pouvoir donneur et accepteur de liaisons hydrogène. Nous avons également discuté des avantages et des limites de la modélisation QSAR et de sa contribution au domaine de la chimie médicinale, ce qui a permis de mettre en évidence l'importance de cette approche dans le processus de développement de nouveaux médicaments. Enfin, la prédiction de la concentration minimale inhibitrice de la (molécule 01), issue de notre étude de docking qui était de 0.79mg/L, a montré que sa puissance était comparable à celle de la ciprofloxacine avec une concentration minimale inhibitrice prédite de 0.87mg/L, un antibiotique couramment utilisé. Ces résultats suggèrent que cette nouvelle molécule pourrait être une alternative intéressante pour traiter les infections bactériennes. En somme, notre étude QSAR a fourni des informations utiles pour la conception de nouvelles molécules antibiotiques et a contribué à la compréhension des relations entre la structure chimique et l'activité biologique des molécules. Ces résultats pourraient être utilisés pour guider de futures recherches en chimie médicinale.

Chapitre 3 :

Synthèse chimique

Chapitre 3 : synthèse de la molécule 01 issue du docking

3.1. Introduction :

L'étape de synthèse du produit candidat inhibiteur de l'ADN gyrase est cruciale, car elle permet d'obtenir une quantité suffisante de produit synthétisé et purifié pour les tests expérimentaux. Cette partie de la recherche implique l'utilisation de techniques de synthèse organique pour produire la molécule candidate conçue à l'aide du docking moléculaire. La purification du produit synthétisé est également importante pour éliminer les impuretés qui pourraient affecter son activité inhibitrice. Cette étape est essentielle pour atteindre les objectifs de l'étude et pour pouvoir évaluer l'activité inhibitrice de la nouvelle molécule candidate contre différentes souches de bactéries.

3.2. Objectifs :

L'objectif de cette partie de la recherche est de synthétiser le produit candidat inhibiteur de l'ADN gyrase issu du docking moléculaire. Pour cela, nous allons d'abord synthétiser le produit candidat en utilisant des techniques de synthèse organique. Nous allons ensuite purifier le produit pour éliminer les impuretés qui pourraient affecter son activité inhibitrice. Enfin, nous allons calculer et discuter le rendement de la réaction. Cette partie de notre étude permettra d'obtenir une quantité suffisante de produit synthétisé purifié pour les tests expérimentaux et d'évaluer l'activité inhibitrice de la nouvelle molécule candidate contre différentes souches de bactéries.

3.3. Présentation de la molécule :

A. Structure :

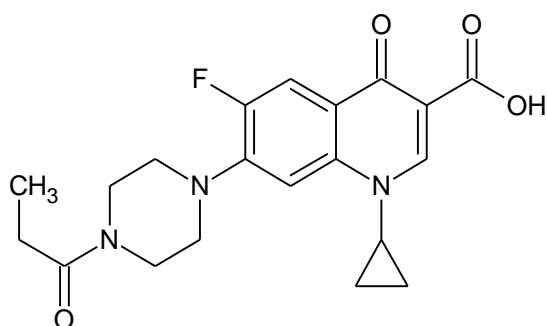


Figure 32 : structure chimique de la molécule à synthétiser

B. Nom l'UICPA : Acide 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(4-propanoylpipérazin-1-yl)quinoléine-3-carboxylique

C. Formule brute : $C_{20}H_{22}N_3O_4F$

D. Poids moléculaire : 387.346 g/mol

3.4. Matériels et méthodes :

3.4.1. Matériels :

A. Verrerie :

- Erlen Meyer 250ml
- Becher 100ml
- Pipette graduée 5ml
- Pipette graduée 2ml
- Barreau magnétique
- Potence
- Pince
- Compte goutte
- Cuve de migration
- Papier filtre
- Fiole conique à vide
- Pompe à vide
- Entonnoir Buchner
- Tamis moléculaire
- Plaques CCM

B. Réactifs :

Les réactifs utilisés dans la synthèse sont cités sur le tableau 09

Tableau 09 : liste des réactifs utilisés dans l'étape de synthèse

Réactif	Formule brute	Poids moléculaire	Référence
Pyridine anhydre	C_5H_5N	79.1g/mol	Riedel-de Haen
Chlorure de propanoyle	C_3H_5ClO	92,524 g/mol	BIOCHEM
Acide acétique	$C_2H_4O_2$	60.05 g/mol	VWR PROLABO
Acétate de sodium	$C_2H_3O_2Na$	82.03 g/mol	VWR PROLABO
Dichlorométhane	CH_2Cl_2	84.93g/mol	VWR CHEMICALS

C. Appareillage

- Etuve
- Balance analytique : Sartorius TE64
- Plaque chauffante agitatrice
- Vaporisateur rotatif : BUCHI R-205

3.4.2. Méthodes :

A. Réaction d'amidification :

Principe :

Le couplage direct entre un acide carboxylique et une amine n'est pas un choix adapté en chimie de synthèse, en raison de l'échange concomitant de protons entre l'acide et la base (figure 33).

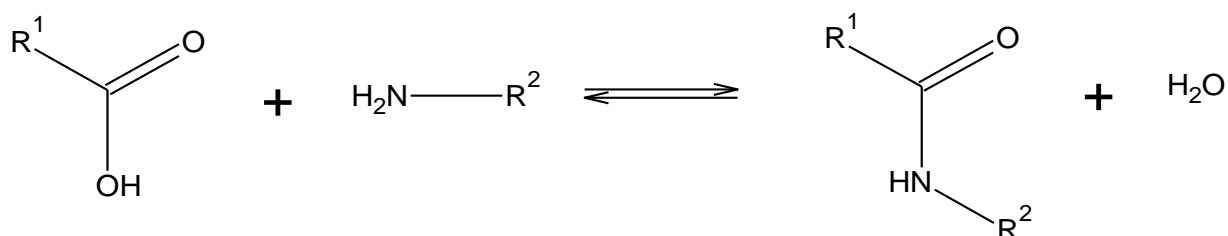


Figure 33 : réaction d'amidification entre acide et amide

La stratégie la plus courante est la conversion de l'acide en une forme activée (c'est-à-dire plus électrophile), comme le chlorure ou l'anhydride d'acyle. Ces espèces réagissent facilement avec les amines primaires et secondaires pour générer l'amide correspondant (figure 34) (92).

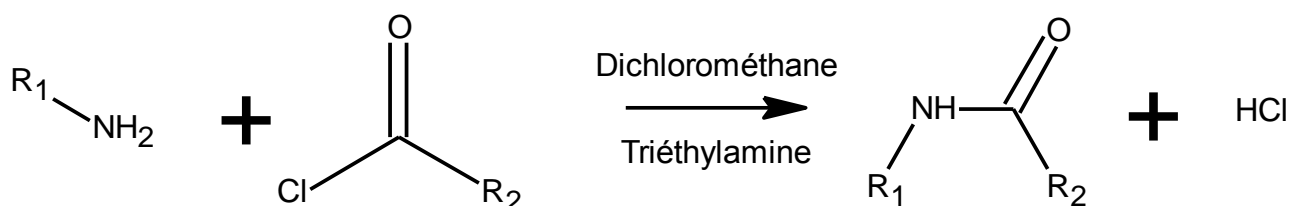


Figure 34 : principe général de la réaction de Schotten-Baumann

L'acylation de l'amine par le chlorure d'acyle est appelée "réaction de Schotten-Baumann", du nom de ses inventeurs.

La réaction se produit généralement rapidement à température ambiante dans des solvants aprotiques en présence d'une base adaptée, par exemple une amine tertiaire ou de la pyridine.

La base en solution aqueuse est souvent ajoutée au goutte-à-goutte, afin de créer à terme un système biphasique (93).

Dans notre cas, la réaction de Schotten-Baumann n'est pas réalisable à cause de l'insolubilité du composé 2 dans le triéthylamine, d'où la nécessité de l'utilisation d'une méthode modifiée en milieu acide en utilisant la pyridine pour piéger les protons présents dans le milieu, selon le mécanisme réactionnel suivant (figure 35) :

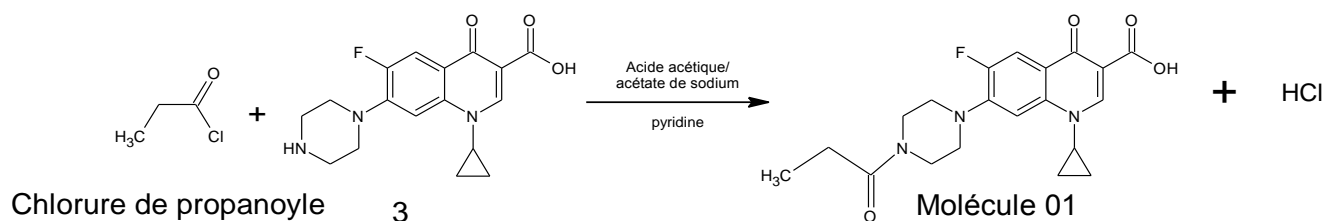


Figure 35 : bilan générale de la réaction de synthèse de la molécule en étude

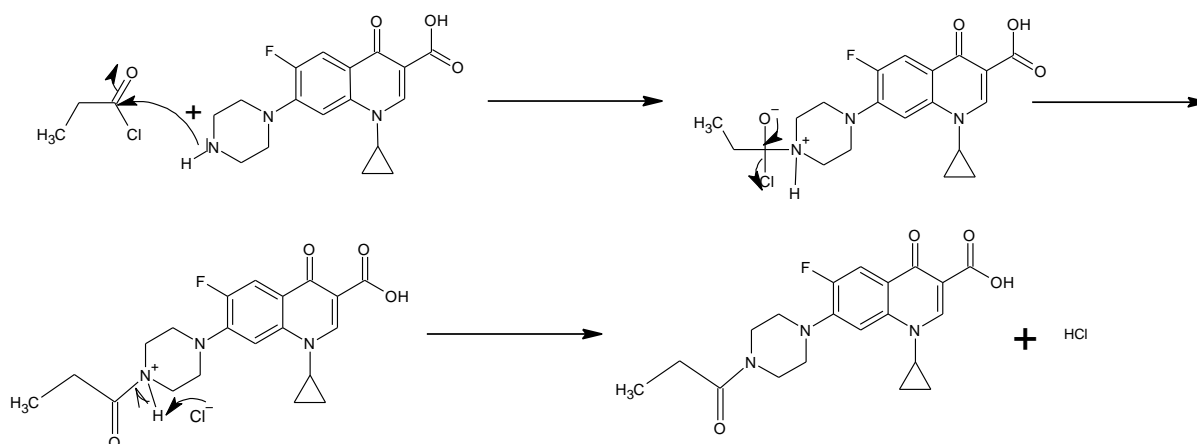


Figure 36 : mécanisme de la réaction de synthèse de la molécule en étude

B. Mode opératoire :

B.1. Synthèse :

Dans un Erlen Meyer de 250 ml fermé hermétiquement nous injectons 1.5ml d'acide acétique (1) dans lesquels sont dissouts 0.5g d'acétate de sodium anhydre (2), 0.1g du composé de départ (3) dissouts dans 80ml de pyridine (4) et nous agitons jusqu'à homogénéisation. Le chlorure de propanoyle (5) est injecté goutte à goutte à l'aide d'une seringue avec agitation par barreau magnétique sur plaque chauffante agitatrice à 60°C.

Nous laissons la réaction se dérouler pendant 60 min.

Le mélange doit rester sous agitation jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune verdâtre.

B.2. Extraction par vaporisateur rotatif :

La substance d'intérêt (molécule 01) a été extraite à partir de la pyridine en utilisant un équipement de vaporisateur rotatif (ROTAVAPOR R-205 BUCHI). Un volume de 500 mL de pyridine contenant la substance d'intérêt a été introduit dans le ballon du vaporisateur rotatif. Le ballon était ensuite placé sur le bain-marie et chauffé à une température de 80°C. La pression a été réduite à 150 mbar en ajustant le vide. La rotation du ballon a été initiée à une vitesse de 100 tr/min. L'extraction a été poursuivie jusqu'à ce que le solvant soit évaporé complètement et que le résidu soit sec. Le résidu sec obtenu à partir de l'extraction par EVR a été suspendu dans de l'eau. Cette suspension a été agitée à l'aide d'un agitateur magnétique à 60°C pendant 30 minutes pour assurer une dissolution complète des impuretés. La suspension a ensuite été filtrée sous vide à travers un papier filtre pour éliminer les impuretés. Le résidu insoluble a été récupéré et séché sous vide pour obtenir un produit purifié de la molécule 01.

B.3. Purification :

Après la filtration de l'étape d'extraction, nous avons effectué un deuxième lavage avec de l'eau sur papier filtre pour éliminer les impuretés résiduelles. Les cristaux ont ensuite été soigneusement essorés pour récupérer un produit purifié et de qualité supérieure.

Ensuite, le produit purifié a été lavé avec deux solvants organiques : de l'éthanol chauffé à 40°C et du dichlorométhane, pour éliminer les impuretés restantes. Le produit a été filtré plusieurs fois à travers un papier filtre et les lavages ont été effectués avec de l'éthanol et du dichlorométhane. Le produit a ensuite été séché dans une étuve à 37°C pendant 40 minutes pour éliminer l'alcool et le dichlorométhane.

Le produit sec obtenu a été soumis à une chromatographie sur couche mince (CCM) pour confirmer sa pureté. La disparition totale de la tâche du réactif a été observée. Après le séchage, le produit a été pesé pour calculer le rendement de la réaction. Le rendement a été calculé en divisant la masse de produit obtenu par la masse théorique attendue.

3.5. Résultats et discussion :

Masse réelle du produit $m = 0.0558\text{g}$

3.5.1. Calcul du rendement :

Rendement (%) = (quantité réelle du produit obtenu / quantité théorique maximale du produit) x 100%

Nous avons :

Masse du réactif produit de départ (le dérivé quinolone à amidifier) = 0.1 g

Masse molaire = 331.346 g/mol

En substituant ces valeurs dans la formule, nous obtenons :

Nombre de moles = 0.1 g / 331.346 g/mol

Nombre de moles = 0.000302 moles

0.1g du réactif représente 0.000302 moles

Masse théorique du produit= nombre de moles du réactif x masse molaire du produit

Dans ce cas, nous avons :

Nombre de moles du réactif= 0.000302 moles

Masse molaire du produit= 387.346 g/mol

En substituant ces valeurs dans la formule, nous obtenons :

Masse théorique du produit = 0.000302 moles x 387.346 g/mol

Masse théorique du produit = 0.1183 g

Rendement (%) = (0.0558 / 0.1183) x 100%

Rendement (%) = **47.16%**

Le rendement d'une réaction chimique peut être calculé en utilisant la formule suivante : Rendement (%) = (quantité réelle du produit obtenu / quantité théorique maximale du produit) x 100%. Pour calculer la quantité théorique maximale du produit, il faut connaître la masse du réactif limitant et la masse molaire du produit. Dans notre cas, la masse du réactif limitant est de 0.1 g et la masse molaire est de 331.346 g/mol. En utilisant ces valeurs, nous pouvons calculer le nombre de moles du réactif, qui est de 0.000302 moles. Ensuite, nous pouvons calculer la masse théorique du produit en multipliant le nombre de moles du réactif par la masse molaire du produit, qui est de 387.346 g/mol. La masse théorique du produit est donc de 0.1183

g. Enfin, en utilisant la formule de rendement, nous pouvons calculer le rendement de la réaction, qui est de 47.16%.

3.5.2. Interprétation des résultats :

Le rendement d'une réaction d'amidification avec des chlorures d'acide peut varier considérablement en fonction des conditions réactionnelles et de la qualité des réactifs utilisés. En général, le rendement de la réaction d'amidification avec des chlorures d'acide est souvent inférieur à 100%.

En pratique, le rendement de la réaction d'amidification avec des chlorures d'acide peut varier entre 50% et 95%, en fonction des facteurs tels que la qualité des réactifs, les conditions réactionnelles, la présence de catalyseurs, les étapes de purification, etc.(94)

Le pourcentage de rendement obtenu dans notre expérience est faible (47,16%), ce qui peut s'expliquer soit par la température relativement basse (60°C) que nous avons utilisée pour éviter toute altération du produit, soit par la présence d'impuretés dans les matières premières utilisées.

Lors de l'essai précédent, nous avons réalisé la synthèse dans un milieu basique, mais le rendement de la réaction n'a pas dépassé les 10%. Ce faible rendement nous a poussés à chercher des solutions pour améliorer la synthèse. Nous avons alors décidé d'acidifier le milieu pour accélérer la réaction et ainsi obtenir un meilleur rendement. Cette modification a permis d'augmenter significativement le rendement, qui est passé de 7% (en milieu basique) à 47.16% (en milieu acide).

Cependant, malgré l'optimisation de la synthèse, il peut y avoir des pertes de produit lors de l'extraction par EVR. De plus, les problèmes potentiels de purification peuvent être sources de pertes de composés, notamment lors des lavages avec le dichlorométhane qui pourrait dissoudre le produit.

3.6. Conclusion :

En conclusion, ce chapitre a consisté en la synthèse et la purification d'un produit par une méthode d'extraction par vaporisateur rotatif (EVR) suivie d'une série d'étapes de purification. Le produit obtenu a ensuite été caractérisé par chromatographie sur couche mince et son rendement a été calculé. Bien que le rendement final de la réaction d'amidification ait été inférieur à 50%, nous avons réussi à améliorer considérablement le rendement par rapport à une tentative précédente en milieu basique dans laquelle le rendement n'a pas dépassé les 10%.

Nous avons également identifié certains problèmes potentiels de purification, tels que la perte de composés lors des lavages avec le dichlorométhane.

Chapitre 4 :

Identification

Chapitre 4 : identification

4.1. Introduction :

L'identification de la molécule synthétisée est une étape cruciale dans le processus de développement de nouveaux médicaments. Dans cette partie de l'étude, nous avons utilisé plusieurs techniques analytiques telles que la spectroscopie infrarouge, la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire pour identifier avec précision la structure de la molécule synthétisée. Ces techniques analytiques sont indispensables pour déterminer la pureté et la structure de la molécule synthétisée. L'identification précise de la molécule est nécessaire pour évaluer l'efficacité et la sécurité de la nouvelle molécule candidate dans les tests expérimentaux et pour éventuellement passer à la prochaine étape de développement de médicaments.

4.2. Objectif :

L'objectif de cette partie de notre étude est d'identifier le produit synthétisé obtenu après la réaction de synthèse et la purification. Pour cela, nous allons utiliser des techniques d'analyse physico-chimique telles que la spectroscopie de masse, la spectroscopie infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'identification précise du produit synthétisé est essentielle pour s'assurer que la molécule obtenue correspond bien à la structure théorique conçue pour inhiber l'ADN gyrase. Cette partie permettra également de confirmer la pureté et la stabilité du produit synthétisé, ce qui est crucial pour les tests ultérieurs d'activité antibiotique contre différentes souches de bactéries.

4.3. Choix des techniques :

- L'infrarouge est une technique non-destructive qui permet d'identifier les groupes fonctionnels présents dans la molécule.
- La chromatographie sur couche mince est rapide et peu coûteuse, et permet de suivre l'évolution de la réaction.
- La spectrométrie de masse double est très sensible et peut détecter des fragments de molécules à faible concentration.
- La RMN permet une caractérisation précise de la structure tridimensionnelle de la molécule.

4.4. Matériels et méthodes :

4.4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Nous avons utilisé des plaques en aluminium recouvertes de gel de silice Merck 60 F254 pour réaliser les chromatographies sur couche mince. Selon la pharmacopée, le système d'élution approprié est le méthanol/dichlorométhane/acétonitrile/ammoniac (40/40/10/20%). La révélation des plaques CCM a été effectuée sous une lampe UV. La CCM a été utilisée pour deux objectifs différents : d'une part, pour suivre la progression des réactions, et d'autre part, pour vérifier la pureté de notre produit en déterminant le rapport frontal (Rf). Le rapport frontal est calculé en divisant la distance parcourue par le soluté par la distance parcourue par le front du solvant.

4.4.2. Spectroscopie infrarouge (IR) :

La spectroscopie infrarouge est une méthode puissante pour suivre l'avancement des réactions chimiques et pour enquêter sur la structure des composés. Cette technique permet de déterminer les types de liaisons chimiques présents dans un échantillon et de caractériser les groupements fonctionnels, fournissant ainsi des informations sur la conformation et les interactions potentielles. Les spectres infrarouges sont enregistrés en utilisant un spectrophotomètre, qui permet l'observation des radiations infrarouges dans la plage de 400-4000 cm^{-1} . Lorsque les molécules absorbent ces radiations, elles modifient leur énergie de vibration, ce qui est spécifique à chaque type de groupement chimique et permet d'obtenir un spectre d'absorption unique pour chaque molécule. Dans le cadre de notre étude, les spectres infrarouges des composés synthétisés ont été enregistrés à l'aide du spectrophotomètre FT-IR8400 S SHIMADZU, dans la plage de 4000-500 cm^{-1} , à température ambiante.

4.4.3. Chromatographie liquide à haute performance double masse (HPLC MS-MS) :

- Marque de l'appareil : SHIMAZU

A- Conditions d'analyse HPLC :

Le type de colonne HPLC : C18

Le solvant utilisé pour la phase mobile de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est un mélange d'acétonitrile, d'eau et de méthanol, dont la proportion était de 80 %, 10 % et 10 % respectivement.

- **Les raisons du choix des solvants :**

L'acétonitrile est un solvant communément utilisé en chromatographie car il est miscible avec l'eau, est peu visqueux et offre une bonne résolution.

L'eau est un solvant polaire qui peut dissoudre les composés ioniques et polaires notamment les amides, cela est indiqué pour notre étude. Le méthanol est un solvant polaire et protique qui peut dissoudre les composés ioniques, les composés organiques et les composés polaires.

- **Les conditions de détection :**

Nous avons utilisé un détecteur double MS pour notre HPLC. Ce détecteur est capable de mesurer la masse moléculaire de la substance en cours d'analyse.

B- Spectrométrie de masse (MS) :

Les conditions d'analyse MS :

- Le type de spectromètre de masse : SHIMADZU LCMS-8040
- Le mode d'ionisation : ionisation positive et négative
- Les conditions de fragmentation MS/MS : Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI MS)
- Gaz utilisé : l'argon.

4.4.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Les conditions d'analyse RMN :

- **Spectre ^1H RMN:**

Le type de spectromètre RMN : BRUKER AC 300P (300MHz) à transformée de Fourier

Le solvant utilisé : DMSO

Le nombre de scans et le temps d'acquisition : 16 Scan

- **Spectre ^{13}C RMN :**

Le type de spectromètre RMN : BRUKER AC 300P à transformée de Fourier

Le solvant utilisé : DMSO

Le nombre de scans et le temps d'acquisition : 1024 Scan à 75MHz

4.5. Résultats et discussion :

4.5.1. CCM :

En utilisant la technique de la chromatographie en couche mince (CCM) pour suivre l'évolution d'une réaction chimique, nous avons obtenu des rapports frontaux de 0,21 pour le réactif de départ et de 0,27 pour le produit final lorsque nous avons utilisé le chlorure de propanoyle comme agent d'acylation. En revanche, lorsque nous avons utilisé l'anhydride propanoïque comme agent d'acylation, nous avons obtenu un rapport frontal de 0,21 pour le produit final (figure 37). Ces résultats indiquent que le choix de l'agent d'acylation peut avoir un impact significatif sur le déroulement de la réaction. En effet, l'utilisation du chlorure comme agent d'acylation a conduit à une augmentation de 29% dans le rapport frontal du produit final par rapport au réactif de départ, tandis que l'utilisation de l'anhydride a donné un rapport frontal inchangé. Ces observations signifient que la réaction n'a pas marché dans le cas de l'anhydride et soulignent l'importance de considérer attentivement le choix de l'agent d'acylation lors de la planification d'une réaction chimique. En outre, ces résultats peuvent aider à optimiser les conditions de réaction pour maximiser le rendement et la sélectivité du produit final.

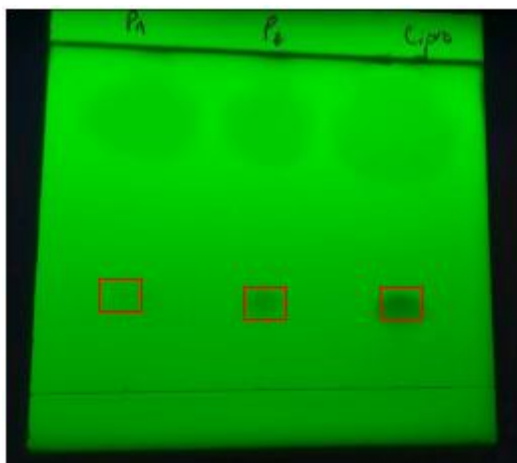


Figure 37 : résultat de la chromatographie sur couche mince

4.5.2. Spectroscopie Infrarouge :

En mesurant les fréquences de vibration des liaisons moléculaires, l'analyse infrarouge permet de déduire la structure et la composition de la molécule synthétisée. Dans cette partie d'analyse infrarouge, nous allons identifier les pics d'absorption infrarouge observés dans le spectre de la molécule synthétisée (figure 38) et déterminer la nature de chaque vibration moléculaire responsable de ces pics. Cette analyse nous permettra de comprendre la structure de la molécule et de confirmer la présence des groupes fonctionnels attendus.

Identification des pics et détermination de la nature de chaque vibration moléculaire responsable de ces pics :

Les pics en 1025.20cm^{-1} , 1036.77cm^{-1} et 1186.26cm^{-1} peuvent correspondre à la fonction amine tertiaire qui a une fréquence de vibration qui se situe dans la plage : $1000-1200\text{ cm}^{-1}$

1685.84cm^{-1} est la fréquence de vibration de la liaison C=O de l'amide tertiaire, cette dernière se situe dans la plage de $1650-1700\text{ cm}^{-1}$

Le pic en 1273.03cm^{-1} peut correspondre à la liaison C-F qui se situe dans la plage de $1250-1350\text{ cm}^{-1}$

Les pics entre $2800-3000\text{cm}^{-1}$ correspondent aux liaisons C-H dans le cycle cyclopropyle, du cycle pipérazinique et du radical éthyle de l'amide, ils sont plus nombreux dans la molécule synthétisée que dans le réactif du départ suite à la présence d'un groupement propanoyle supplémentaire.

Les pics qui se situent dans la plage de $1200-1400\text{ cm}^{-1}$ correspondent à la fréquence de vibration de la liaison C-C dans le cycle cyclopropyle qui est généralement plus élevée que celle de la plupart des liaisons carbone-carbone dans les composés acycliques.

Les pics 1627.01cm^{-1} et 1651.12cm^{-1} peuvent correspondre aux liaisons C=C, la fréquence de vibration de la liaison C=C double : environ $1680-1620\text{ cm}^{-1}$

Les pics dans la plage de $2500-3300\text{ cm}^{-1}$ peuvent correspondre à la bande d'absorption de la liaison O-H de la fonction acide carboxylique de la molécule.

Le pic en 1716.70cm^{-1} peut correspondre à la liaison C=O qui vibre dans la plage de $1700-1725\text{ cm}^{-1}$.

Le pic de vibration en 1685.84cm^{-1} peut correspondre à la liaison C=O de la cétone aromatique qui se situe généralement dans la plage de $1650-1700\text{ cm}^{-1}$ (95).

L'analyse infrarouge nous a permis d'identifier les pics d'absorption infrarouge observés dans le spectre de la molécule synthétisée et de déterminer la nature de chaque vibration moléculaire responsable de ces pics. Grâce à cette analyse, nous avons pu confirmer la présence des groupes fonctionnels attendus, tels que la fonction amine tertiaire, l'amide tertiaire, la liaison C-F et la liaison C=O de la cétone aromatique, ainsi que les liaisons C-C et C-H dans le cycle cyclopropyle et du cycle pipérazinique. Ces résultats sont essentiels pour comprendre la structure de la molécule synthétisée et pour confirmer son identité en tant que composé

organique contenant des groupes fonctionnels spécifiques. L'analyse infrarouge est une technique importante en chimie organique pour caractériser les composés et permettre leur identification précise.

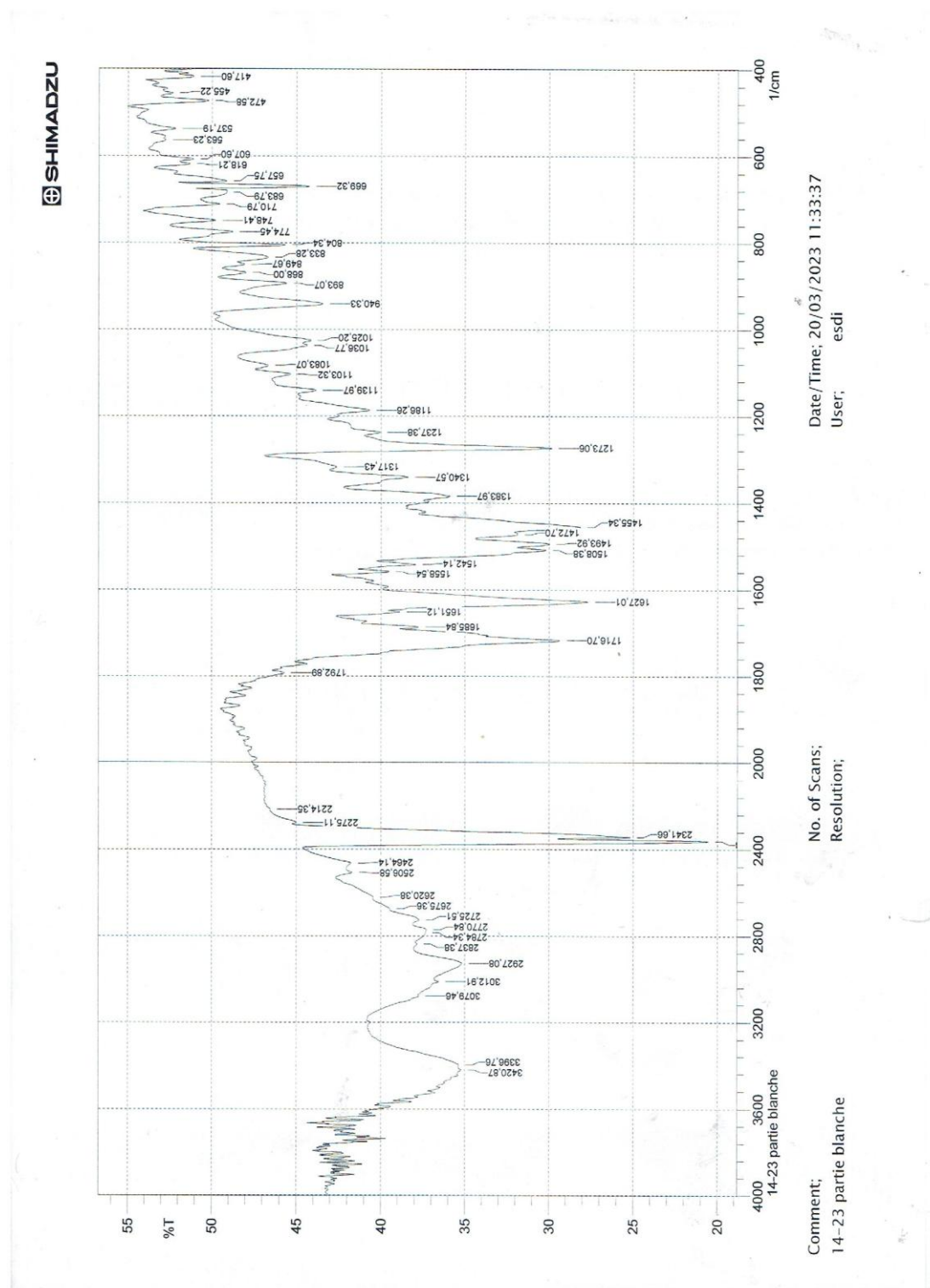


Figure 38 : spectre infrarouge de la molécule synthétisée

4.5.3. HPLC MS-MS :

A. HPLC :

Avant de faire passer notre échantillon par la HPLC MS-MS nous avons fait un essai avec HPLC à détecteur UV, le temps de rétention était de 3.908min.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée pour séparer et de déterminer le temps de rétention de la molécule. La colonne C18 a été utilisée avec une phase mobile composée d'acétonitrile, d'eau et de méthanol (80/10/10, v/v/v). Les analyses ont été effectuées à une longueur d'onde de 330 nm et à une température ambiante. Nous avons confirmé la pureté de notre échantillon par la présence d'un seul pic majoritaire. Le temps de rétention du composé ont été mesuré avec une valeur de 3.908min. Ces résultats démontrent l'efficacité de la méthode HPLC avec la colonne C18 et la phase mobile acétonitrile/eau/méthanol (80/10/10, v/v/v) pour l'analyse de notre échantillon. Le chromatogramme est représenté sur la (figure 39).

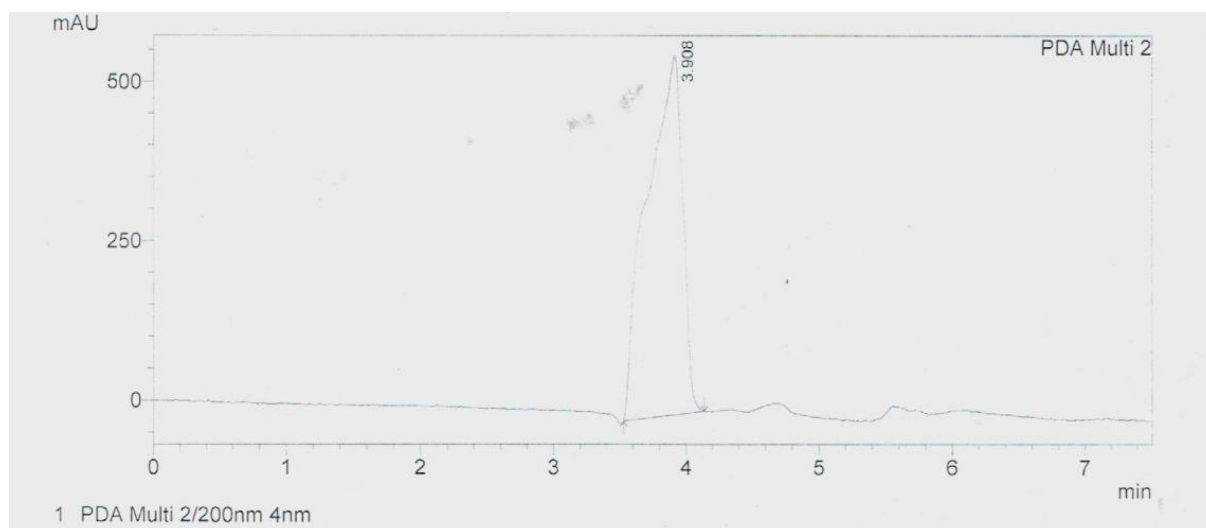


Figure 39 : chromatogramme de la molécule synthétisée

B. Spectrométrie de masse :

Le spectre simple MS :

Le spectre simple MS de la molécule avec ionisation positive nous a donné plusieurs pics, notamment le pic à m/z 388 qui représente le poids moléculaire de la molécule qui est égale à 387 g/mol (figure 40).

D'autres pic sont à apparus, et cela est probablement dû à une contamination du détecteur par des produits à haut poids moléculaire, nous avons fait 3 lavages mais nous n'avons pas pu les éliminer.

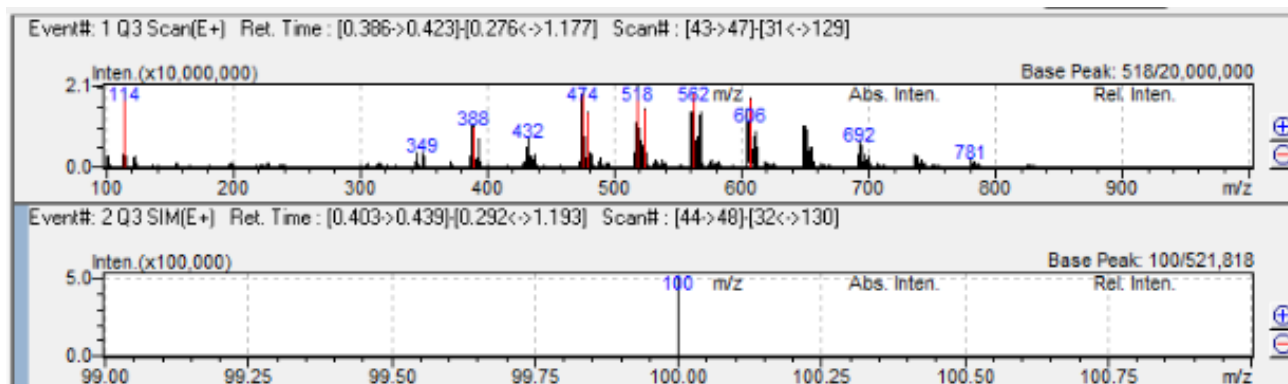


Figure 40 : spectre de masse simple MS de la molécule synthétisée avec ionisation positive

Les résultats de la spectrométrie double MS sont les suivants (figure 41 et 42) :

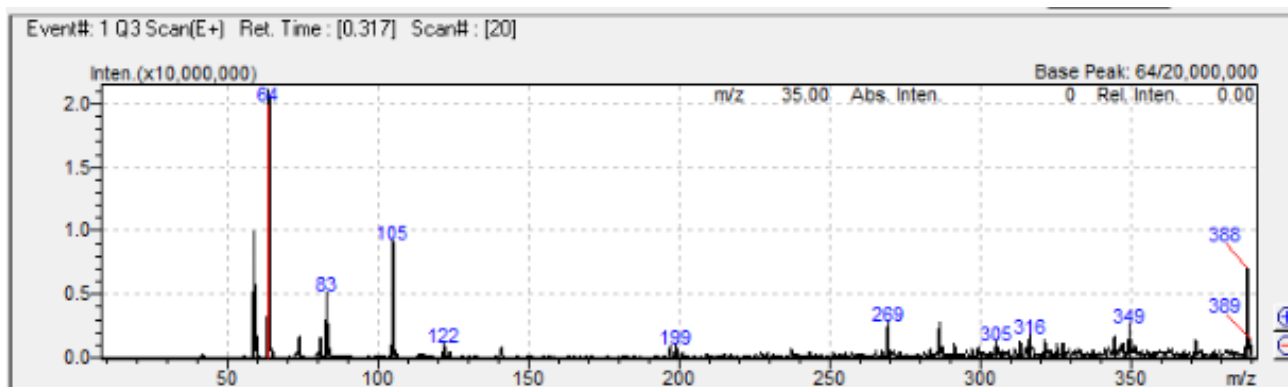


Figure 41 : spectre de masse double MS de la molécule synthétisée avec ionisation positive

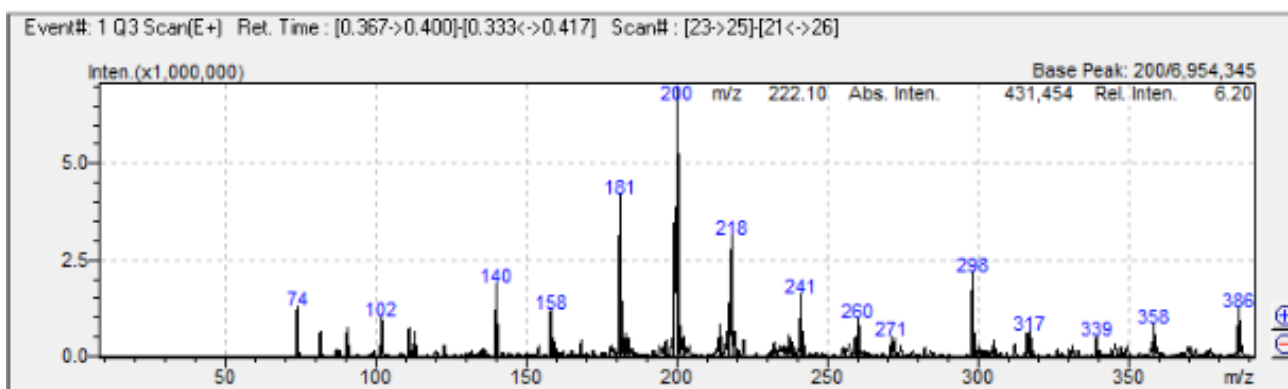


Figure 42 : spectre de masse double MS de la molécule synthétisée avec ionisation négative

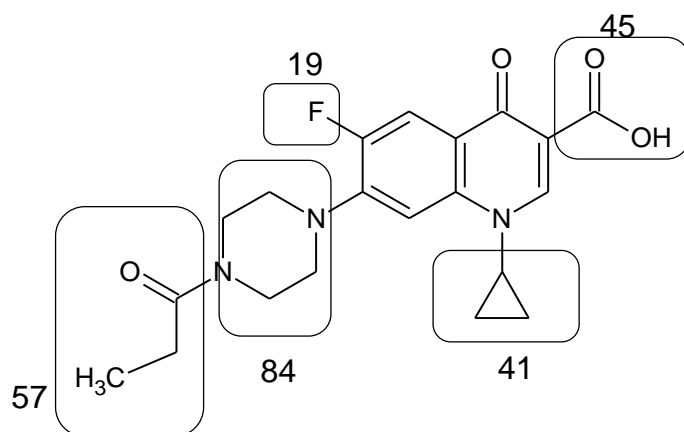


Figure 43 : les poids moléculaires des différents fragments de la molécule

L'analyse de la structure et de la composition des molécules est un aspect important de la chimie organique. Les techniques de spectrométrie de masse sont largement utilisées dans cette discipline pour fournir des informations sur la structure et les propriétés des molécules. Dans cette étude, nous avons synthétisé une molécule et avons procédé à son analyse spectrométrique de masse. Les résultats ont permis de déterminer la présence de groupes fonctionnels spécifiques dans la molécule parente, ainsi que leur fragmentation lors de l'analyse. Nous allons examiner de plus près les résultats obtenus et leur signification dans la caractérisation de la structure de la molécule synthétisée (tableau 10).

Tableau 10 : données de spectroscopie de masse de la molécule 01

Composé/fragment	ion	Masse théorique	Masse mesurée	Formule brute
Molécule 01	$[C_{20}H_{22} N_3O_4F+H^+]$	388,346	388	$C_{20}H_{22} N_3O_4F$
Cyclopropyle	$[C_3H_4+H^+]$	41.083	41	C_3H_4
propanoyle	$[C_3H_5O+H^+]$	58.088	57	C_3H_5O
Pipérazine	$[C_4H_8N_2+H^+]$	84.136	83	$C_4H_8N_2$
fluore	$[F+H^+]$	18,998	19	F
Fonction acide	$[CO_2H+H^+]$	45.03	44	CO_2H

L'analyse du spectre de masse obtenu pour la molécule synthétisée a révélé une différence de masse de 19 unités entre les ions à m/z 83 et 64 (figure 41). Cette différence de masse correspond à la fragmentation d'un groupement fluoro (F) dans la molécule parente. Cette observation est cohérente avec la structure de la molécule, qui contient un groupe fluoro en position 6

L'analyse du spectre de masse obtenu pour la molécule synthétisée a mis en évidence une différence de masse de 57 unités entre les ions à m/z 298 et 241 (figure 42) ce fragment est aussi présent sur le spectre (figure 41). Cette différence de masse correspond à la fragmentation d'un groupe propanoyle (C_3H_5O) dans la molécule parente. Cette observation est cohérente avec la structure de la molécule, qui contient un groupe propanoyle. La fragmentation de ce groupe propanoyle pourrait être due à une collision énergétique avec le gaz inerte utilisé lors de l'analyse. La fragmentation de ce groupe propanoyle est un processus courant dans la fragmentation de molécules contenant ce motif, et peut fournir des informations utiles pour identifier des composés similaires dans des échantillons connexes. Ainsi, cette différence de masse de 57 unités est un indice supplémentaire pour la confirmation de la structure de la molécule synthétisée et peut être utilisée pour aider à identifier d'autres composés contenant des groupes propanoyle.

Le spectre de masse obtenu pour la molécule synthétisée a révélé une différence de masse de 41 unités entre les ions à m/z 358 et 317 (figure 42). Cette différence de masse correspond à la fragmentation d'un groupe cyclopropyle (C_3H_4) dans la molécule parente. Cette observation est cohérente avec la structure de la molécule, qui contient un groupe cyclopropyle. La fragmentation de ce groupe cyclopropyle pourrait être due à une collision énergétique avec le gaz inerte utilisé lors de l'analyse. Cette fragmentation de groupe cyclopropyle est un processus courant dans la fragmentation de molécules contenant ce motif, et peut fournir des informations utiles pour identifier des composés similaires dans des échantillons connexes. Ainsi, cette différence de masse est un indice supplémentaire pour la confirmation de la structure de la molécule synthétisée et peut être utilisée pour aider à identifier d'autres composés contenant des groupes cyclopropyle.

L'analyse du spectre de masse obtenu pour la molécule synthétisée a révélé une différence de masse de 83 unités entre les ions à m/z 241 et 158 (figure 42). Cette différence de masse correspond à la fragmentation d'un cycle pipérazinique ($C_4H_8N_2$) dans la molécule parente. Cette observation est cohérente avec la structure de la molécule, qui contient un cycle pipérazinique.

L'analyse du spectre de masse obtenu pour la molécule synthétisée a mis en évidence une différence de masse de 44 unités entre les ions à m/z 349 et 305 (figure 41). Cette différence de masse correspond à la fragmentation d'un groupe carboxyle ($COOH$) dans la molécule parente. Cette observation est cohérente avec la structure de la molécule, qui contient un groupe carboxyle.

L'analyse des spectres de masse obtenus pour la molécule synthétisée a fourni des informations importantes sur sa structure et sa composition. Les différences de masse observées entre les ions ont permis de déterminer la présence de groupements fluoro, propanoyle, cyclopropyle et carboxyle dans la molécule parente. De plus, la fragmentation de ces groupements lors de l'analyse a fourni des indices supplémentaires pour confirmer la structure de la molécule synthétisée. Ces résultats démontrent l'importance de la spectrométrie de masse dans l'analyse de composés et la caractérisation de leur structure.

4.5.4. Résonance magnétique nucléaire :

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de spectroscopie utilisée pour analyser les structures moléculaires en solution. Elle permet de déterminer la nature, la quantité et l'environnement chimique des atomes présents dans une molécule. Dans notre étude, nous allons examiner le spectre RMN ^1H et RMN ^{13}C de notre molécule synthétisée en solution dans DMSO- d_6 , et identifier les groupes fonctionnels et les atomes de carbone présents dans la molécule étudiée. Ces informations nous aideront à comprendre la structure moléculaire de l'échantillon et à identifier des composés similaires dans des échantillons connexes.

A. Spectre RMN ^1H :

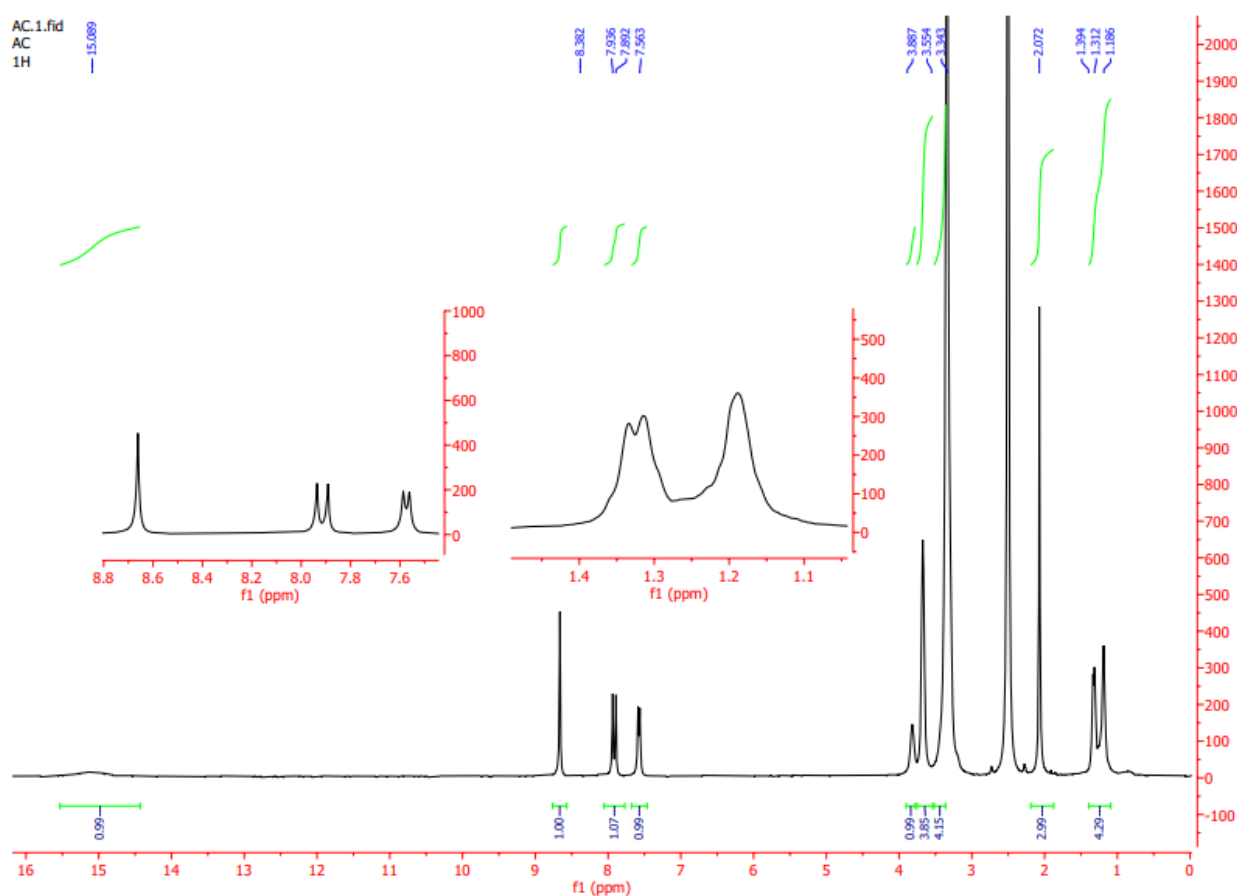


Figure 44 : Spectre RMN ^1H de la molécule synthétisée

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 15.09 (s, 1H, OH), 8.66 (s, 1H, CHaromatique), 7.91 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, CHaromatique), 7.56 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH=), 3.88 (s, 1H, CH), 3.55 (s, 4H, $2\text{CH}_2\text{-N}$), 3.34 (s, 4H, $2\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.07 (s, 3H, CH_3), 1.39-1.18 (m, 4H, 2CH_2 , cyclopropane).

Le spectre RMN ^1H de l'échantillon en solution dans $\text{DMSO-}d_6$ montre des signaux caractéristiques de différents groupes fonctionnels. Le pic singulet à δ 15.09 ppm est attribué à un groupe hydroxyle (OH), tandis que le pic singulet à δ 8.66 ppm correspond à un proton sur un noyau aromatique. Les deux pics doublets à δ 7.91 ppm (avec une constante de couplage $J = 13.2$ Hz) et δ 7.56 ppm (avec une constante de couplage $J = 7.5$ Hz) sont attribués à des protons sur des noyaux aromatiques différents. Le pic singulet à δ 3.88 ppm correspond à un proton sur un carbone tétraédrique (CH) et le pic singulet à δ 2.07 ppm est attribué à un groupe méthyle (CH_3). Les pics singulets à δ 3.55 ppm et δ 3.34 ppm sont attribués à des protons sur des groupes NH liés à deux groupes méthylène ($2\text{CH}_2\text{-N}$) et deux groupes méthylène-amine ($2\text{CH}_2\text{-NH}$), respectivement.

Enfin, le pic multiplet entre δ 1.39 et 1.18 ppm est attribué à deux protons de deux groupes méthylène voisins dans un motif cyclopropane.

Une dégradation thermique peut-être la raison de l'absence d'un pic de H

B. Spectre RMN ^{13}C :

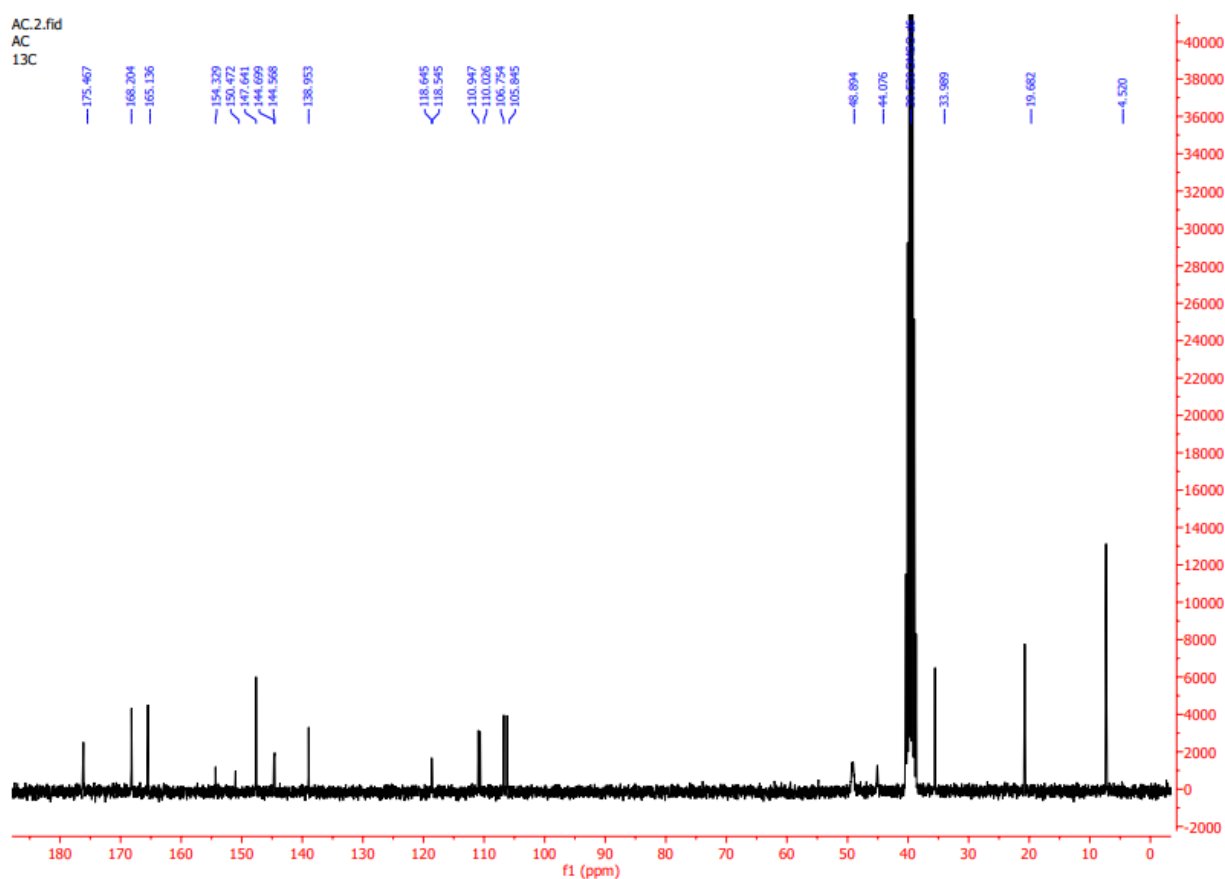


Figure 45 : Spectre RMN ^{13}C de la molécule synthétisée

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 176.14, 168.20, 165.50, 154.33, 150.93, 147.64, 144.70, 144.57, 138.95, 118.54, 110.95, 110.64, 106.75, 106.19, 48.73, 44.60, 32.82, 21.11, 7.97.

Le spectre RMN ^{13}C obtenu pour cet échantillon montre des pics de résonance différents, indiquant la présence d'atomes de carbone différents dans la molécule étudiée. Les déplacements chimiques se situent entre 7,97 ppm et 176,14 ppm, ce qui est cohérent avec la présence d'un certain nombre de groupes fonctionnels différents. Les signaux à 176,14 ppm, 168,20 ppm et 165,50 ppm peuvent être attribués aux atomes de carbone des groupes carbonyle (C=O) de la molécule. Les signaux à 154,33 ppm, 150,93 ppm, 147,64 ppm, 144,70 ppm et 144,57 ppm sont typiques des atomes de carbone d'aromatique, ce qui suggère la présence de plusieurs noyaux aromatiques dans la molécule. Les signaux à 118,54 ppm, 110,95 ppm, 110,64

ppm, 106,75 ppm et 106,19 ppm peuvent correspondre à des atomes de carbone dans des groupes alkyles. Les signaux à 48,73 ppm et 44,60 ppm peuvent correspondre à des atomes de carbone dans des groupes méthyle et méthylène, respectivement, tandis que le signal à 32,82 ppm peut correspondre à un atome de carbone dans un groupe éthylène. Ces résultats fournissent une indication de la structure moléculaire de l'échantillon étudié et peuvent aider à identifier des composés similaires dans des échantillons connexes.

4.6. Conclusion :

L'ensemble des résultats obtenus pour l'identification de la molécule synthétisée confirme sa structure et sa pureté. La CCM a montré un seul spot, ce qui indique l'absence de contaminants dans l'échantillon. La spectroscopie infrarouge a révélé des pics caractéristiques de la présence des groupes fonctionnels attendus. L'analyse par HPLC MS-MS a permis d'obtenir un spectre de masse correspondant à la structure attendue de la molécule, avec une haute pureté et une rétention appropriée. Enfin, la RMN a fourni des signaux clairs et distincts pour tous les atomes de la molécule, ce qui a confirmé la structure et la pureté de l'échantillon. Tous ces résultats combinés démontrent que la molécule synthétisée a été correctement identifiée et qu'elle est pure à un niveau élevé. Ces résultats sont une étape importante pour la caractérisation et la compréhension de cette molécule et évaluer son activité antibiotique.

Chapitre 5 :
Activité
antibiotique

Chapitre 5 : activité antibactérienne de la molécule 01 synthétisée

5.1. Introduction :

L'activité antibactérienne est un aspect crucial dans la recherche de nouveaux antibiotiques. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries est un problème de santé publique majeur qui nécessite une réponse urgente de la part de la communauté scientifique. Ainsi, le développement de nouveaux antibiotiques efficaces contre les bactéries résistantes est un défi majeur pour la chimie thérapeutique. Dans cette partie de la recherche, nous allons évaluer l'activité antibiotique de la nouvelle molécule candidate synthétisée contre différentes souches de bactéries en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI). Nous allons également essayer d'expliquer le mécanisme de résistance des bactéries à cette molécule.

5.2. Objectifs :

L'objectif de cette partie est de tester l'activité antibiotique de la nouvelle molécule candidate synthétisée contre différentes souches de bactéries en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la molécule. Nous allons utiliser la méthode de dilution en milieu liquide pour déterminer la CMI de la molécule contre différentes souches de bactéries. L'objectif final est d'évaluer l'efficacité de la nouvelle molécule en tant qu'antibiotique potentiel contre des souches de bactéries ciblées et de comparer son activité à celle de la ciprofloxacine qui représente un antibiotique de référence. En outre, nous allons essayer d'expliquer le mécanisme de résistance des bactéries à cette molécule en étudiant les mécanismes de résistance bactérienne connus. Cette partie de la recherche permettra de mieux comprendre le potentiel de la nouvelle molécule comme antibiotique potentiel et d'explorer les mécanismes de résistance bactérienne contre elle.

5.3. Matériels et méthodes :

5.3.1 Culture :

A. Préparation de pré-culture :

Chaque souche estensemencée dans un bouillon nutritif (BN). Puis elle est incubée à une température de 37°C pendant 24 h.

B. Préparation de la suspension bactérienne :

En premier lieu, nous avons préparé une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 McFarland (10^8 UFC/mL) à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Cette opacité,

équivalente à une densité optique de 0.08 – 0.1 à la longueur d'onde 625 nm qui peut être diminuée (ou augmentée) en ajoutant plus de culture afin d'ajuster la densité optique (DO) (96).

Il est à signaler d'une part que la suspension ajustée devra contenir 10^8 UFC /mL (Unité formant colonie/mL) et d'autre part que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au-delà de 15 minutes faute de quoi la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne (21).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus forte dilution de notre molécule synthétisée qui inhibe la croissance des souches concernées pendant la période d'essai. Étant donné qu'un test CMI bien conçu et bien réalisé doit permettre d'obtenir des données reproductibles pour une souche donnée, nous avons porté une attention rigoureuse à la normalisation(96).

5.3.2. Matériels :

A. Instrumentations :

Pour la détermination de la CMI, nous avons utilisé une instrumentation microbiologique pour assurer la stérilité des échantillons et des résultats fiables. Tout d'abord, des tubes de 10cc stériles ont été utilisés pour éviter toute contamination bactérienne ou fongique pouvant affecter les résultats. Les pipettes Pasteur ont été utilisées pour ajouter une quantité précise de suspension bactérienne à chaque tube stérile contenant la molécule testée diluée. Les anses de platine stériles ont été utilisées pour manipuler les bactéries sans risque de contamination croisée.

Nous avons également utilisé des boîtes de Petri pour préparer des plaques de culture bactérienne. Pour stériliser les instruments et les échantillons, nous avons utilisé un bec Bunsen, un type de brûleur à gaz qui produit une flamme chaude, sûre et non lumineuse. Les pinces bactériologiques stériles ont été utilisées pour manipuler les échantillons ou les cultures de micro-organismes dans des conditions stériles afin d'éviter toute contamination croisée.

Nous avons également utilisé une étuve pour le séchage, la stérilisation et la croissance des cultures microbiennes, ainsi qu'une hotte microbiologique pour protéger les travailleurs de laboratoire et les échantillons de tout risque de contamination.

Enfin, nous avons utilisé des pipettes de différentes tailles, y compris une pipette de 5mL, une pipette de 1mL et une micropipette 10-100 μ L pour ajouter des volumes précis de solutions et des microplaques 96 puits pour effectuer des tests à haut débit en parallèle. Cette

instrumentation a été soigneusement sélectionnée pour garantir la précision et la fiabilité des résultats obtenus dans notre étude de détermination de la CMI.

B. Réactifs :

Résazurine :

La résazurine est un composé organique qui est de couleur bleue en solution oxydée, mais qui est réduite en solution rose vif en présence de cellules vivantes. Les bactéries métabolisent le glucose dans le milieu de culture, produisant des électrons qui réduisent la résazurine et entraînent le changement de couleur (97).

DMSO diméthylsulfoxyde :

En microbiologie, le DMSO est souvent utilisé pour dissoudre des antibiotiques et d'autres composés antimicrobiens pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, y compris la mesure de la CMI (98).

Eau physiologique stérile :

L'eau physiologique stérile est une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl) à une concentration proche de celle des liquides physiologiques humains. Elle est stérilisée pour éliminer tous les micro-organismes présents dans la solution

C. Milieu de culture :

C.1. Mueller Hinton :

Le Mueller Hinton est un milieu de culture couramment utilisé en microbiologie pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, y compris la mesure de la CMI(99).

C.2. Bouillon nutritif (BN) :

Le bouillon nutritif est un milieu de culture liquide utilisé en microbiologie pour la croissance de différents types de micro-organismes. Il est composé de nutriments essentiels tels que des peptides, des acides aminés, des vitamines, des sels minéraux et des glucides (100).

Le bouillon nutritif est un milieu de culture non sélectif, ce qui signifie qu'il permet la croissance d'une grande variété de micro-organismes, y compris les bactéries, les champignons et les levures.

D. Souches bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*

5.3.3. Méthodes :

Les tests de l'activité *in vitro* :

Les tests *in vitro* se font sur des bactéries de référence et même sur d'autres souches cliniques de bactéries en deuxième lieu selon les techniques de référence de calcul des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Nous avons testé notre molécule sur les souches mentionnées dans le (tableau 11) :

Tableau 11 : les souches concernées par les essais de CMI

Bactérie	Référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	Souche clinique
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souche clinique
<i>Proteus mirabilis</i>	Souche clinique
<i>Staphylococcus aureus</i>	Souche clinique

A. Choix du type de test :

Nous avons choisi la procédure d'essai en se basant sur des facteurs tels que le nombre de souches à tester, leur réponse à la croissance en milieu liquide et solide, le temps de génération des espèces et la demi-vie de la molécule. Dans notre cas la méthode de dilutions sur microplaque est la plus pratique et plus économique. Les tests CMI et les contrôles sont effectués en triple et incubés dans les conditions habituellement requises pour la croissance de l'espèce testée (101).

Méthode de dilutions sur microplaque :

La méthode de dilution sur micro-plaque est une méthode couramment utilisée pour mesurer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'un antibiotique contre une souche bactérienne donnée. Cette méthode implique la création d'une série de dilutions de l'antibiotique dans des puits d'une micro-plaque (une plaque de 96 puits dans notre cas). Chaque puits contient une

concentration différente de l'antibiotique, et des bactéries sont ensuite ajoutées à chaque puits (101).

Pour chaque puits 40µl de l'antibiotique, 40µl de la suspension bactérienne et 30µl du révélateur (résazurine) après la période d'incubation.

L'inoculum bactérien de chaque souche à tester est distribué dans une série de cupules sur microplaque à 96 puits, pour chaque ligne de la plaque, nous avons préparé une série de dilutions de l'antibiotique (qu'il s'agisse de la nouvelle molécule testée ou de la molécule de référence), l'antibiotique est dilué d'une façon binaire ; chaque cupule contient le ½ de la concentration de la précédente en commençant par une concentration de 5 mg/L, en partant de 5mg/L et en procédant à 9 dilutions successives, à savoir : 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019 et 0.009mg/L. Nous avons également ajouté un contrôle positif, composé de 40 µL de suspension bactérienne et 40 µL d'eau physiologique, ainsi qu'un contrôle négatif contenant 40 µL de l'antibiotique à 5mg/l et 40 µL d'eau physiologique(46).

B. Incubation :

- L'incubation des différentes souches de notre étude a été faite dans l'étuve pendant 18 heures à 37°C. [28]

C. Les contrôles :

C.1. Contrôle positif :

Lors de la mesure de la CMI, il est important de réaliser des contrôles pour vérifier la validité des résultats obtenus. Ces contrôles incluent un contrôle positif et un contrôle négatif. Le contrôle positif consiste à ne mettre que la bactérie en étude dans le milieu de culture, sans aucun antibiotique, afin de s'assurer que la bactérie se développe normalement. Le contrôle négatif consiste à ne mettre que le milieu de culture et l'antibiotique en étude, sans bactérie, afin de s'assurer qu'aucune croissance bactérienne n'est observée en l'absence de bactéries sensibles à l'antibiotique. Ces contrôles permettent de valider les résultats de la CMI et d'éviter les erreurs de mesure.

5.4. Résultats et discussion :

Les cultures sont incubées jusqu'à ce que les bouillons de contrôle changent de couleur. Les lectures présomptives (CMI initiales) sont alors effectuées ; les CMI finales sont effectuées à un moment précis, généralement 24 heures plus tard. Lorsque les résultats des tests en double diffèrent d'une dilution double, la lecture la plus conservatrice est utilisée. Lorsque les

résultats différent de plus d'une dilution, il faut examiner la méthodologie, en particulier les outils utilisés pour préparer les dilutions, et répéter le test. Les CMI sont interprétées en fonction des concentrations de l'agent testé. (101)

Après la période d'incubation, un volume de 30µl de Résazurine (indicateur coloré bleu) est ajouté dans chaque puits et la microplaque est laissée agir pendant 4h. La solution d'indicateur change du bleu au rose en présence d'activité bactérienne, tandis qu'elle reste bleue lorsque la croissance microbienne est inhibée.

Après incubation, les résultats sont résumés dans le (tableau 12) :

Tableau 12 : Résultats de la mesure de la CMI de la nouvelle molécule

Bactéries	Coloration de Gram	CMI µg/mL	
		Ciprofloxacine	Molécule 01
<i>Proteus mirabilis</i>	Gram négatif	0,312	0,156
<i>Escherichia coli sc</i>	Gram négatif	1,25	1,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	0.156	0.312
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	1,25	1,25
<i>Pseudomonas aeruginosa atcc</i>	Gram négatif	0.625	1.25
<i>Pseudomonas aeruginosa sc</i>	Gram négatif	1.25	2.5

Dans notre étude, l'activité antibactérienne contre les différentes souches a été évaluée quantitativement en fonction de la concentration minimale inhibitrice (CMI), par rapport à la ciprofloxacine comme molécule antibiotique de référence.

Les résultats ont révélé que les bactéries Gram négatif, étaient plus sensibles à ces molécules que les Gram positif avec des valeurs des CMI allant de 0,156µg/ml à 2.5 µg/ml (dilution ½ v/v).

On note que la molécule synthétisée a exercé le même effet sur les deux souches de référence *E. coli* et *S. aureus* avec des valeurs de CMI égales à 1,25µg/ml (Dilution ¼).

Cependant, *Proteus mirabilis* a montré une sensibilité plus élevée vis-à-vis de la molécule 01 avec une CMI de 0,156µg/ml, par rapport à la ciprofloxacine (0,312µg/ml).

La nouvelle molécule issue de la modélisation garde toujours une activité similaire que la ciprofloxacine dans le cas d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*, cela est peut-être dû

à une hydrolyse de l'amide ce qui va conduire à la ciprofloxacine selon le mécanisme suivant (figure 46) :

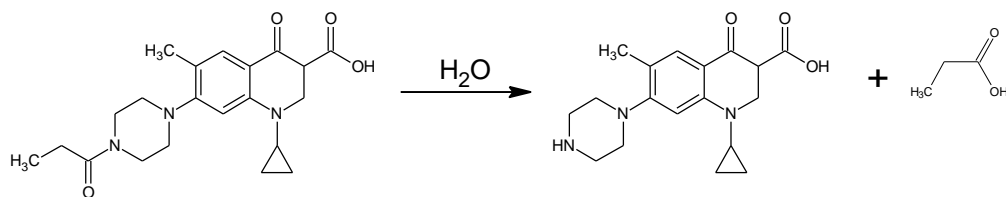


Figure 46 : réaction d'hydrolyse de la molécule 01

Dans le cas de *Proteus mirabilis* la production de l'uréase peut favoriser le maintien de l'intégrité de la molécule en milieu basique (102).

En effet, la production d'uréase par *Proteus mirabilis* peut influencer l'activité de la molécule 01. L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone, augmentant ainsi le pH de l'environnement. Cela peut favoriser la solubilité de la molécule 01 et donc son activité en milieu basique. Cependant, la sensibilité des bactéries aux antibiotiques peut varier en fonction de différents facteurs tels que la pénétration de la molécule dans la cellule bactérienne ou la présence de mutations dans les gènes de la résistance aux antibiotiques.

Dans le cas de *Klebsiella pneumoniae* et du bacille pyocyanique la nouvelle molécule est moins active que la ciprofloxacine, ce qui peut être dû à la facilité de la reconnaissance de la molécule par la pompe d'efflux de la bactérie (103).

5.5. Conclusion :

Les résultats de notre étude ont montré que la molécule synthétisée a une activité antibactérienne prometteuse, avec des valeurs de CMI comparables ou supérieures à celles de l'antibiotique de référence, en particulier contre *Proteus mirabilis*. Cependant, il est important de noter que la sensibilité des différentes souches bactériennes peut varier considérablement et dépend de nombreux facteurs tels que la structure de la bactérie et sa capacité à transporter les molécules, il est également important de noter que les résultats de tests in vitro peuvent différer de l'activité réelle de la molécule dans le corps humain, en raison de facteurs tels que la biodisponibilité et la pharmacocinétique.

En outre, nos résultats soulignent l'importance de l'évaluation expérimentale de l'activité antibactérienne d'une molécule, en complément des études in silico, pour garantir la fiabilité et l'efficacité des traitements antibiotiques. Ces résultats ouvrent également la voie à de futures

études pour optimiser la structure de la molécule et améliorer son activité antibactérienne contre un large spectre de souches bactériennes.

5.6. Perspectives :

La résistance aux antibiotiques est souvent multifactorielle et peut impliquer plusieurs mécanismes de résistance. Par conséquent, il est probablement utile d'examiner plusieurs mécanismes de résistance pour obtenir une compréhension plus complète de la résistance aux antibiotiques dans les bactéries.

En utilisant des programmes de docking moléculaire, il est possible de prédire comment les composés potentiels se lieraient aux protéines cibles associées à la résistance, telles que les enzymes impliquées dans la modification ou la dégradation des antibiotiques, les pompes de détection et d'expulsion des agents antimicrobiens, ou les protéines qui protègent les bactéries en modifiant leur enveloppe cellulaire

Conclusion

Conclusion générale:

En conclusion, notre étude a réussi à concevoir, synthétiser et caractériser une molécule parmi les 10 candidats proposés issus du docking, toutes ces molécules appartiennent à la famille des quinolones et ont une activité antibactérienne prometteuse, ce qui ouvre la voie à de futures études pour développer cet antibiotique potentiel en tant que traitement efficace contre les infections bactériennes.

Les résultats de notre étude montrent que la molécule synthétisée qui contient un radical propanoyle sur une fonction amide a montré une activité prometteuse lors de la modélisation QSAR avec une concentration minimale inhibitrice significativement inférieure à celle de la ciprofloxacine qui est antibiotique de référence, cette activité a été confirmée expérimentalement par des essais *in vitro* en testant son efficacité contre plusieurs souches bactériennes.

Par ailleurs, les études *in silico*, telles que la modélisation moléculaire et le criblage virtuel, peuvent fournir des informations précieuses sur la façon dont une molécule interagit avec une cible biologique, ainsi que sur ses propriétés physico-chimiques. Elles nous ont permis de concevoir une nouvelle molécule et prédire son activité dans une étape très précoce de cette recherche, et ces résultats prédits sont confirmés par des tests *in-vitro* qui ont montré l'efficacité de la molécule contre les différentes souches bactériennes.

En particulier, l'activité antibactérienne de la molécule synthétisée s'est avérée plus forte que celle de l'antibiotique de référence contre *Proteus mirabilis*. La découverte d'une molécule synthétisée ayant une activité antibactérienne plus forte que celle de l'antibiotique de référence contre *Proteus mirabilis* est une avancée significative dans la lutte contre les infections bactériennes. Cette découverte pourrait conduire au développement de nouveaux médicaments pour traiter les infections causées par cette bactérie résistante aux antibiotiques. De plus, cette découverte pourrait aider à résoudre le problème croissant de la résistance aux antibiotiques, qui est devenu une menace mondiale pour la santé publique.

Cependant, malgré les avantages offerts par les méthodes de prédiction, elles ne sont pas suffisantes pour prédire l'activité biologique avec une fiabilité totale. En effet, lors de la validation du modèle QSAR, nos résultats ont montré que quelques prédictions QSAR et de docking moléculaire peuvent parfois être différentes de celles obtenues par les essais expérimentaux.

Cela est particulièrement problématique lorsqu'il s'agit de prédire l'activité biologique des molécules dans des conditions *in vivo*, où les facteurs environnementaux peuvent affecter l'activité de la molécule. De plus, les modèles QSAR et les simulations de docking moléculaire peuvent ne pas prendre en compte les interactions complexes entre les molécules et leur environnement biologique, ce qui peut entraîner des erreurs dans les prévisions. Par conséquent, il est important de valider ces modèles en comparant leurs résultats avec ceux des tests expérimentaux, afin d'évaluer leur fiabilité et leur précision. Les études *in silico* ne prennent pas en compte les interactions complexes et dynamiques entre une molécule et son environnement biologique, telles que la sélectivité de la liaison, la pharmacocinétique et la toxicité. Par conséquent, il est souvent nécessaire de mener des études expérimentales pour valider les prédictions *in silico* et confirmer l'activité biologique réelle de la molécule.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

1. Calhoun C, Wermuth HR, Hall GA. Antibiotics. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
2. l'Office des publications de l'Union européenne C. Que se passera-t-il si les antibiotiques viennent à manquer?. CORDIS | European Commission.
3. González-Candelas F, Comas I, Luis Martínez J, Carlos Galán J, Baquero F. The Evolution of Antibiotic Resistance. In: Genetics and Evolution of Infectious Disease. Elsevier; 2011. p. 305-37.
4. Bradley JS, Cannavino CR, Franzon DE, Duthie S. Bacterial Infection, Antimicrobial Use, and Antibiotic-Resistant Organisms in the Pediatric Intensive Care Unit. In: Pediatric Critical Care. Elsevier; 2011. p. 1315-23.
5. Lamrabat S, Bensalah O, Rifai EM. Bacteriological and antibiotic resistance profile of male urinary tract infections. Clinica Chimica Acta. juin 2019;493:S543.
6. Desnottes JF. Review of meeting: Antibiotic discovery: Exploiting new understanding of mechanism of action. Clinical Microbiology and Infection. juin 1996;1(4):281-5.
7. El-Gamal KM, El-Morsy AM, Saad AM, Eissa IH, Alswah M. Synthesis, docking, QSAR, ADMET and antimicrobial evaluation of new quinoline-3-carbonitrile derivatives as potential DNA-gyrase inhibitors. Journal of Molecular Structure. août 2018;1166:15-33.
8. Tripathi A, Misra K. Molecular Docking: A Structure-Based Drug Designing Approach. 2017;5.
9. Todeschini R, Consonni V, Ballabio D, Grisoni F. Chemometrics for QSAR Modeling. In: Brown S, Tauler R, Walczak B, éditeurs. Comprehensive Chemometrics (Second Edition). Oxford: Elsevier; 2020. p. 599-634.
10. Venkatesan A. Bacterial Infections. In: Cerebrospinal Fluid in Clinical Practice. Elsevier ; 1989. p. 167-75.
11. Johnson MD, Netea M. Host Genomics and Bacterial Infections. In: Genomic and Personalized Medicine. Elsevier; 2009. p. 1347-61.

12. Garland JS, Uhing MR. Strategies to Prevent Bacterial and Fungal Infection in the Neonatal Intensive Care Unit. *Clinics in Perinatology*. mars 2009;36(1):1-13.
13. Nauciel C, Vildé JL. *Bactériologie médicale*. Paris: Masson;
14. Averbuch D. Bacterial Infections. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, éditeurs. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th éd. Cham (CH): Springer; 2019.
15. Matta R, Hallit S, Hallit R, Bawab W, Rogues AM, Salameh P. Epidemiology and microbiological profile comparison between community and hospital acquired infections: A multicenter retrospective study in Lebanon. *Journal of Infection and Public Health*. mai 2018;11(3):405-11.
16. Schechter MC, Satola SW, Stephens DS. Host Defenses to Extracellular Bacteria. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, éditeurs. *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. London: Elsevier; 2019. p. 391-402.e1.
17. Peterson JW. Bacterial Pathogenesis. In: Baron S, éditeur. *Medical Microbiology*. 4th éd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
18. Betts RF, Penn RL, Chapman SW, éditeurs. *A practical approach to infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. 1202 p.
19. Baron S, éditeur. *Medical Microbiology*. 4th éd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
20. Reece ST, Kaufmann SHE. Host Defenses to Intracellular Bacteria. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, éditeurs. *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. London: Elsevier; 2019. p. 375-389.e1.
21. Actor JK. Basic Bacteriology. In: Actor JK, éditeur. *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology (Second Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2012. p. 93-103.
22. Micoud M. *Choix d'un antibiotique*. Elsevier; 1993.
23. Bricaire F. *Choix d'un antibiotique*. *Encycl Méd Chir*. Elsevier. 1998;2.
24. McGEE Z, BARINGER JR. Acute meningitis. In : *Principles and practice of infectious diseases*. Mandell. 1990;

25. Kim JH, Gallis HA. Observations on spiraling empiricism: its causes, allure, and perils, with particular reference to antibiotic therapy. *Am J Med.* août 1989;87(2):201-6.
26. Papich MG. Penicillin G. In: Papich MG, éditeur. *Papich Handbook of Veterinary Drugs (Fifth Edition)*. St. Louis (MO): W.B. Saunders; 2021. p. 709-12.
27. Gaudy C, Buxeraud J. *Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique*. Paris: Elsevier; 2005.
28. Montange D. Aminosides. In: Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Collège National de Pharmacologie Médicale, Verdier MC, éditeurs. *Pharmacologie des Anti-Infectieux*. Paris: Elsevier Masson; 2018. p. 57-63.
29. Verdier MC. Macrolides. In: Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Collège National de Pharmacologie Médicale, Verdier MC, éditeurs. *Pharmacologie des Anti-Infectieux*. Paris: Elsevier Masson; 2018. p. 65-70.
30. Verdier MC. Tétracyclines. In: Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Collège National de Pharmacologie Médicale, Verdier MC, éditeurs. *Pharmacologie des Anti-Infectieux*. Paris: Elsevier Masson; 2018. p. 71-4.
31. Nauciel C, Vildé JL. *Bactériologie médicale*. Paris: Masson;
32. Kaguni JM. DNA Replication: Initiation in Bacteria. In: Lennarz WJ, Lane MD, éditeurs. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Waltham: Academic Press; 2013. p. 121-5.
33. Chevrel G, Dessus V. métronidazole: Antibiotique : nitro-imidazolé – Flagyl®. In: Chevrel G, Dessus V, éditeurs. *300 médicaments injectables*. Paris: Elsevier Masson; 2009. p. 366-7.
34. Association française des enseignants de chimie thérapeutique. *Traité de chimie thérapeutique*. Paris; Cachan: Technique et documentation Lavoisier ; Ed. Médicales internationales; 1992.
35. Carsenti-Etesse H. Critères microbiologiques et pharmacologiques du choix des antibiotiques dans le traitement des infections ostéo-articulaires. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 août 1991;21(8):491-504.

36. Danziger LH. Controversies in antimicrobial therapy: innovative methods of administration. *Am J Hosp Pharm.* mars 1986;43(3):646-52.
37. SOUSSY CJ. Associations d'antibiotiques. In : *Bactéricidie : aspects théoriques et thérapeutiques.* Maloine. Paris; 1990.
38. Calhoun C, Wermuth HR, Hall GA. Antibiotics. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
39. Loree J, Lappin SL. Bacteriostatic Antibiotics. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
40. CREMIEUX AC. Pénétration intracellulaire des antibiotiques. *Lettre de l'infectiologie* 1989 ; 4(17) : 695.
41. NEUMAN M. - *Vade-Mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux.* - Maloine, éd., Paris, 1990.
42. Cahiers de la Ligue pour la Prévention des Maladies Infectieuses. *L'antibioprophylaxie en chirurgie*, 1986.
43. Auzépy Ph., Manigand G. *Accidents des médicaments* .
44. SENNEVILLE E, CHIDIAC C, SIVERY B. L'antibiothérapie au cours de la grossesse. *Lettre de l'Infectiologue* 1990 ; 5 (7) : 258.
45. Bryskier A. Fluoroquinolones : Classification, propriétés physicochimiques, activités antibactériennes et pharmacocinétiques. *ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE.* 1999;4(10).
46. Bryskier A. E. Fluoroquinolones : Classification, propriétés physicochimiques, activités antibactériennes et pharmacocinétiques. *EM-Consulte.*
47. Bryskier A., Chantot JF. Classification and structure-activity relationship of fluoroquinolones. *Drugs* 1995 ; 49 (suppl 2) : 16-28.
48. Al-Nadaf AH, Salah SA, Taha MO. Discovery of new Gyrase β inhibitors via structure based modeling. *Computational Biology and Chemistry.* juin 2018;74:263-72.
49. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci.* vol. 73. 1976;3872-6.

50. Oblak M, Grdadolnik SG, Kotnik M, Jerala R, Filipič M, Šolmajer T. In silico fragment-based discovery of indolin-2-one analogues as potent DNA gyrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. déc 2005;15(23):5207-10.
51. Brvar M, Perdih A, Hodnik V, Renko M, Anderluh G, Jerala R, et al. In silico discovery and biophysical evaluation of novel 5-(2-hydroxybenzylidene) rhodanine inhibitors of DNA gyrase B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. avr 2012;20(8):2572-80.
52. Valenti A, Perugino G, Varriale A, D'Auria S, Rossi M, Ciaramella M. The Archaeal Topoisomerase Reverse Gyrase Is a Helix-destabilizing Protein That Unwinds Four-way DNA Junctions. *Journal of Biological Chemistry*. nov 2010;285(47):36532-41.
53. Jeankumar VU, Renuka J, Pulla VK, Soni V, Sridevi JP, Suryadevara P, et al. Development of novel N-linked aminopiperidine-based mycobacterial DNA gyrase B inhibitors: Scaffold hopping from known antibacterial leads. *International Journal of Antimicrobial Agents*. mars 2014;43(3):269-78.
54. Shapiro AB, Andrews B. Allosteric inhibition of the DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by a representative of a novel class of inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. oct 2012;84(7):900-4.
55. Craig W., Dahloff A. Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental animals. *Handbook Expt Pharmacol* 1998 ; 127 : 206-232.
56. Werner MM, Patel BA, Talele TT, Ashby CR, Li Z, Zauhar RJ. Dual inhibition of *Staphylococcus aureus* DNA gyrase and topoisomerase IV activity by phenylalanine-derived (Z)-5-arylmethylidene rhodanines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. sept 2015;23(18):6125-37.
57. Fisher JF, Mobashery S. Enzymology of Bacterial Resistance. In: Liu HW (Ben), Mander L, éditeurs. *Comprehensive Natural Products II*. Oxford: Elsevier; 2010. p. 443-87.
58. Lemaitre F, Garraffo R. Quinolones. In: Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Collège National de Pharmacologie Médicale, Verdier MC, éditeurs. *Pharmacologie des Anti-Infectieux*. Paris: Elsevier Masson; 2018. p. 89-95.
59. Bryskier A. Novelties in the field of fluoroquinolones. *Exp Opin Invest Drugs* 1997 ; 6 : 1227-1240.

60. Tradigo G, Rondinelli F, Pollastri G. Algorithms for Structure Comparison and Analysis: Docking. In: Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. Elsevier; 2019. p. 77-80.
61. Yap BK, Lee CY, Choi SB, Kamarulzaman EE, Hariono M, Wahab HA. In Silico Identification of Novel Inhibitors. In: Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. Elsevier; 2019. p. 761-79.
62. Yan C, Zou X. Modeling Protein Flexibility in Molecular Docking. In: Comprehensive Medicinal Chemistry III. Elsevier; 2017. p. 319-28.
63. Chaudhary KK, Mishra N. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. JSM Chem 4(3): 1029.
64. Agarwal, S., & Mehrotra, R. An overview of molecular docking. JSM Chem;2016: 4, 1024.
65. Nović, M., Tibaut, T., Anderluh, M., Borisček, J., & Tomašič, T. The comparison of docking search algorithms and scoring functions: an overview and case studies. In Methods and algorithms for molecular docking-based drug design and discovery. 2016;(pp. 99-127). Hershey, PA : IGI Global.
66. Ma, D. L., Chan, D. S. H., & Leung, C. H. Drug repositioning by structure-based virtual screening. Chemical Society Reviews. 2013;42(5), 2130-41.
67. Cole J, Davis E, Jones G, Sage CR. Molecular Docking—A Solved Problem? In: Comprehensive Medicinal Chemistry III. Elsevier; 2017. p. 297-318.
68. Davis AM. Quantitative Structure–Activity Relationships. In: Comprehensive Medicinal Chemistry III. Elsevier; 2017. p. 379-92.
69. Cruz-Montegudo M, Schürer S, Tejera E, Pérez-Castillo Y, Medina-Franco JL, Sánchez-Rodríguez A, et al. Systemic QSAR and phenotypic virtual screening: chasing butterflies in drug discovery. Drug Discovery Today. 1 juill 2017;22(7):994-1007.
70. Peter SC, Dhanjal JK, Malik V, Radhakrishnan N, Jayakanthan M, Sundar D. Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR): Modeling Approaches to Biological Applications. In: Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. Elsevier; 2019. p. 661-76.

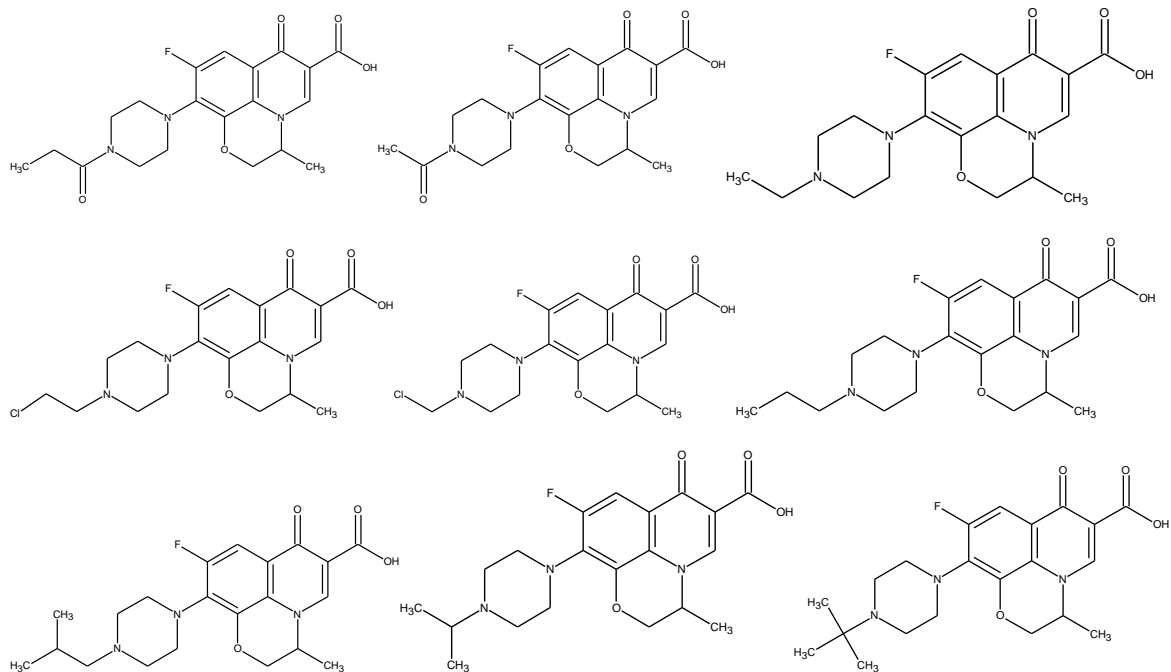
71. Randic M. Molecular bonding profiles. *J. Math. Chem.* 1996, 19, 375–392.
72. Gini G. QSAR Methods. *Methods Mol Biol.* 2016;1425:1-20.
73. Roy, K., Kar, S., Das, R.N. Statistical methods in QSAR/QSPR. A Primer on QSAR/QSPR Modeling. 2015;37-59.
74. Jaworska, J., Nikolova-Jeliazkova, N., Aldenberg, T. QSAR applicability domain estimation by projection of the training set descriptor space : A review. 2005;33,445.
75. CLC bio company. MOLEGRO VIRTUAL DOCKER. FERKOUS F. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA; 2013.
76. Bank RPD. RCSB PDB - 2XCT: The twinned 3.35Å structure of *S. aureus* Gyrase complex with Ciprofloxacin and DNA. Disponible sur: <https://www.rcsb.org/structure/2XCT>
77. Bank RPD. RCSB PDB: Homepage. Disponible sur: <https://www.rcsb.org/>
78. Swiss Institute of Bioinformatics. DeepViewSwiss-PdbViewer.
79. Magda AA, Abdel-Aziz NI, Alaa AM, El-Azab AS, Asiri YA, ElTahir K. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective cox-2 inhibitors: molecular docking study. *Bioorganic & medicinal chemistry.* 19(11). 2011;3416-24.
80. RAHAL K, BELLOUNI R. 17^{ème} rapport de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 2018.
81. Chaudhury S, Gray JJ. Conformer selection and induced fit in flexible backbone protein-protein docking *Mol. Biol.* 2008;1068-87.
82. Guo et al. *Arch. Pharm. Chem. Life sci.* 2011;344,802-809.
83. Fedorowicz J, Sączewski J, Drazba Z, Wiśniewska P, Gdaniec M, Wicher B, et al. Synthesis and fluorescence of dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-2-ium-carboxylates: An experimental and TD-DFT comparative study. *Dyes and Pigments.* 1 févr 2019;161:347-59.
84. Zhao X, Zhao Y, Ren Z, Li Y. Combined QSAR/QSPR and molecular docking study on fluoroquinolones to reduce biological enrichment. *Computational Biology and Chemistry.* avr 2019;79:177-84.

85. Papadopoulos AI, Tsivintzelis I, Linke P, Seferlis P. Computer-Aided Molecular Design: Fundamentals, Methods, and Applications. In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier; 2018. p. B9780124095472144000.
86. Tableur de feuille de calcul - Microsoft Excel
87. Open Babel. Disponible sur: http://openbabel.org/wiki/Main_Page
88. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints - Yap - 2011 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library.
89. Docker virtuel Molegro – Molexus. Disponible sur: <http://molexus.io/molegro-virtual-docker/>
90. Accelrys Discovery Studio Visualizer 2.5 Download... Disponible sur: <https://accelrys-discovery-studio-visualizer.software.informer.com/3.0/>
91. ChEMBL Database. Disponible sur: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>
92. Miranda LS de M, de Souza ROMA, Leão RAC, Carneiro PF, Pedraza SF, de Carvalho OV, et al. Continuous-Flow Sequential Schotten–Baumann Carbamoylation and Acetate Hydrolysis in the Synthesis of Capecitabine. Org Process Res Dev. 15 nov 2019;23(11):2516-20.
93. Georg GI, Boge TC, Cheruvallath ZS, Harriman GCB, Hepperle M, Park H, et al. Schotten-Baumann acylation of N-debenzoyltaxol; an efficient route to N-acyl taxol analogues and their biological evaluation. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. janv 1994;4(2):335-8.
94. Kazancioglu MZ. Synthesis and Characterization of Novel *N*-Propylaniline-Phenylpiperazine Sulfonamide and Urea Derivatives. Polycyclic Aromatic Compounds. 14 sept 2022;42(8):5767-78.
95. Workmanjr J. Review of Near-Infrared and Infrared Spectroscopy. In: The Handbook of Organic Compounds. Elsevier; 2001. p. 79-129.
96. Sandle T. Microbiology laboratory techniques. In: Sandle T, éditeur. Pharmaceutical Microbiology. Oxford: Woodhead Publishing; 2016. p. 63-80.

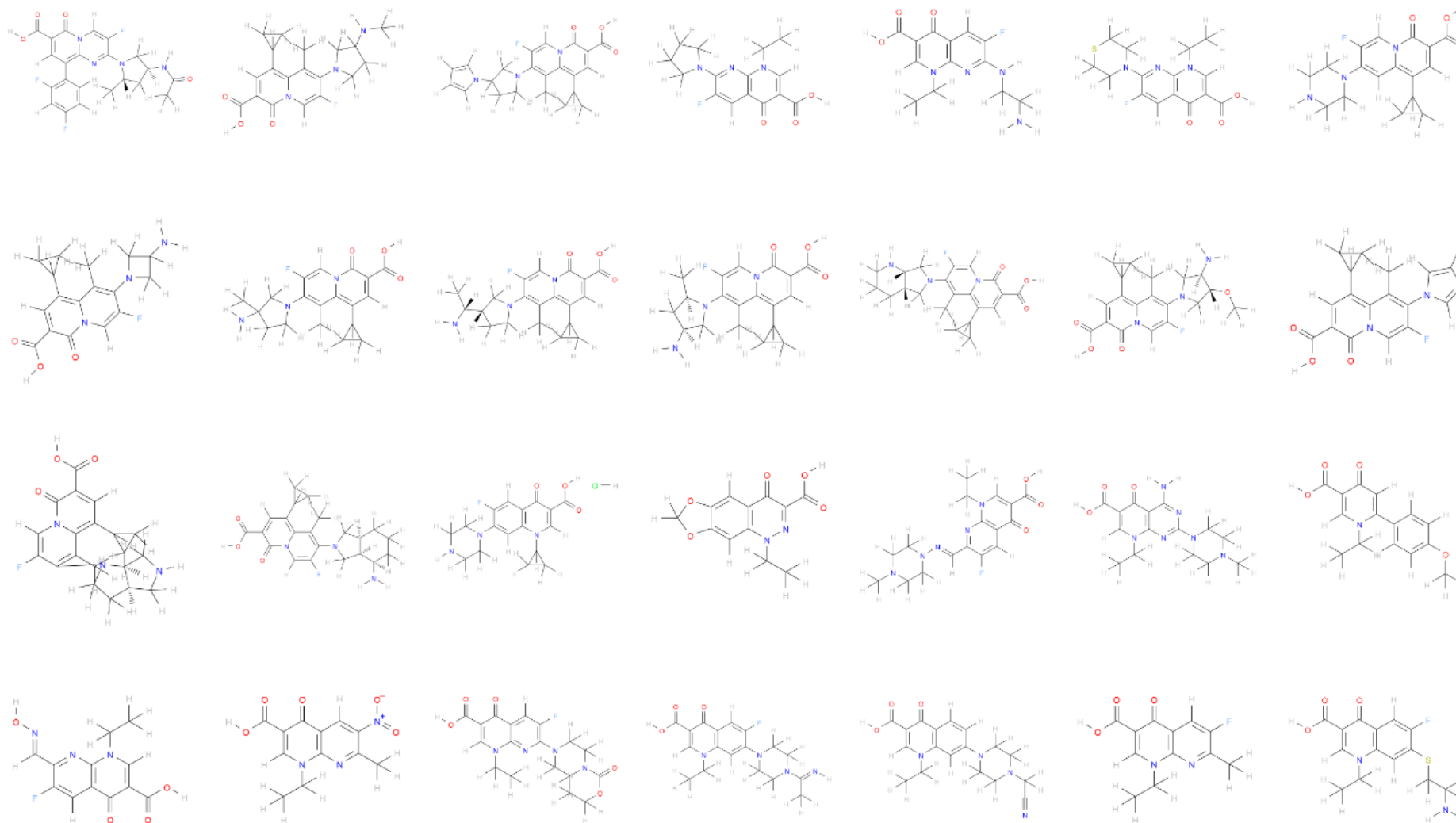
97. Smith SM, Kempton AG, Holley RA. Rapid Measurement Of Meat Quality By Resazurin Reduction. I. Factors Affecting Test Validity*. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. juill 1977;10(3):153-7.
98. Furukawa M, Stirling J, Misawa N, Moore JE. Furukawa Agar – A novel bacteriological agar designed to inhibit fungal contamination when sampling organic compost. Journal of Microbiological Methods. janv 2018;144:88-90.
99. Kirchner L, Marciniak T, Ziebuhr W, Scherf-Clavel O, Holzgrabe U. Development, validation and application of a selective and sensitive LC-MS/MS method for the quantification of daptomycin in a suspension of *Mammaliicoccus sciuri* in Mueller-Hinton broth. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. avr 2023;227:115293.
100. Bébéar C, Robertson JA. Determination of minimal inhibitory concentration. In: Tully JG, Razin S, éditeurs. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma (Second Edition). San Diego: Academic Press; 1996. p. 189-97.
101. Jones RN, Fritsche TR, Sader HS, Stilwell MG. Activity of garenoxacin, an investigational des-F(6)-quinolone, tested against pathogens from community-acquired respiratory tract infections, including those with elevated or resistant-level fluoroquinolone MIC values. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 1 mai 2007;58(1):9-17.
102. Abdullah MAA, Abuo-Rahma GEDAA, Abdelhafez ESMN, Hassan HA, Abd El-Baky RM. Design, synthesis, molecular docking, anti- *Proteus mirabilis* and urease inhibition of new fluoroquinolone carboxylic acid derivatives. Bioorganic Chemistry. févr 2017;70:1-11.
103. Huang HW, Liu HY, Chuang HC, Chen BL, Wang EY, Tsao LH, et al. Correlation between antibiotic consumption and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital implementing an antimicrobial stewardship program: A longitudinal observational study. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. sept 2022;S1684118222001463.

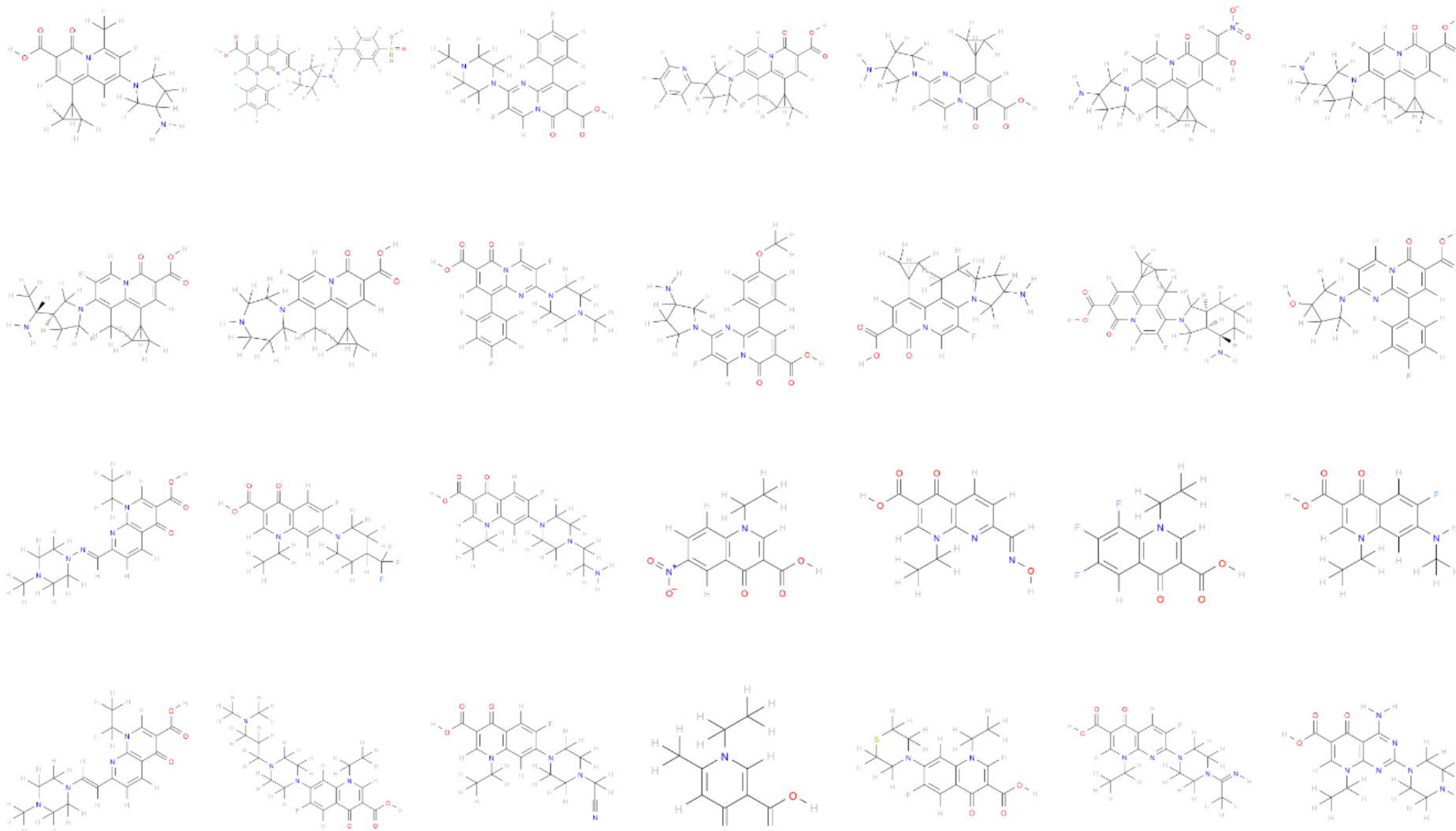
Annexes

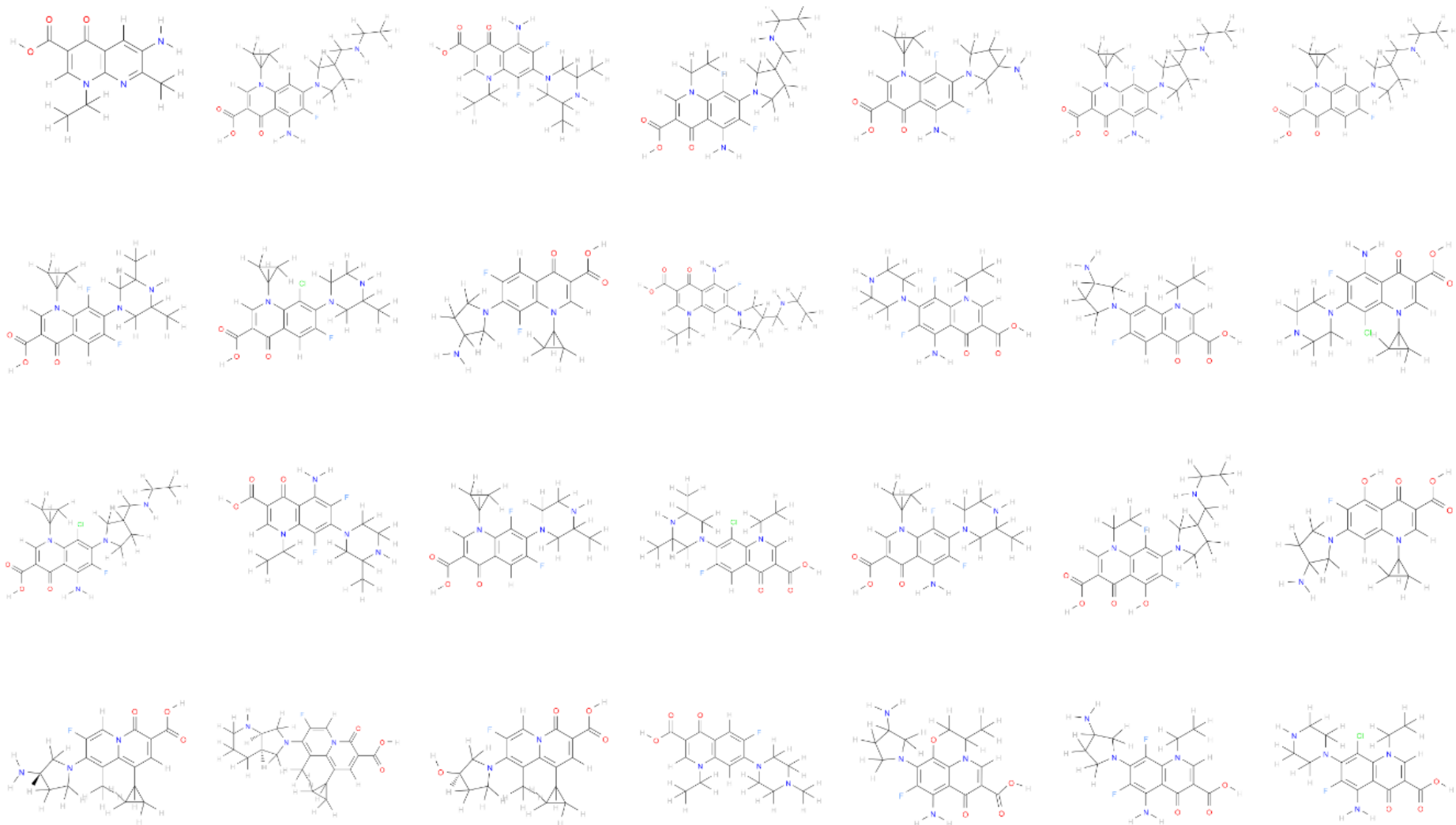
Annexe 1 : structures des molécules issues du docking

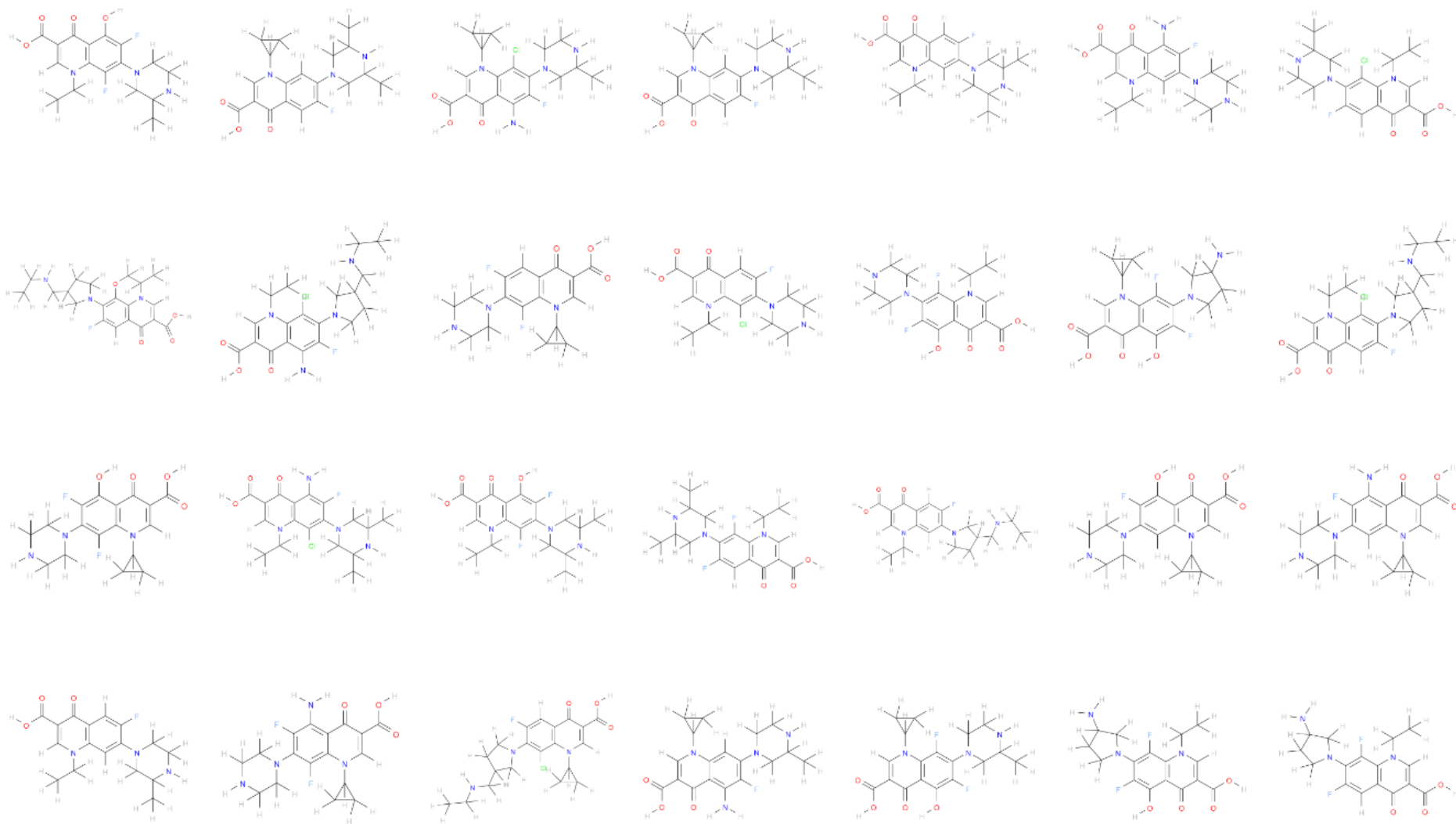


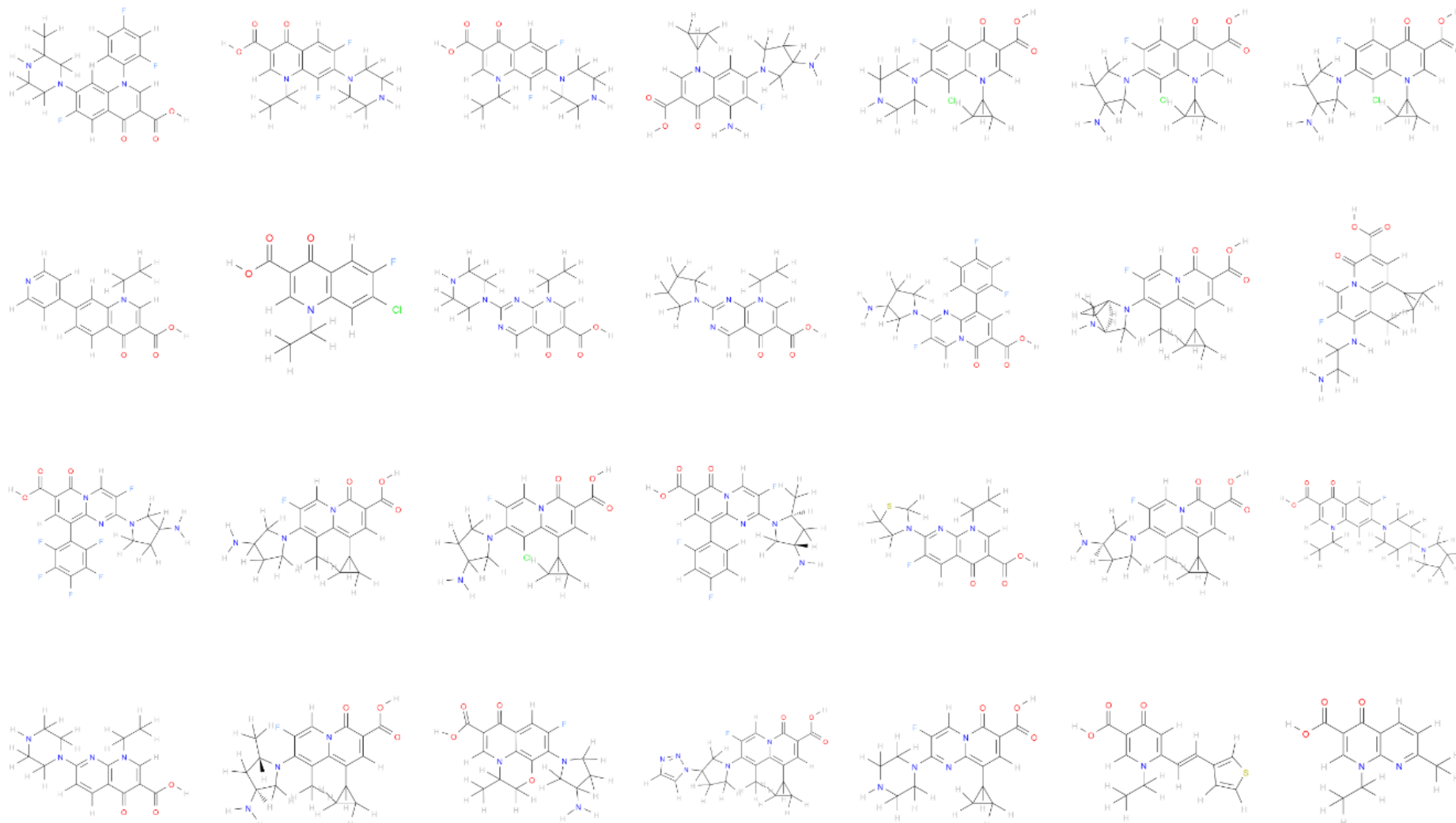
Annexe 2 : les molécules de la dataset (QSAR)

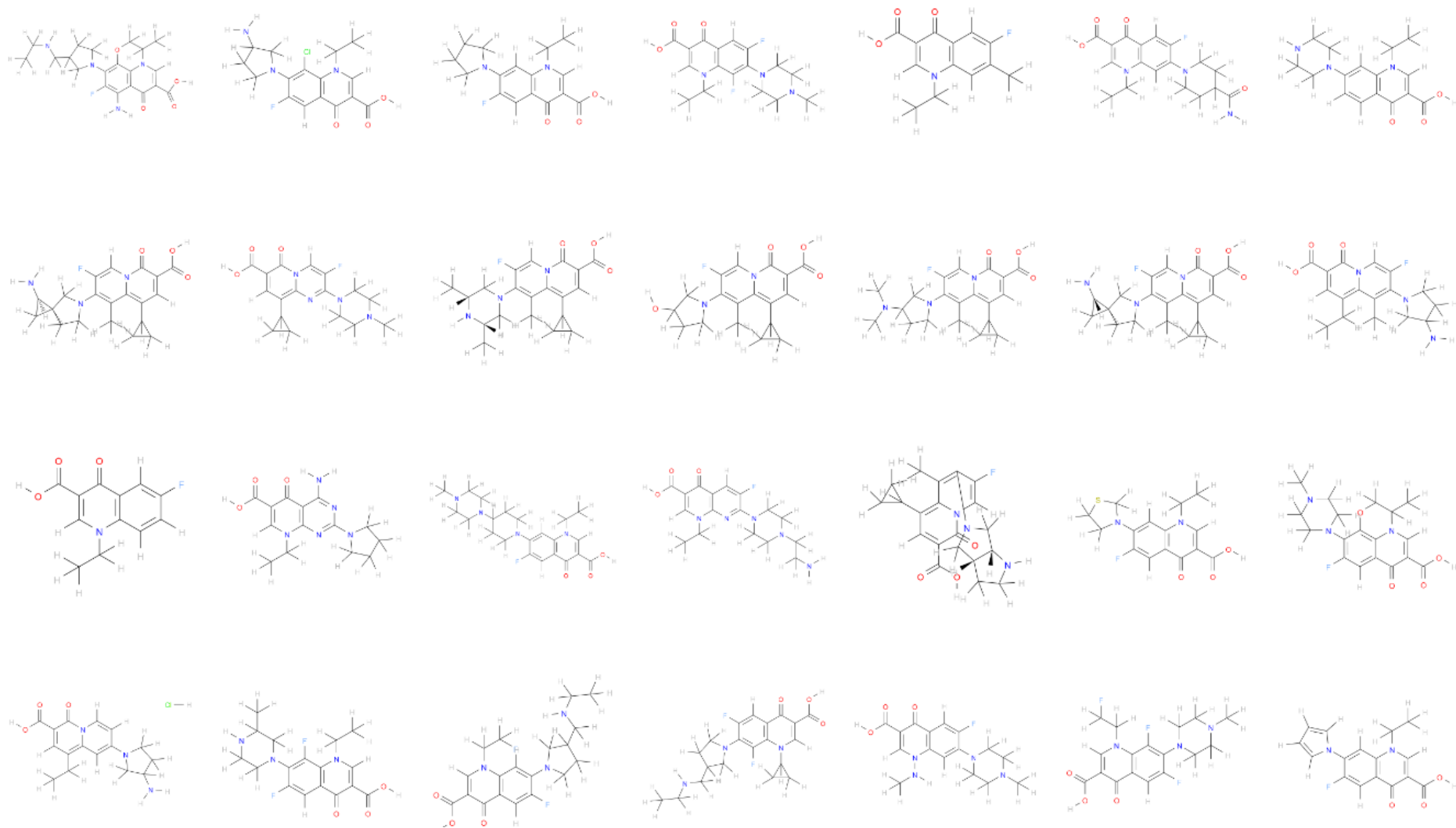


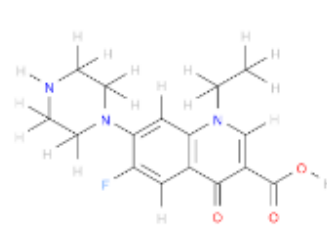
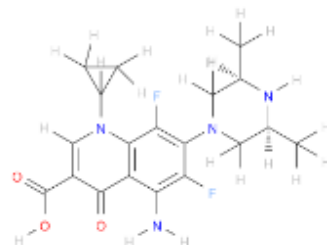
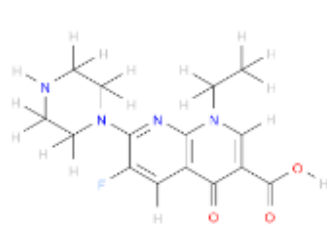
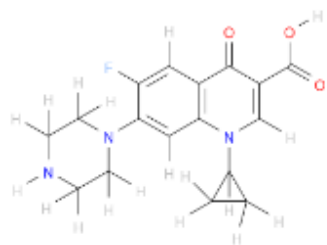
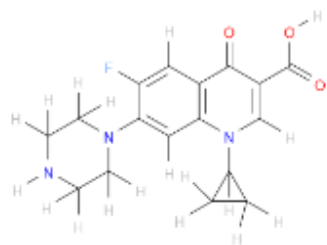












In silico screening and design of N-substituted 7-piperazin-1-ylfluoroquinolone-derived DNA gyrase inhibitor antibiotics

**Mokhenane Ahmed Mosefta¹, Hadjadj-Aoul Fatima Zohra², Benabid Fatma Zohra^{3*},
Kraim Khaireddine⁴, Zouai Foued¹ and Adouani Imene¹**

1: Laboratoire de Biopharmacie et pharmacotechnie, Faculty of Medicine, Sétif, Algeria

2: Laboratory of Medicinal Chemistry, Faculty of Medicine, Algiers, Algeria

3: LMPMP, Faculty of Technology, Faculty of Technology, Ferhat ABBAS University Sétif-1, Algeria

4: The Higher Normal School of Technological Education, Skikda, Algeria

* Corresponding author: fzbenabid@yahoo.fr

ABSTRACT

As multidrug-resistant pathogens have increasingly become a serious public health problem, especially in the last decade, the design of new active agents against resistant organisms is of great importance.

The design of new pharmacologically active molecules against an enzyme can be done by virtual screening, based either on the ligand or on the structure of the target.

Docking is the "structure based" method used to measure the affinity of ligands for the DNA Gyrase protein, it allows to generate the different poses, their positions, orientations and conformations in the active site.

The predictions provided by virtual screening allow to propose a good strategy for the development of a good pharmacophore, it can thus constitute an adequate support to validate or reject a hypothesis.

The protein data base used in our study is 2XCT: The 3.35A° paired structure of the *S. aureus* Gyrase complex with ciprofloxacin and DNA, this pdb was chosen according to the criteria mentioned below and was downloaded from the protein data base.

According to the first part of our results, the molecules that contain nitrogen rings in position 7 are the most active, most of the marketed drugs take this basic structure.

The 7-piperazin-1-ylfluoroquinolone series is not fully exploited, especially the N-acylated and N-chloroalkylated derivatives.

In this study, we performed a docking test on a series of molecules selected according to their structures close to the reference inhibitors and which are likely to interact with DNA gyrase in-silico.

Key-words

Virtual screening, in-silico activity, DNA gyrase, fluoroquinolones; activity prediction, pharmacophore.

Introduction

The phenomenon of multidrug-resistant pathogens continues to be a growing public human health problem especially in the last decade [1]; the complex clinical resistance involves interaction between the type of bacterium, its location and distribution in the body and its infection site concentration as well as the immune status of the patient [2]. Unfortunately, the emerging increase in antimicrobial resistance is threatening especially ill patients. Thereby the World Health Organization has named antibiotic resistance as one of the three most important public health threats of the 21st century [3].

For many years, researches continue to discover new potential targets and novel compounds with broad spectra of efficacy against bacterial antibiotic resistance, Matjaz Brvar et al. [4] identified a novel series of 4'-methyl-N2-phenyl-[4,5'-bithiazole]-2,2'-diamine inhibitors of gyrase B with a low micromolar inhibitory activity by implementing a two-step structure-based design procedure. They observed that the highest increase of thermal stability of the complex inhibitor 18-protein G24 matches the best in vitro activity of this compound. In addition, the significance of the inhibitor interaction with the protein loop residue Gly101 was revealed as significant factor in the binding of this compound class. On the other hand, the discovery and the development of new antibacterial drugs have been investigated by Nicole Jackson et al. [5]. Authors mentioned that in order to facilitate discovery activities researchers must be increased understanding of the scientific problems experienced by pharmaceutical companies. Due to the rapid emergence of antibiotic-resistant bacteria, Jonathan M. Stokes et al. [6] have trained a deep neural network capable of predicting molecules with antibacterial activity. They

performed predictions on multiple chemical libraries and discovered a molecule from the Drug Repurposing Hub-halicin which is structurally divergent from conventional antibiotics and displays bactericidal activity against a wide phylogenetic spectrum of pathogens including *Mycobacterium tuberculosis* and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.

DNA gyrase is an enzyme of the class II DNA topoisomerase family, which is capable of introducing a negative supercoil into DNA, its inhibition contributes to bactericidal effects [7]. The quinolone class of antibiotics inhibits the DNA synthesis of bacteria by disrupting the bacterial topoisomerase type II; inhibiting the catalytic activity of DNA gyrase and topoisomerase IV [8]. Quinolones kill bacteria by interfering with DNA synthesis and inhibiting their replication pathway [9].

The design of new pharmacologically active molecules against an enzyme can be done by virtual screening, based either on the ligand or on the structure of the target. The predictions provided by virtual screening allow proposing a good strategy for the development of a good pharmacophore, it can thus constitute an adequate support to validate or reject a hypothesis [7]. Among the most used modeling methods, we can mention the QSAR method (quantitative structure-activity relationships) [8]. In the case where the structure of the target is known, we speak of structure based virtual screening [9] and after screening, we move on to biological testing of molecules with significant theoretical activity [7].

1. Materials and methods

1.1. Materials

2.1.1. Database

A- The protein data base (PDB)

The used protein data base in this study is 2XCT: The 3.35Å° paired structure of the *S. aureus* Gyrase complex with ciprofloxacin and DNA [10]. This PDB which was chosen according to the criteria mentioned below was downloaded from the protein data base [11].

Choice criteria

- Ligand-protein complex whose ligand has been tested in vitro.
- Presence of a reference ligand.
- Low RMSD value after redocking
- PDB with no error after opening by the docking software.

The used PDB, ID and resolution results are shown in table 1.

Table 1: Used PDB, ID and resolution results

PDB	Ligand	Enzyme	RMSD average	Resolution
2XCS	GSK299423	<i>S. aureus</i> DNA gyrase	4.231	2.1Å°
5NPK	Tiophene	<i>S. aureus</i> DNA gyrase	5.611	1.98Å°

2XCT	Ciprofloxacin	<i>E. coli</i> DNA gyrase	1.716	3.35A°
3ILW	E60211	N-terminal subunit of <i>E. coli</i> DNA gyrase	5.728	1.60A°
4Z2C	Moxifloxacin	<i>S. pneumoniae</i> DNA gyrase	4.315	2.80A°

B- Ligands

The 1662 ligands were downloaded in SDF (structure data file) format from the PubChem chemical molecule database.

Selection criteria

- 90% similarity rate with the reference ligand (ciprofloxacin).
- The originality of the molecules was not taken into consideration when choosing the ligands to be docked.

1.1.2. Computers

Our molecular docking was run using a machine with an Intel Core i7 2630QM processor, equipped with an NVIDIA GeForce GT 540M Cuda 2GB graphics card and 8GB of ram.

1.1.3. Software

The docking was launched by the MOLEGRO VIRTUAL DOCKER software [12]. The software that was used for the correction of the PDB is DeepView/Swiss-PdbViewer [13].

1.2. Methods

Molecular Docking

Molecular Docking is a topology of the active site by a three-dimensional representation, specifying the geometry of distances and energies of different types of bonds that significantly influence the stereochemistry on which the ligand-receptor interaction depends [14].

The drug development's goal against pathogenic organisms is the fully inhibition, leading to pathogen death. Antimicrobial drug targets should be necessary having one function and must be present only in the pathogen and be inhibited by a small molecule. The target must be known, as it is part of a crucial cycle in the cell, and its removal must lead to the death of the

pathogen. The target must be unique; no other pathway must be able to complement the function of the target and overcome the presence of the inhibitor. If the macromolecule meets all the criteria described for being a drug target, but functions equally well in healthy human cells as in a pathogen, specificity can often be built into the inhibitor, exploiting structural or biochemical differences between the pathogenic and human forms. Finally, enzymes are often excellent drug targets because compounds can be designed to fit into the active site pocket [14].

The first selection step consists of placing the ligand in the active site of the protein and sampling the possible conformations, positions and orientations (poses), retaining only those that represent the most favorable interaction modes [7].

The second step is the scoring, which consists in evaluating the ligand/protein affinity and giving a score to the poses obtained during the docking phase. This score will allow us to select the best pose among all those proposed [15].

The types of automated docking programs can be divided into:

- Exhaustive: a large number of conformations are generated for each ligand, and all of them are evaluated (e.g. Fred);
- Stochastic: only a few solutions are evaluated; results may not be reproducible [16].

Docking is the "structure based" method used to measure the affinity of ligands for the DNA gyrase protein; it allows generating the different positions, orientations and conformations in the active site [17].

Reference ligand binding site as well as ligand-Protein interaction and ligand-DNA interaction are shown in figure 1.

The used search algorithm is the GPU screening CUDA and the score function: MolDock [12].

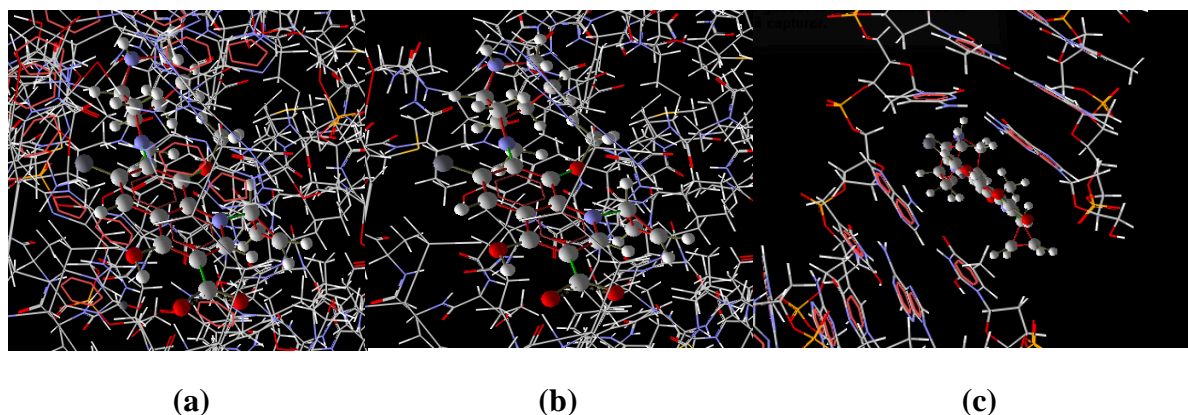


Figure 1: Reference ligand binding site (a), ligand-Protein interaction (b) and ligand-DNA interaction (c)

3. Results and discussion

3.1. Software validation

The RMSD (Root-mean-square deviation) values obtained during the redocking of PDBs (protein database) according to Table 1 vary from 1.716 to 5.728. The lowest value was chosen which corresponds to PDB 2XCT whose ligand is ciprofloxacin which is a reference antibiotic of the fluoroquinolone family [18].

3.2. Enzyme-ligand interaction energies

The 10 poses taken into consideration and represented in Table 2 are the molecules with the lowest binding energies, corresponding to the most stable ligand-enzyme complexes[19].

The selected molecules in our study are more active than the reference molecule. The binding energy of the reference ligand (ciprofloxacin) with the DNA of the enzyme complex has a value of -136.532 which is significantly lower than the value of its binding with the protein which is -17.741. The inhibitory activity of DNA gyrase, is therefore conditioned by a value of binding energy with the DNA lower than that of binding with the protein. Based on these data, the molecules with the lowest Ligand-DNA binding energies with a higher number of hydrogen bonds were considered, whose Ligand IDs are: 67941830, 56838103, 58180731.

Table 2: Enzyme-ligand binding energies of the database molecules

Ligand ID	Total energy	External energy		Internal energy	Number of H bonds with protein	Number of H bonds with DNA
		Prot-lig	DNA-lig			
Ciprofloxacin	-117,462	-17,741	-136,532	36	1	1
58344411	-227,36	-120,338	-130,173	23,152	5	4
67311808	-217,146	-63,992	-169,68	16,526	2	3
58180731	-212,910	-70,067	-180,520	40,677	2	5
42641770	210,317	-59,723	-168,259	17,666	5	4

59650039	207,700	-63,468	-160,613	16,381	6	2
24879259	206,421	-60,637	-163,113	17,328	2	1
67941830	206,193	-50,752	-172,302	16,861	2	4
68795618	205,889	-66,895	-170,371	31,377	3	2
14457298	205,604	-38,5	-182,521	15,417	1	2
56838103	-203,842-	-67,890	-175,343	39,391	1	4

3.3. Comparison of the interactions of the selected ligands with the reference one

By comparing the number of hydrogen bonds of the selected ligands, which increases from 4 to 5, with that of the reference one, which is equal to 1, we notice that the complexes formed with these molecules are more stable than that formed by the reference ligand (ciprofloxacin).

3.4. Identification of biological activity with selected ligands

67941830; the molecule has promising antitubercular activity [20].

56838103; the molecule has antimicrobial activity; it is patented under patent US8329908B2

58180731; the molecule has antimicrobial activity against E. coli but its antitubercular activity is not yet proven.

Our screening allowed us to select 3 theoretically active molecules; the first two are already described in the literature (67941830 and 56838103).

Our study can be continued by a demonstration of the antitubercular activity of the recently discovered molecule 58180731.

3.5. Design of new molecules

According to the previous results, the molecules containing nitrogen rings in position 7 are the most active, most of the marketed drugs take this basic structure [18].

The series of 7-piperazine fluoroquinolones is not fully exploited, especially the N-acylated and N-chloroalkylated derivatives.

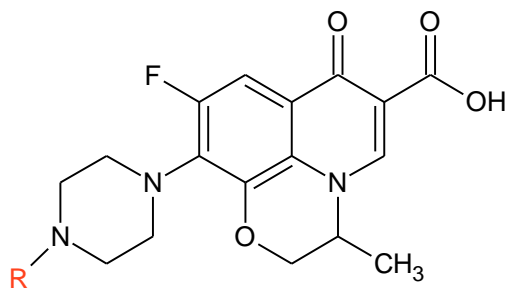


Figure 2: General structure of N-substituted 7-piperazine fluoroquinolones

In order to exploit this series, 10 molecules have been proposed of which 2 are already commercialized, 4 are already synthesized and their antibiotic activities are known, and 4 new molecules that have never been synthesized before, these molecules have been docked with the DNA gyrase PDB 2XCT with MOLEGRO VIRTUAL DOCKER via the cuda GPU scoring algorithm and the results are represented in Table 3.

Table 3: Enzyme-ligand binding energies of molecules from the design

R	Ligand-ID Dci/pubchem	Totale energy	External energy		Internal energy	Hydrogen bonds with the protein	Hydrogen bonds with DNA
			Prot-lig	DNA-Lig			
/	Ciprofloxacin	-118.638	-22.101	-128.481	31.944	Ser 1084 (B) Arg 1122 (B)	F, H, G
Methyl	Ofloxacin	-157.771	-68.846	-112.971	24.047	Gly 459 (B) Arg 1122 (D)	E
Propanoyl	Original molecule	-192.273	-67.982	-144.490	20.199	Gly 459 (B) Arg 1122 (B)	2xG, H, E
Chloromethyl	Original molecule	-178.398	-36.479	-167.615	25.696	Arg 1122 (G)	2xG, 2xH
Chloroethyl	Original molecule	-177.652	-32.372	-180.007	34.727	0	3xH, G, E
Acetyl	452725	-175.495	-68.971	-132.509	25.985	Arg 1122 (D) Gly 459 (B)	G, H, E
Ethyl	13060060	-174.166	-33.342	-173.772	32.947	0	3xH, G
Propyl	452724	-171.016	-69.501	-128.495	26.980	Gly 459 (B) Arg 1122 (D)	E
Isobutyl	Original molecule	-169.618	-29.911	-173.588	33.881	Ser 1084 (B) Arg 1122 (D)	G, H
Isopropyl	13400660	-166.719	-39.977	-160.967	34.224	Ser 1084 (B) x2 Arg 1122 (D)	G
Tertiobutyl	Original molecule	-165.901	-54.223	-150.634	38.955	Arg 1122(D) Gly 459 (B)	G, E

According to the results in Table 3, it is noted that:

The C=O groups of the quinolone ring, the OH of the acid and the oxygen of the oxazinan ring are common among all derivatives and are essential for DNA gyrase inhibitory activity, the type of binding varies from compound to compound, the C=O groups of the quinolone ring and the oxazinan oxygen form bonds with amino acids (see figure 3), while the OH of the acid function binds with the E fragment of DNA, which is consistent with the results of the study by Fedorowicz, J. 2019[21].

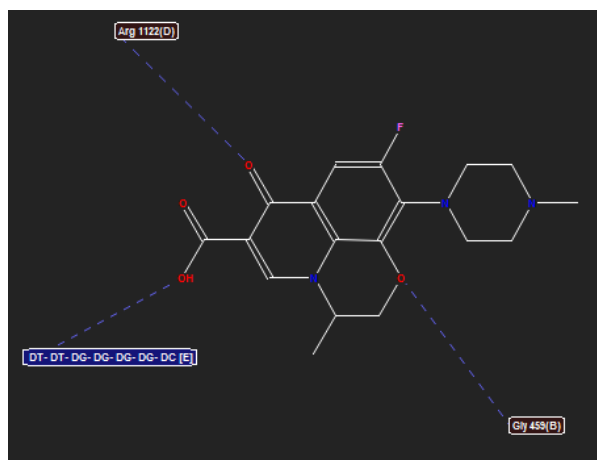


Figure 3: Ligand map of the interaction of the N-methyl derivative (ofloxacin) with DNA gyrase

The electron donating substituents including isopropyl, isobutyl, propyl, tertiary butyl favor the formation of a hydrogen bond between the DNA fragment G of the enzyme and the piperazine nitrogen; this may be due to the steric interaction between the isopropyl group and the Arg 458 residue (B) as shown in figure 4.

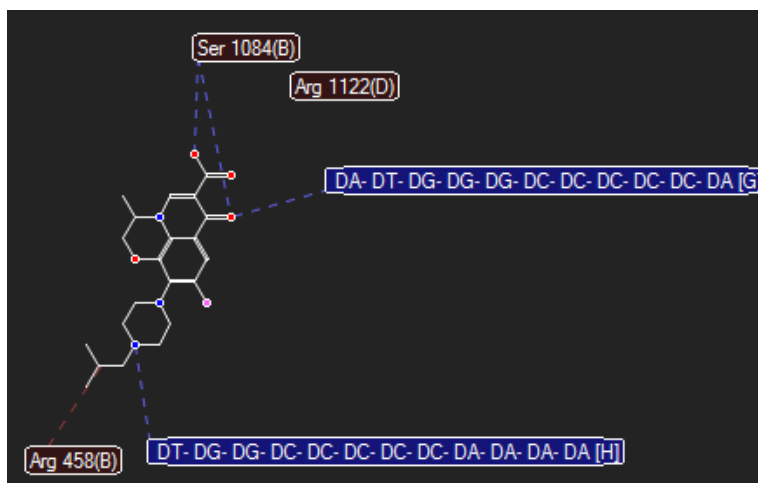


Figure 4: Ligand map of the interaction of the N-Isobutyl derivative with DNA gyrase

The C=O group of the N-acyl derivatives allows the establishment of additional bonds with DNA, which justifies the very low values of the binding energies between them and DNA gyrase (see table 3), and grants the formation of stable complexes (DNA, molecule and enzyme) thus favoring the inhibitory activity of the enzyme DNA gyrase.

Derivatives substituted on the N atom of the piperazine ring by electron-withdrawing groups such as the chloro groups in chloromethyl and chloroethyl promote the formation of steric bonds between the piperazine ring and the Arg 1122 residue (D).

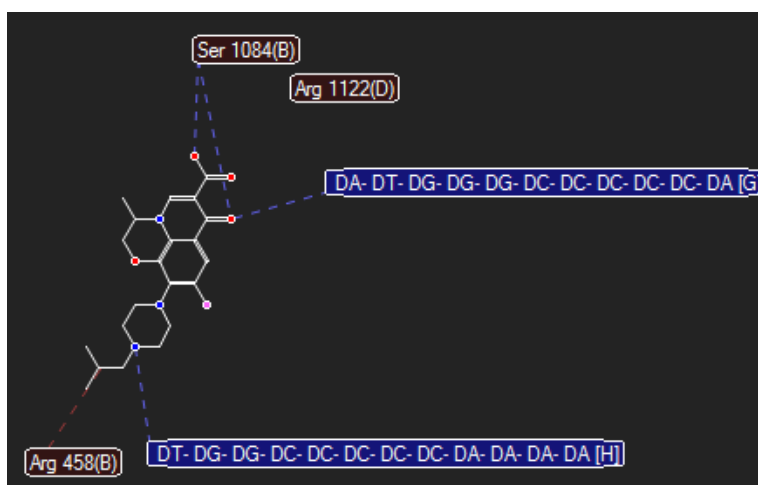


Figure 5: Ligand map of the interaction of the N-Isobutyl derivative with DNA gyrase

In the other hand, Figures 5 and 6 show that derivatives substituted on the N atom of the piperazine ring by electron-withdrawing groups such as the chloro groups in chloromethyl and chloroethyl promote steric bonding between the piperazine ring and Arg 1122 (D).

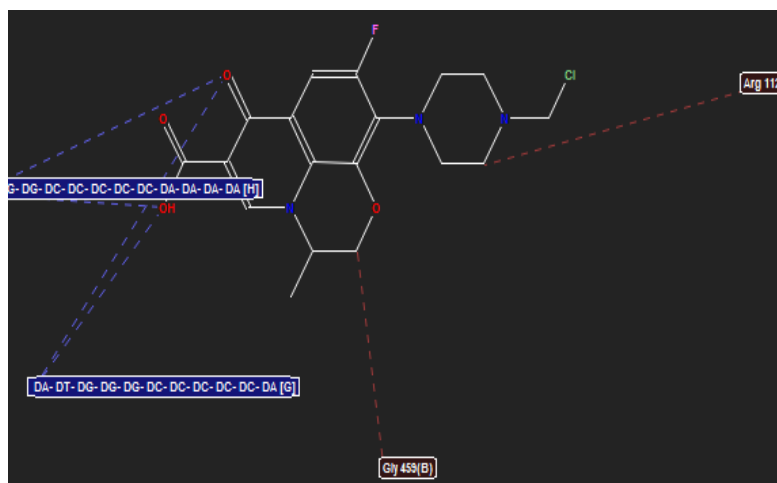


Figure 6: Ligand map of the interaction of the N-chloromethyl derivative with DNA gyrase

Conclusion

In this study, we performed a docking test on a series of molecules selected according to their structures close to the reference inhibitors and which are likely to interact with DNA gyrase in-silico. The analysis of the different structures of the first 10 molecules with the lowest binding energy scores directed us towards the derivatives of 7-piperazine quinolone. The results of the interaction energy score measurements after docking of these molecules showed that the N-propanoylated and N-chloromethylated derivatives of 7-piperazine quinolone are promising and proved to be active in-silico with a higher predicted activity than that of the reference molecules, in particular ciprofloxacin and ofloxacin.

References

- [1] Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health, *Water*, 12, 3313.
- [2] Dekaboruah, E., Vasant Suryavanshi, M., Chettri, D., & Kumar Verma, A., (2020). Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role, *Archives of Microbiology*, 202, 2147–2167.
- [3] Munita, J.M., & Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance, *Microbiol Spectr.* 4(2), doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- [4] Brvar, M., Perdih, A., Renko, M., Anderluh, G., Turk, D., & Solmajer, T. (2012). Structure-Based Discovery of Substituted 4,5-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors, *J. Med. Chem.* 55, 6413–6426.
- [5] Jackson, N., Czaplowski, L., & Piddock, L. (2018). Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience? *J Antimicrob Chemother.* 73, 1452–1459.
- [6] Stokes, J., Yang, K., Swanson, K., Jin, W., Cubillos-Ruiz, A., Donghia, N., MacNair, C., French, S., Carfrae, L., Bloom-Ackermann, Z., Tran, V., Chiappino-Pepe, A., Badran, A.,

- Andrews, I., Chory, E., Church, G., Brown, E., Jaakkola, T., Barzilay, R., & Collins, J. (2020). A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery, *Cell*.180, 688–702.
- [7] Bush, N., Diez-Santos, I., Abbott, L., & Maxwell, A.(2020).Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance, *Molecules*. 25, 5662.
- [8] Pham, T., Ziora, Z., & Blaskovich, M. (2019). Quinolone antibiotics, *Med. Chem. Commun*.10, 1719–1739.
- [9] Aldred, K., Kerns, R., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance, *Biochemistry*.53, 1565–1574.
- [10] Bank RPD. RCSB PDB - 2XCT: The twinned 3.35Å structure of *S. aureus* Gyrase complex with Ciprofloxacin and DNA [Internet]. [cité 6 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.rcsb.org/structure/2XCT>
- [11] Bank RPD. RCSB PDB: Homepage [Internet]. [cité 9 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.rcsb.org/>
- [12] CLC bio company. MOLEGRO VIRTUAL DOCKER. FERKOUS,F. University of BADJI MOKHTAR Annaba; Algeria,2013.
- [13] Swiss Institute of Bioinformatics. DeepViewSwiss-PdbViewer.
- [14] Magda, A-A., Abdel-Aziz,NI., Alaa, A-M., El-Azab,AS., Asiri, YA., ElTahir,K.(2011). Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective cox-2 inhibitors: molecular docking study. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 19(11), 3416-24.
- [15] Chaudhury, S., & Gray, JJ. (2008).Conformer selection and induced fit in flexible backbone protein-protein docking *Mol. Biol*.1068-87.
- [16] Chaudhary ,KK., Mishra,N. (2016).A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem*. 4(3): 1029.
- [17] Agarwal, S., & Mehrotra, R. (2016). An overview of molecular docking. *JSM Chem*.4, 1024.
- [18] Bryskier , A. E. Fluoroquinolones: Classification, propriétés physicochimiques, activités antibactériennes et pharmacocinétiques [Internet]. EM-Consulte. [cité14mars2021]. Disponible sur: <https://www.emconsulte.com/article/11761/fluoroquinolones-i-classification-proprietes-physi>
- [19] Cole, J., Davis, E., Jones, G., Sage, CR. Molecular Docking—A Solved Problem? In: *Comprehensive Medicinal Chemistry III* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 6 mars 2021]. p. 297-318. Disponible at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472123522>
- [20] Guo et al. (2011). *Arch. Pharm. Chem. Life sci*. 344,802-809.
- [21] Fedorowicz ,J., Sączewski ,J., Drażba ,Z., Wiśniewska,P., Gdaniec,M., Wicher, B., et al. (2019). Synthesis and fluorescence of dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-2-ium-carboxylates: An experimental and TD-DFT comparative study. *Dyes and Pigments*. 1 févr 2019;**161**:347-59.

Résumé :

Le développement de nouveaux antibiotiques efficaces est un enjeu de santé publique majeur. Dans cette thèse, nous avons utilisé une approche intégrée combinant la modélisation QSAR, le docking moléculaire, la synthèse de composés et l'évaluation de l'activité biologique *in vitro* pour concevoir une nouvelle molécule antibiotique. Nous avons commencé par utiliser le docking moléculaire pour étudier l'interaction entre la molécule synthétisée dans notre étude et l'ADN Gyrase. Ensuite, nous avons construit un modèle QSAR robuste avec 5 variables pour prédire l'activité antibactérienne de notre composé candidat. Les résultats ont été utilisés pour guider la synthèse d'un nouveau composé antibactérien qui a été préparé par une synthèse de Schotten-Baumann modifiée. Enfin, nous avons testé l'activité antibactérienne de notre composé synthétisé contre des souches bactériennes de référence et cliniques. Nous avons identifié un composé prometteur avec une activité antibactérienne significative sur *Proteus mirabilis*. Ces résultats fournissent une base solide pour le développement futur de nouveaux antibiotiques.

Mots clés :

Antibiotique, modélisation QSAR, docking, synthèse, activité antibiotique.

Abstract:

The development of new effective antibiotics is a major public health issue. In this thesis, we used an integrated approach combining QSAR modeling, molecular docking, compound synthesis and *in vitro* biological activity evaluation to design a new antibiotic molecule. We first used molecular docking to study the interaction between the molecule synthesized in our study and DNA Gyrase. Then, we built a robust QSAR model with 5 variables to predict the antibacterial activity of our candidate compound. The results were used to guide the synthesis of a new antibacterial compound that was prepared by a modified Schotten-Baumann synthesis. Finally, we tested the antibacterial activity of our synthesized compound against reference and clinical bacterial strains. We identified a promising compound with significant antibacterial activity against *Proteus mirabilis*. These results provide a solid basis for the future development of new antibiotics.

Keywords:

Antibiotic, QSAR modeling, docking, synthesis, antibiotic activity.