

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Science agronomique
Spécialité/Option : Biologie
Département : Phytopharmacie et protection des végétaux.

Intitulé :

Etude *in silico* de l'effet inhibiteur potentiel d'un groupe de flavonoïdes contre la shikimate kinase chez *Erwinia chrysanthemi* agent responsable de la pourriture molle de la pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*).

Présenté par :

- AOUISSI Amani
- MEKALFA Asma
- KHACHA M^{ed} Amine

Devant le jury composé de :

Mohamed Djekoun. (MCA)

Rabah Zebsa. (MCB)

BAALI Salim. (MCB)

Président

Encadreur

Examineur

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Juin 2020

Remerciement

Nous remercions d'abord « dieu » toute puissant de nous avoir guidé durant ces années et nous permit de réaliser ce mémoire en nous donnant la force, la patience et la volonté.

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Monsieur **Mohamed Djekoun** maître assistant à L'Université de 08 mai 1945Guelma. Qui a accepté de présider le jury de soutenance.*

*Aux l'examineur **Rabah Zebza** maître assistant à L'Université de 08 Mai 1945Guelma. Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.*

*Nous voudrions exprimés notre sincère gratitude à notre encadreur : Monsieur **Baali Salim**. Son orientation, ses conseils et la disponibilité qu'il nous a témoignée pour nous permettre de mener à bien ce travail.*

Asma, Amani et Amine

Dédicace :

Je dédie ce modeste de travail :

À mon cœur papa qui a sacrifié pour moi et a fait tous ses efforts pour qu'il n'y ait aucun obstacle pour être là où je suis et atteindre mes objectifs.....

À mon idéal de vie maman qui m'a soutenu toute aux longs de ma vie, c'est elle qui m'a encouragé, motivé, m'a appris de ne jamais baisser les mains soit dans mes études ou dans autre domaine. C'est elle qui m'a fait une forte fille,

« Que Dieu vous protège et vous donne la
longévité »

À ma chérie d'amour ma sœur Aya Aouïssi.

À mon petit et unique frère Akram Aouïssi.

« I HOPE U ALL THE BEST BROTHERS »



AMANI Aouïssi.

Dédicaces

Dédicaces

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots,
que je dédie ce modeste travail de fin d'étude a
mes chers parents, qui ont sacrifiés leurs vies
pour ma réussite et m'éclairé le chemin afin de
réaliser mon souhait de vivre.*


➤ *Mes chéries d'amour mes sœurs : Amel, Ines,
Assia Salsabil, May Malak.*

À mes grands-mères, que Dieu les protège.



Asma Mekalfa.

Dédicaces

 Je dédie ce mémoire A ...

➤ *MES PARENTS* qui m'ont toujours soutenu, motivé et ENCOURAGÉ.

Ce modeste TRAVAIL est AVANT tout le fruit de leurs efforts. Aucune dédicace ne SAURAIT être ASSEZ éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les SACRIFICES que vous N'AVEZ PAS cessé de me donner depuis MA NAISSANCE, DURANT MON ENFANCE et même A L'AGE ADULTE.

 À mes sœurs adorées.

➤ *MES CAMARADES* dont LA CONNAISSANCE perdue depuis de nombreuses Années. Je pense PARTICULIÈREMENT A :

Mon cousin *Abd el GHANI KHACHA*.

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'ATTACHEMENT, l'Amour et l'Affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce TRAVAIL AVEC TOUS

Mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

**Mohammed
Amine**

Sommaire

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Introduction.

CHAPITRE 01 : *Erwinia chrysanthemi*

I.	Généralité.....	1
II.	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	1
II.1	Définition du pathogènes.....	1
II.1.1	Systématique	2
II.1.2	La répartition.....	2
II.2	Pathogénicité d' <i>Erwinia chrysanthemi</i>	2
II.2.1	Aspects généraux de la pathogénie	2
II.2.2	Mécanisme de la pathologie.....	2
II.2.3	Les enzymes dégradatives.....	3
II.3	Source de contamination.....	5
II.3.1	Les tubercules	5
II.3.2	Rôle du sol et de la rhizosphère.....	5
II.3.3	Matériel agricole.....	5
II.3.4	Les insectes.....	6
II.4	Symptômes	7
II.5	Identification de la maladie	8
II.6	La lutte.....	9
II.6.1	Pratiques culturales et sanitaires	9
II.6.2	Lutte chimique.....	9
II.6.3	Lutte biologique.....	10
II.6.4	La lutte génétique.....	10

CHAPITRE 02 : Les composés phénoliques et La Shikimate Kinase

I.	Les composés phénoliques.....	11
I.1	Généralité	11

I.2	Classification des composés phénoliques	11
I.3	Biosynthèse des composés phénoliques.....	12
I.3.1	La voie de shikimate	12
I.3.2	La voie de phénylpropanoïde.....	16
I.4	Les flavonoïdes	17
I.4.1	Définition	17
I.4.2	Structure des flavonoïdes	17
I.4.3	Classification des flavonoïdes.....	18
I.4.4	Localisation.....	18
I.4.5	Fonctions des flavonoïdes pour les plantes	19

CHAPITRE 03 : Le Docking moléculaire

I.	Généralité.....	20
II.	Programmes du docking les plus cites.....	20
II.1	Principe théorique	22
II.2	Protocole Générale de Docking	22
III.	Le programme GOLD	24
III.1	Algorithme de GOLD	25
III.2	Le mécanisme du placement du ligand dans le site actif.....	25
III.3	La fonction de score.....	26

Matériels et Méthodes

I.	Matériel.....	27
I.1	Microordinateur	27
I.2	Programmes	27
I.2.1	PyMOL.....	27
I.2.2	GOLD.....	28
I.3	Les banques des données.....	29
I.3.1	La banque de données protéiques (PDB).....	29
I.3.2	Pubchem.....	30
I.4	Structure des Shikimate kinase utilisée	30
II.	Méthodes	32
II.1	Préparation des molécules à l'arrimage	32
II.2	Préparation des ligands.....	32
II.3	Les différentes étapes de docking.....	38
I.3.1	Addition des hydrogènes	38

I.3.2	Suppression des molécules d'eau	38
I.3.3	Suppression des ligands	38
I.3.4	Définition de site de liaison.....	38
I.3.5	La sélection du Ligand.....	39
I.3.6	La fonction de score	39
I.3.6	Run Gold.....	39

Résultat et discussion

I.	Les résultats	40
I.1	Fiabilité de programme utilisé.....	40
I.1.1	Le test RMSD	40
I.1.2	L'analyse visuelle	41
I.2	Le docking des diverses molécules sur le récepteur 2SHK par GOLD	43
I.2.1	Le complexe shikimate kinase -ligand (ADP).....	43
I.2.2	Le docking des différents flavonoïdes sur le récepteur 2SHK.....	45
I.2.2.1	Etude des interactions du Curcumine avec la shikimate kinase	47
I.2.2.2	Etude des interactions du Génistéine -7-glucoside avec la shikimate kinase.....	49
II.	La discussion.....	52
	Conclusion.....	54
	Référence bibliographique.	
	Résumé.	

Liste des figures

N° : figure	Titre	Page
Figure 01	Micrographie électronique à balayage montrant des cellules d' <i>E.Chrysanthemi</i> avec tige droite	01
Figure 02	Représentation schématique des mécanismes mis en œuvre lors de l'attaque des tissus de la pomme de terre par <i>Dickeya</i> spp.	03
Figure 03	Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne (AGRIOS, 2005).	06
Figure 04	Symptômes de la jambe noire sur la partie aérienne du plant de pomme de terre	07
Figure 05	Pourriture molle et humide causée par <i>Dickeya</i> sp	08
Figure 06	La voie de shikimate	12
Figure 07	Modèle tridimensionnel de la Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
Figure 08	Modèle tridimensionnel de la Shikimate kinase chez <i>Erwinia chrysanthemi</i> ,	14
Figure 09	Mode de liaison de la ADP avec le site actif de Shikimate kinase chez <i>Erwinia chrysanthemi</i>	14
Figure 10	Mode de liaison de la shikimate avec le site actif de Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
Figure 11	Superposition des structures des shikimate kinase (<i>Erwinia chrysanthemi</i> en vert code pdb : 2SHK, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en rose code pdb : 2DFN, <i>Helicobacter pylori</i> en bleu ciel code pdb : 3N2E).	15
Figure 12	La voie de phénylpropanoïde	16
Figure 13	Structure de base des flavonoïdes	17
Figure 14	Comparaison du programme de docking les plus cités	21

Figure 15	Principe générale d'un programme de docking	21
Figure 16	Protocole général de docking	22
Figure 17	Étapes typiques d'un docking	23
Figure 18	La fenêtre de visualisation	27
Figure 19	L'interface graphique du GOLD	28
Figure 20	L'interface graphique du site web de la base de données PDB.	29
Figure 21	L'interface graphique du site web de la base de données Pubchem.	30
Figure 22	Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (coloré en bleu) et par docking avec GOLD (coloré en jaune). (Code pdb 2SHK. RMSD = 0.665 Å). Image générée par GOLD.	41
Figure 23	Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (coloré en bleu) et par docking avec GOLD (coloré en jaune). (Code pdb 1WE2. RMSD = 0.771 Å). Image générée par GOLD.	42
Figure 24	Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (coloré en bleu) et par docking avec GOLD (coloré en jaune). (Code pdb 114u. RMSD = 1.228 Å). Image générée par GOLD.	42
Figure 25	Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (coloré en bleu) et par docking avec GOLD (coloré en jaune). (Code pdb 2DFT. RMSD = 1.339.Å). Image générée par GOLD.	43
Figure 26	Emplacement de ADP dans le site actif de la shikimate kinase (code PDB : 2SHK). Image générée par Pymol.	44
Figure 27	Mode de liaison de la ADP avec le site actif de la shikimate kinase (code pdb : 2SHK	45
Figure 28	Représentation de liaison hydrogène formée par la Curcumine. Image générée par GOLD.	48
Figure 29	Emplacement de la Curcumine dans le site actif de shikimate kinase chez Erwinia chrysanthemi. Image générée par Pymol.	48
Figure 30	Représentation de liaison hydrogène formée par la Génistéine -7-glucoside. Image générée par GOLD.	49

Figure 31	Emplacement de Génistéine -7-glucoside dans le site actif de shikimate kinase chez <i>Erwinia chrysanthemi</i> . Image générée par Pymol.	50
Figure 32	Superposition entre le substrat ADP (les atomes de carbones colorés en vert) et les composés Curcumine	50
Figure 33	Superposition entre le substrat ADP (les atomes de carbones colorés en vert) et les composés Curcumine (les atomes de carbones colorés en bleu ciel) et genisteine-7- glucoside (les atomes de carbones colorés en violet) dans le site actif de shikimate kinase (code PDB : 2SHK) Image générée par Pymol.	51

Liste des tableaux

N° : tableau	Titre	Page
Tableau 01	Les principales classes des composés phénoliques	11
Tableau 02	Classification des flavonoïdes	18
Tableau 03	Principaux programmes de docking moléculaire	21
Tableau 04	Structure des Shikimate kinase utilisées	31
Tableau 05	Représentation des structures 2D et les formules des flavonoïdes	33
Tableau 06	Valeur de RMSD de complexe shikimate kinase -ligand étudié	40
Tableau 07	Les interactions hydrogène entre la shikimate kinase et le ADP.	45
Tableau 08	Résultats de docking avec le programme GOLD.	46
Tableau 09	Les ponts hydrogènes entre la shikimate kinase et la Curcumine	47
Tableau 10	Les ponts hydrogènes entre la shikimate kinase et le Génistéine – 7-glucoside	49

Liste des abréviations

4CL : La CoA-ligase.

ASP: Astex Statistical Potential.

ATP: Adenosines triphosphate.

C4H: Enzyme cinnamate-4- hydroxylase.

CBD: Chitin Binding Domain.

CCDC : Cambridge Cristallographique Data Centre.

CHEM PLP: Piecewise Linear Potential.

CHS : La chalconesynthase.

Eca : Enzyme de conversion de l'angiotensine.

Ecc : *Pectobacterium carotovorum* sous-espèce *carotovorum*

E.chry : *Erwinia chrysanthemi*.

EP : Enzymes pectinolytiques.

GlcNAc : Poly β -1,4 acetyl glucosamine.

GOLD: Genetic Optimisation for Ligand Docking.

ILE : Isoleucine

IP : Inhibiteurs de protéases.

MEB : Microscopie électronique à balayage.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NIH :National Institutes of Health.

NMP : Nucléosidiques monophosphates.

OEPP : Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes.

OGS : Oligo-galacturonates.

PAL : La phénylalanine ammonia lyase.

PCC : *Pectobacterium carotovorum* sous-espèce *carotovorum*.

PDB : Protein data bank.

PGA : Poly-galacturonates.

Pgp : Glycoprotéine P.

PHE: Phenylalanine.

PLP: Piecewise Linear Potential.

SDF: Stands for structure-data file.

SK: Shikimate kinase

RMSD: Root Mean Square Deviation.

RMN : La Résonance Magnétique Nucléaire.

ROS : Des espèces réactives de l'oxygène.

Introduction

Introduction

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est une plante cultivée pour ses organes de réserve (tubercules) riches en substances nutritives, majoritairement glucidiques (amidon). Elle est originaire des Andes, en Amérique du Sud, où elles sont cultivées depuis plus de 9000 ans., elle joue un rôle clé dans le système alimentaire mondial ce qui est origine de sa classification parmi les légumes les plus consommés. C'est la principale denrée alimentaire non céréalière du monde ; elle vient en quatrième position après le blé, le riz et le maïs qui constituent la base de l'alimentation humaine (FAOSTAT, 2016).

En 2014, l'Algérie a occupé la deuxième place, après l'Égypte, dans la production de la pomme de terre en Afrique du Nord. La production nationale durant la dernière décennie (2003-2014) a augmenté de 1 896 270 tonnes en 2004 à 4 673 516 tonnes en 2014 pour une augmentation de la surface cultivée de 88 660 hectares en 2004 à 140 000 hectares en 2014. L'accroissement du rendement est aussi très significatif, de 21.20 tonnes par hectare en 2004 à 31.43 tonnes par hectare en 2014, c'est en dehors de la production de semences qui montre une nette augmentation durant cette période (FAOSTAT, 2016).

Malgré son importance nutritionnelle et socio-économique, la production et la conservation de la pomme de terre se trouvent fréquemment compromises par les coûts élevés résultant du développement et du contrôle de nombreuses maladies et insectes qui l'affectent (Gregory, 1994). Les coûts liés au contrôle chimique des maladies de la pomme de terre peuvent atteindre 20% des coûts de production dans les pays en développement, sans oublier les dangers potentiels de ces composés sur la santé humaine et l'environnement. Parmi les maladies qui nuisent au secteur de la pomme de terre, la pourriture molle (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*) peut causer des dommages importants sur les tubercules entreposés. (Gardan *et al.*, 2003 ; Samson *et al.*, 2005).

De nos jours la lutte chimique s'est révélée être une méthode de lutte performante et indispensable pour combattre les agents pathogènes (Leroux, 2003 ; Pezet *et al.*, 2004). Ce sont essentiellement des pesticides de synthèse qui sont considérés comme l'arme la plus efficace, mais l'épandage massif et répété de certains de ces pesticides chimiques conduit à une pollution de notre environnement. Ainsi, des résidus sont retrouvés dans l'eau, dans les sols et dans les produits finis. En effet, l'utilisation massive des pesticides

a engendré l'apparition de souches résistantes, contre lesquelles les produits actuels sont devenus peu efficaces voire inefficaces.

En regard à ces inconvénients, il est important de trouver des solutions alternatives qui permettront de continuer à lutter contre les maladies tout en diminuant l'emploi de produits chimiques. Néanmoins à l'heure actuelle où les pressions économique, écologique, sanitaire et législative sont de plus en plus fortes, on comprend l'intérêt d'exploiter d'autres moyens de lutte.

Ces moyens sont donc basés sur la rationalisation des pratiques agricoles (fumigation stérilisation en horticulture, désinfection des graines, rotation des cultures, contrôle du vecteur de la maladie), par l'utilisation de variétés résistantes, des micro-organismes bénéfiques.

Une autre alternative à l'utilisation des pesticides consiste à utiliser des composés naturels et qui peuvent être essentiellement connues pour leur pouvoir antibactérienne ([Regnault-Roger, 2012](#) ; [Kassi et al., 2014](#) ; [Xue et al., 2014](#)).

D'autre part, actuellement la recherche en biologie ne peut se passer des outils informatiques pour traiter le flux de données produites et optimiser ses avancées. L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus précisément l'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo saxon " docking "). L'emploi initial du " docking " moléculaire a été de prédire et reproduire des complexes protéine-ligand ([Chikhi, 2007](#)).

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre deux molécules. De même, la découverte de nouvelles drogues activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom de "amarrage" ou "docking" moléculaire ont été développées.

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*. Les

logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée (Grosdidier, 2007).

L'objectif de la présente étude consiste à évaluer les activités antibactériennes d'un groupe de flavonoïdes et comprendre les mécanismes mis en jeu dans les interactions entre les flavonoïdes et la shikimate kinase bactérienne par la méthode de docking moléculaire avec le programme **GOLD**. Il nous a paru alors important de développer cet aspect en vue d'évaluer l'énergie d'interaction de ces composés et aussi de visualiser les liaisons qu'ils impliquent avec le site actif de cet enzyme. Enfin nous avons tenté de proposer, *in silico*, de nouveaux inhibiteurs naturels plus puissants envers la cible thérapeutique en question.

La présente étude s'articule autour de deux parties, la première partie est une synthèse bibliographique sur la bactérie phytopathogène (*Erwinia chrysanthemi*), les composés phénoliques et la shikimate kinase (La structure mise en jeu). Au niveau de deuxième partie on a étalé les méthodes et les techniques utilisées pour mener ce travail ; aussi les résultats obtenus ainsi que leurs discussions et on a terminé par une conclusion générale.

Chapitre 01:

Erwinia chrysanthemi

I. Généralité

Erwinia est le principal genre bactérien qui envahisse et se reproduit sur des plantes vivantes. Les phytopathogènes d'*Erwinia*, Nommé par **Erwin F. Smith**, Le pionnier des maladies végétales pionnières américaines, (Murachi, *et al.*, 1995).

D'après Chatterjee et Starr, (1973) et Semal, (1989) ce genre appartient à la famille des Enterobacteriaceae, regroupe les bactéries phytopathogènes gram négatif aérobies facultatif ; la plupart des *Erwinia* sont des phytopathogènes, bien que certaines espèces soient impliquées dans des pathologies humaines ; tandis que d'autres jouent un rôle en tant qu'épiphytes non pathogènes.

II. *Erwinia chrysanthemi*

II.1 Définition du pathogène

Erwinia chrysanthemi (*E.ch*), originairement isolée du chrysanthème par Burkholder (1953). Les *E.chrysanthemi* sont désormais intégré dans le nouveau genre *Dickeya*. Avec une température de croissance optimal élevée 35 à 37 C (Janse et Ruissen, 1988).

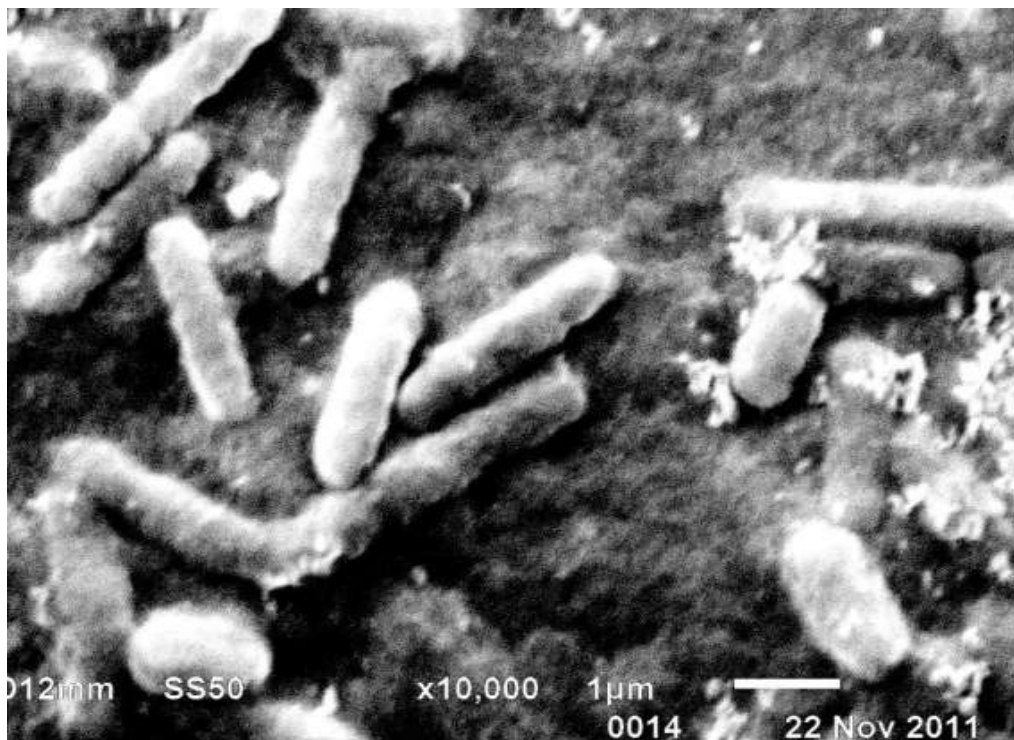


Figure 01. Micrographie électronique à balayage montrant des cellules d'*E. Chrysanthemi* avec tige droite (Bhupendra et Yogendra ,2014).

II.1.1 Systématique

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Entrobacterales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Dickeya.</i>
Espèce	<i>Dickeya dadantii / Erwinia chrysanthemi</i>

II.1.2 La répartition

Selon l'OEPP : *E. chrysanthemi* se rencontre dans le monde entier. Toutes les formes se rencontrent, même dans les pays tempérés, où des plantes-hôtes sont cultivées sous abri aussi bien qu'en plein champ.

II.2 Pathogénicité d'*Erwinia chrysanthemi*

II.2.1 Aspects généraux de la pathogénie

Elle peut infecter de multiples plantes, mono ou dicotylédones comme la pomme de terre, l'endive, la pastèque, le concombre, le riz, le maïs ou le chrysanthème. C'est une bactérie pectinolytique provoquant la macération des tissus végétaux par dégradation de la pectine ([Rapport OEPP, 2010](#)). Les bactéries se logent dans les blessures ou les lenticelles de la plante hôte où elles peuvent rester en latence. Elles peuvent également survivre dans le sol pour infecter la culture de la compagne suivante.

Une fois la bactérie est installée dans la plante hôte, elle met en jeu une panoplie de moyens et de mécanismes appelés déterminants du pouvoir pathogène : pectinases, cellulases et protéases et des facteurs secondaires, qui provoquent la rupture de la structure de la paroi cellulaire et libèrent les éléments nutritifs nécessaires pour la croissance bactérienne.

II.2.2 Mécanisme de la pathologie

Premièrement, la bactérie synthétise des enzymes pectinolytiques (EP), principalement des pectates lyases et des polygalacturonases ([McMillan et al., 1993](#)), qui vont dépolymériser la pectine des parois cellulaires des tissus de la pomme de terre.

Les oligogalacturonates (OGS) résultant de cette dépolymérisation sont absorbés par la bactérie et dégradés en 5-keto-4-deoxyuronate (DKI), 2,5-diketo-3-deoxy-gluconate (DKII) ainsi qu'en acide galacturonique (AG) par l'action des oligogalacturonides lyases (Figure 2). Les DKI, DKII ainsi que d'autres composés résultant de la dégradation des parois cellulaires vont entraîner une réaction en chaîne aboutissant à une augmentation de la production d'EP et ainsi, accroître la virulence de la bactérie (Yang *et al.*, 1992). Les OGS résultant de la dégradation de la pectine par les EP vont induire des mécanismes de résistance chez la plante contre ces attaques tels que la production d'inhibiteurs de protéases (IP) et autres phytoalexines (Weber *et al.*, 1996).

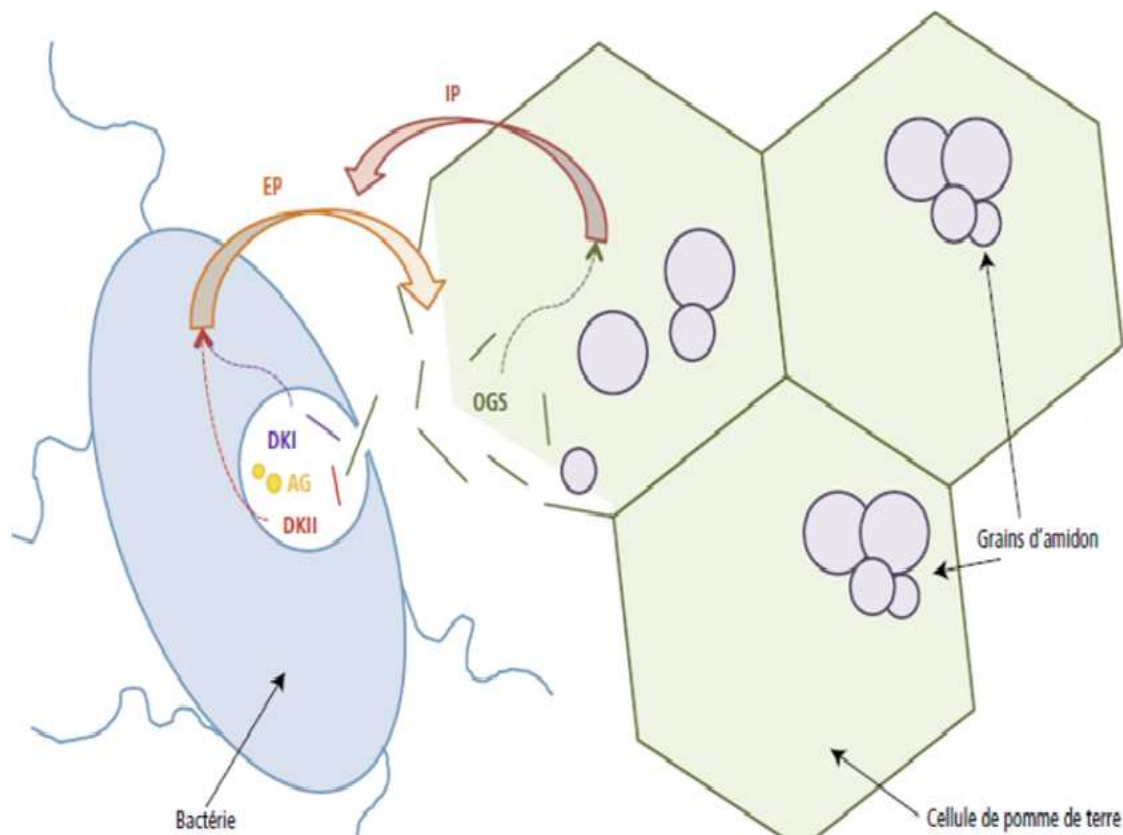


Figure 02. Représentation schématique des mécanismes mis en œuvre lors de l'attaque des tissus de la pomme de terre par *Dickeya* spp.

II.2.3 Les enzymes dégradatives

II.2.3.1 Des enzymes pectinolytiques

La dé-estérification et la dépolymérisation intégrale de la pectine sont amorcées par des enzymes extracellulaires. Les produits de dégradation, tri- ou digalacturonates sont acheminés vers le cytoplasme où ils sont entièrement dégradés en pyruvate et 3-phosphoglyceraldéhyde qui rentreront dans le cycle de l'acide citrique. L'ensemble de

ces processus requiert deux grands groupes d'enzymes : **les pectines estérases** et **les dépolymérase**s (Mathilde Lallemand, 2010).

↳ **Les pectines estérases** : Permettent la dé-estérification de la pectine en hydrolysant les groupements méthyles ce qui donne des polygalacturonates (PGA) et du méthanol ou des groupements acétyles (acide acétique). On distingue donc **les pectines méthyl-estérases** et **les pectines acétyl-estérases**. Il a été montré que la croissance d'*Erwinia chrysanthemi* est fortement ralentie lorsqu'une pectine très fortement estérifiée est la seule source de carbone (Shevchik *et al.*, 1996). La dé-estérification semble donc être une condition préalable à la dégradation complète de la pectine.

↳ **Les dépolymérase**s

Regroupent trois types d'enzymes :

- **Les pectates lyases** : clivent par β -élimination les liaisons glycosidiques des polymères pectiques, généralement des polygalacturonates est génèrent des oligogalacturonates planaires avec une double liaison entre C-4 et C-5 à l'extrémité non réductrice.
- **Les pectines lyases** : clivent par β -élimination des polymères hautement ou moyennement méthylés.
- **Les polygalacturonases** : clivent les liaisons glycosidiques des polygalacturonates par hydrolyse et génèrent généralement des oligogalacturonates (Tardy *et al.* 1997).

II.2.3.2 Enzymes non pectinolytiques

↳ **Cellulase**

La dégradation complète de la cellulose dans la matrice polysaccharidique des parois cellulaires requiert différentes hydrolases comme les endoglucanases cellulolytiques et les cellobioses (An *et al.*, 2005). L'importance des cellulases dans la virulence des bactéries phytopathogènes varie selon les espèces. L'activité cellulasique chez les *Erwinia* pectinolytiques reste restreinte. Cependant, des mutants défectifs dans la production de cellulases montrent clairement une virulence réduite sur tabac et sur pommes de terre. La digestion des parois cellulaires facilite la pénétration des tissus végétaux, ainsi que leur dégradation par les enzymes pectinolytiques, et permet la libération des composants de ces parois qui seront utilisés par les bactéries pour leurs besoins nutritifs (Mae *et al.*, 1995).

↳ Protéases

Les espèces et sous-espèces d'*Erwinia* pectinolytiques sécrètent de grandes quantités de protéases qui facilitent la dégradation des parois cellulaires végétales, des membranes cytoplasmiques et des protéines cytosoliques. En outre, des protéases purifiées d'*Ecc* peuvent induire une mort cellulaire limitée sur certains hôtes. La libération d'acides aminés et de fractions peptidiques permet d'accroître le taux de croissance bactérienne, augmentant ainsi la capacité de colonisation du pathogène (Kyöstiö *et al.*, 1991).

II.3 Source de contamination

II.3.1 Les tubercules

Les bactéries peuvent être localisées dans le système vasculaire, les lenticelles ou à la surface des tubercules (Nielsen, 1978 ; Pérombelon, 2000). Les blessures occasionnées lors de la manipulation des tubercules (plantation, récolte, tri) constituent autant de portes d'entrée qui permettent la pénétration de *Pectobacterium* et *Dickeya* (Pérombelon et Kelman, 1980 ; Van Vuurn *et al.*, 1994). Ce type de contamination se produit principalement lors du contact de tubercules sains avec des tubercules malades (Elphinstone et Pérombelon, 1986a).

Elles envahissent alors la rhizosphère des plantes et infectent les tubercules fils. La contamination des tubercules fils peut également se produire *via* les stolons susceptibles de transmettre les bactéries au travers le système vasculaire (Hélias *et al.*, 2000b).

II.3.2 Rôle du sol et de la rhizosphère

Les études menées par Van Dear Wolf *et al.* (2007) montrent, quant à elles, que les *Dickeya* spp. Ne survivent pas plus de trois semaines dans un sol nu.

Plusieurs études ont rapporté que la présence des *Dickeya* et *Pectobacterium* dans le sol et la rhizosphère était liée à la disponibilité des nutriments provenant de la dégradation des débris végétaux et des exsudats racinaires des plantes hôtes. En effet, la viabilité de ces microorganismes diminue fortement dès qu'ils se retrouvent dissociés des tissus de leurs plantes hôtes (Hélias, 2008).

II.3.3 Matériel agricole

La plantation, la récolte et le tri mécanique des tubercules peuvent également être la cause de la propagation des pathogènes entre les lots de pomme de terre et au sein des stocks. Un défaut de désinfection du matériel ainsi que les blessures occasionnées sur

les grilles des trieuses lors de la manipulation des tubercules lors de la plantation ou après récoltes (Elphinstone et Pérombelon, 1986a).

Pérombelon et kelman, (1980) note que le lavage des tubercules avant leur commercialisation peut également disséminer la bactérie dans les lots de pomme de terre lorsque l'eau servant au lavage n'est pas renouvelée ou décontaminée.

II.3.4 Les insectes

Harrison et al, (1977) et Bedin, (1988) montrent que les insectes tels que les diptères et notamment les drosophiles sont également citées comme sources de contamination suite à leur passage d'une plante infectée à une plante saine.

La propagation des *Pectobacterium* et *Dickeya* peut aussi impliquer des insectes (Basset et al., 2000) et les nématodes (Perombelon et Kelman, 1980 ; Czajkowski et al., 2011). Récemment, une étude a mis en évidence la capacité des *Pectobacterium* et *Dickeya* spp à adhérer et coloniser le système digestif de *Caenorhabditis elegans* suggérant une association de mutualisme favorisant la dissémination de ces pathogènes (Nykyri et al., 2014).

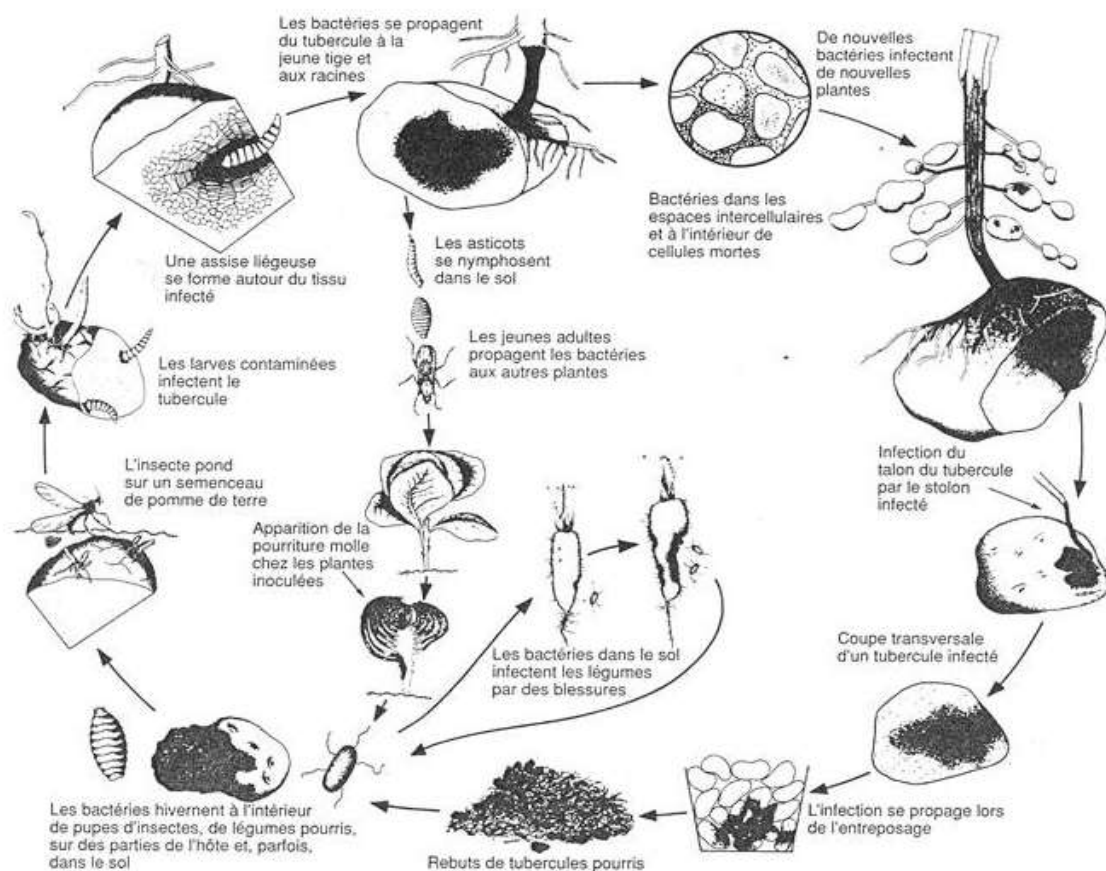


Figure 03. Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne (Agrios, 2005).

II.4 Symptômes

Après la pénétration d'*E.ch*; la plante hôtes par les différents points d'entrée et avec la présence des conditions favorable les bactéries colonisent d'abord les vaisseaux du xylème de la plante et se multiplient par la suite dans les espaces intercellulaires de l'hôte en sécrétant une série de pectinases qui dégradent la paroi mitoyenne des cellules et déstabilisent le parenchyme provoquant ainsi la macération des tissus. Ces phénomènes interrompent le transport de l'eau et des éléments minéraux, vers le sommet de la plante, tout en provoquant des symptômes de flétrissement et de jaunissement du feuillage (Hélias *et al.*, 2000a).

Selon Perombelon et Salmadon, (1995), les attaques précoces de la bactérie au champ peuvent faire pourrir les tubercules-mères et provoquent des pertes à la levée ou fonte de semis.

Au stade plante, les premiers symptômes apparaissent sous forme d'un feuillage vert pâle ou jaunâtre suivis d'un rabougrissement de la plante. Puis la maladie peut se manifester sous forme d'une nécrose humide sur les tiges qui prennent alors une couleur noire d'où le nom de maladie de la jambe noire (Hélias, 2008).



Figure 4. Symptômes de la jambe noire sur la partie aérienne du plant de pomme de terre **A** : flétrissement et jaunissement. **B** : pourriture mole de tige. **C** : nécrose sur tige. (Hélias, 2008).

Les symptômes observés sur tubercules se caractérisent par des pourritures molles. Se manifestent par l'apparition de petites taches diffuses, d'aspect huileux autour des lenticelles. Ces nécroses sont de couleur marron avec un point noir foncé au centre. Les bactéries se répandent ensuite dans le tubercule en passant par les tissus vasculaires. Puis, les tissus sous-épidermiques se dépriment, deviennent spongieux, brunissent et se crevassent provoquant ainsi une pourriture molle (Yahiaoui-Zaidi, 2004).



Figure 5. Pourriture molle et humide Causée par *Dickeya* spp.

II.5 Identification de la maladie

Les pourritures molles et dépérissements n'étant pas des symptômes spécifiques à *E. chrysanthemi*, il faut vérifier l'identité du pathogène. Les infections latentes peuvent être détectées sur des tubercules ou sur des boutures. Un milieu pectique sélectif a été mis au point pour la détection spécifique d'*Erwinia* pectolytiques (van Vuurde et Roozen, 1990).

Pour distinguer les espèces il faut une caractérisation plus fine. La tolérance à la température et à l'érythromycine est utilisée pour une isolation différentielle directe (Pérombelon et Hyman, 1986). Mais cela demande une expérimentation très soignée (Janse et Spit, 1989).

Des tests ELISA et des antisérums sont disponibles dans le commerce pour la détection d'*E.chrysanthemi*. Les anticorps sont souvent destinés au séro-groupe-O 1, et ne reconnaissent que 68% des souches (Samson *et al.*, 1990).

II.6 La lutte

II.6.1 Pratiques culturales et sanitaires

- Utilisation de matériel axénique et d'équipement agricole propre ;
- Maintien d'une aération adéquate et de températures de stockage moins de 10°C.
- Subérisation des blessures après tranchage des semences (Yaganza, 2005).
- Assurance d'un bon espacement des plants au champ, d'une bonne régie D'entreposage et pratique de rotations culturales ;
- Effectuer les récoltes à des températures inférieures à 20°C et par temps sec ;
- Respect d'un délai de 3 à 4 semaines entre le défanage et la récolte, afin de laisser durcir l'épiderme et de laisser se fermer les lenticelles (Dupuis *et al.*, 2005).

II.6.2 Lutte chimique

En plus des mesures prophylactiques, les agriculteurs, ont parfois recours à l'utilisation de produits chimiques peu efficaces et extrêmement dommageables pour l'environnement. Ces produits chimiques sont à base de cuivre (Rousselle *et al.*, 1996). Et ils sont fortement déconseillés et interdits ou en cours d'interdiction dans plusieurs pays (Ordax *et al.*, 2006).

Mills *et al.*, (2006) ont montré, par des essais in planta, que plusieurs composés chimiques tels que l'acétate d'aluminium et le benzoate de sodium ont une efficacité significative contre le développement de la pourriture molle sur les tubercules de pomme de terre au moment du stockage.

Bien que ces composés chimiques soient très importants et plus ou moins prometteur vu leur large spectre d'hôtes mais, leur application reste limiter à cause des dommages environnementaux et des risques écologiques et sanitaires que peuvent engendrer. En plus, de la résistance que ces bactéries peuvent développer pour en faire face (Latour *et al.*, 2008).

II.6.3 Lutte biologique

Les mécanismes par lesquels les agents de la lutte biologique bactérien (contrôle microbiologique) peuvent prodiguer leur effet protecteur sont multiples et peuvent varier pour un microorganisme donné en fonction du pathosystème (couple hôte végétal/pathogène) sur lequel il est appliqué. Cependant, d'un point de vue globale, leur effet bénéfique qui conduit à un antagonisme se fonde sur certains phénomènes qui sont : l'antibiose, la compétition et la prédation ou parasitisme (Compant *et al.*, 2005).

Le pré-requis à toute efficacité biologique d'une souche donnée est son potentiel à coloniser efficacement le système racinaire et la couche environnante du sol appelée rhizosphère. Cela signifie s'imposer par rapport aux autres populations microbiennes et persister en utilisant les faibles ressources nutritionnelles disponibles dans le micro environnement. Plusieurs propriétés intrinsèques contribuent au pouvoir colonisateur telles que la mobilité, la faible exigence nutritionnelle, et la vitesse de croissance (Van Den Broek *et al.*, 2003).

II.6.4 La lutte génétique

L'organisation génétique de la résistance étudiée en détail par Gebhardt et Valkonen (2001) : les 19 gènes de résistance dominants, identifiés grâce à des marqueurs ADN, ont trait à la résistance aux virus, nématodes et champignons. Ce constat a amené certains généticiens à proposer d'autres voies de sélection. L'une d'elles passe par la création de variétés transgéniques, c'est-à-dire de pomme de terre ayant intégré un ou plusieurs gènes issus d'une autre espèce microbienne, végétale ou animale. L'une des premières constructions réalisées a consisté à intégrer dans le génome de la pomme de terre un gène originaire d'un bactériophage codant pour la production de lysozyme qui dégrade la membrane de certaines bactéries. L'action du lysozyme n'étant pas spécifique de la paroi bactérienne de l'espèce *P. atrosepticum*, il existe un risque environnemental similaire à celui évoqué précédemment pour d'autres molécules antibactériennes à large spectre d'hôtes (Latour *et al.*, 2008).

Chapitre 02:

Les composés phénoliques et la shikimate kinase

I. Les composés phénoliques

I.1 Généralité

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Harbone,1994). La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques auxquels sont directement liés un ou plusieurs groupement hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester) (Hatono *et al.*, 1989).

Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques on suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme d'acide rosmarinique, sont fortement avoir des propriétés antivirales (Iserin, 2001).

I.2 Classification des composés phénoliques

Ils sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins (Cheynier,2005).

Tableau 01. Les principales classes des composés phénoliques (Cheynier,2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C6	Phénols simple	Catéchol	
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamique Coumarines	Acide caféique, acide férulique Scopolétine, esculétine	Pomme de terre, pomme Citrus
C6-C2-C6	Silènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoïdes • Flavonols • Anthocyanes • Flavanones • Isoflavonols 	Kamphérol,quercétine Cyanidine,prélargonidine Naringénine Daidzéine	Fruits,légumes,fleurs Fleurs,fruits rouges Citrus Soja
(C6-C3)2	Lignanes	Pinorésinol	Pin

I.3 Biosynthèse des composés phénoliques

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues. Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux (Sarni-manchado et Cheyner, 2006). Ces composés sont issus par deux grandes voies métaboliques (Kening *et al.*, 1995).

I.3.1 La voie de shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Kening *et al.*, 1995).

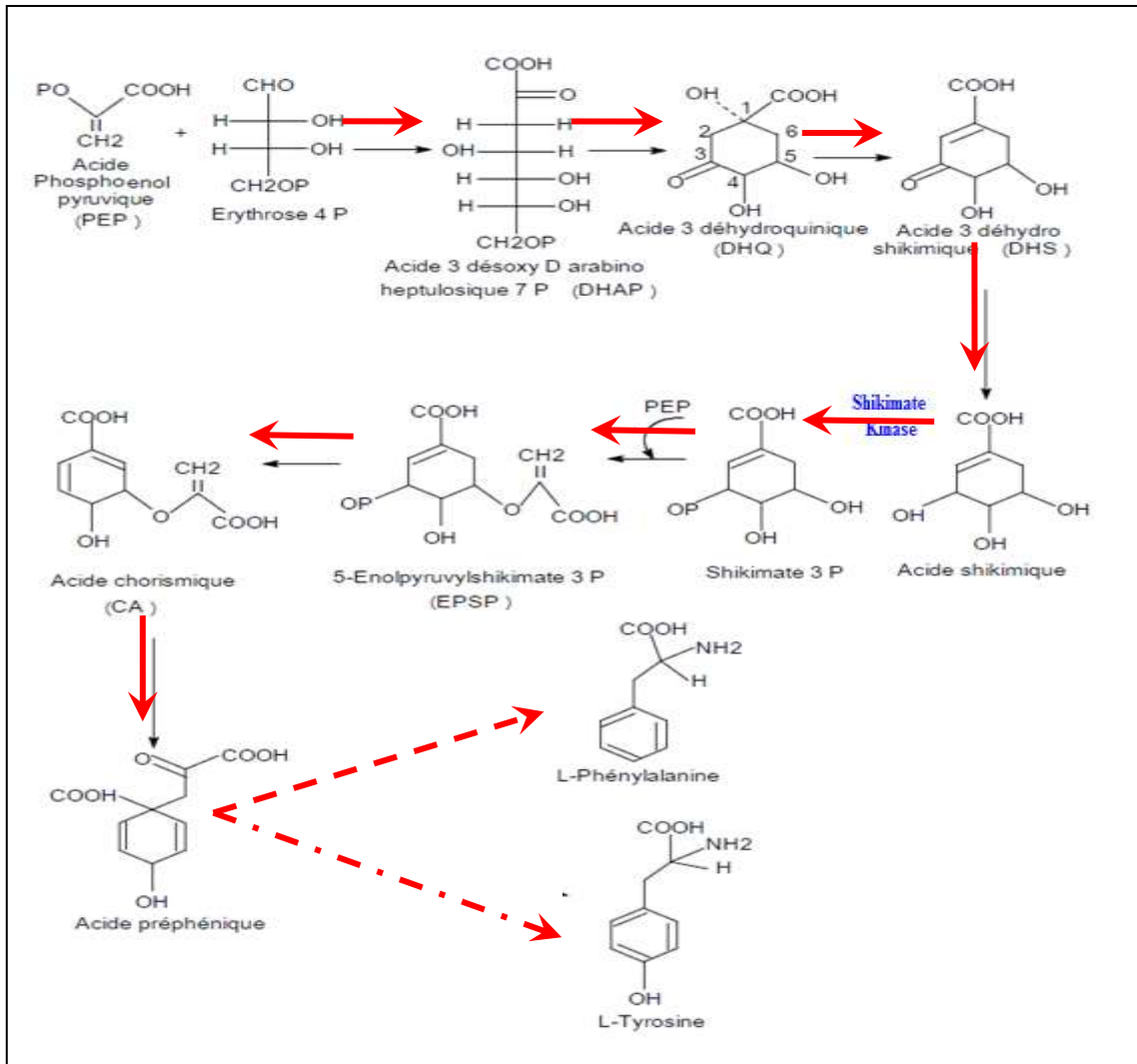


Figure 06. La voie de shikimate (Floss,1997).

I.3.1.1 La Shikimate Kinase

I.3.1.1.1 Définition

La shikimate kinase (SK) est une phosphotransférase qui intervient à la cinquième étape de la voie du shikimate de biosynthèse des acides aminés aromatiques.

La shikimate kinase catalyse la réaction suivante :



I.3.1.1.2 Description structurale de la shikimate kinase

La Shikimate kinase appartient à la famille des kinases nucléosidiques monophosphates (NMP). Le cœur de sa structure (Fig 07, code PDB : 2SHK, résolution 2,60 Å) est composé de cinq feuillets β parallèles entourée de huit hélices α .

La Shikimate kinase se compose de trois domaines: (1) le domaine CORE contenant les cinq feuilles β parallèles et la boucle P (résidus 9 – 17), qui forme le site de liaison des nucléotides; (2) le domaine LID (résidus Gly112 à Asp124), qui se ferme sur le site actif et a des résidus qui sont essentiels pour la liaison de l'ATP; (3) le domaine de liaison au substrat (SB) (résidus Thr33 à Glu61), qui fonctionne pour reconnaître et lier le Shikimate.

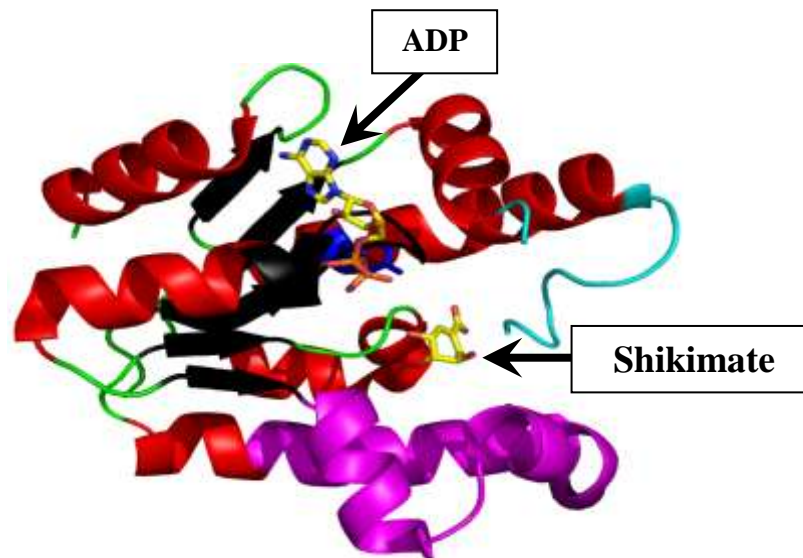


Figure 07. Modèle tridimensionnel de la Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis*, le **domaine CORE** en noir, le **domaine LID** en bleu ciel, et le **domaine de liaison au substrat (SB)** en violet, (code pdb : 2DFN). Les substrats co-cristallisés (ADP et Shikimate) sont démontrés en sticks (les atomes de carbones colorés en jaune. Image générée par Pymol.

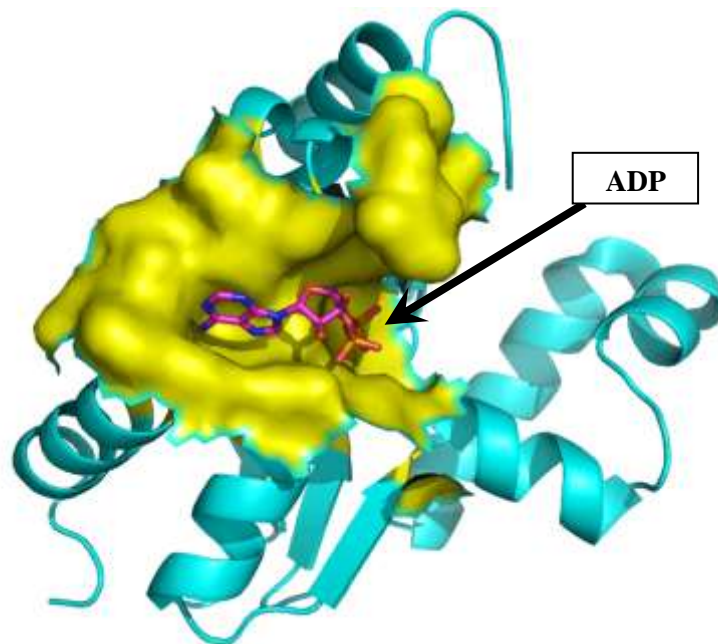


Figure 8. Modèle tridimensionnel de la Shikimate kinase chez *Erwinia chrysanthemi*, avec le site catalytique marqué (la région jaune). (Code PDB 2SHK). Le substrat co-cristallisé (ADP) est démontrés en sticks (les atomes de carbones colorés en rose. Image générée par Pymol.

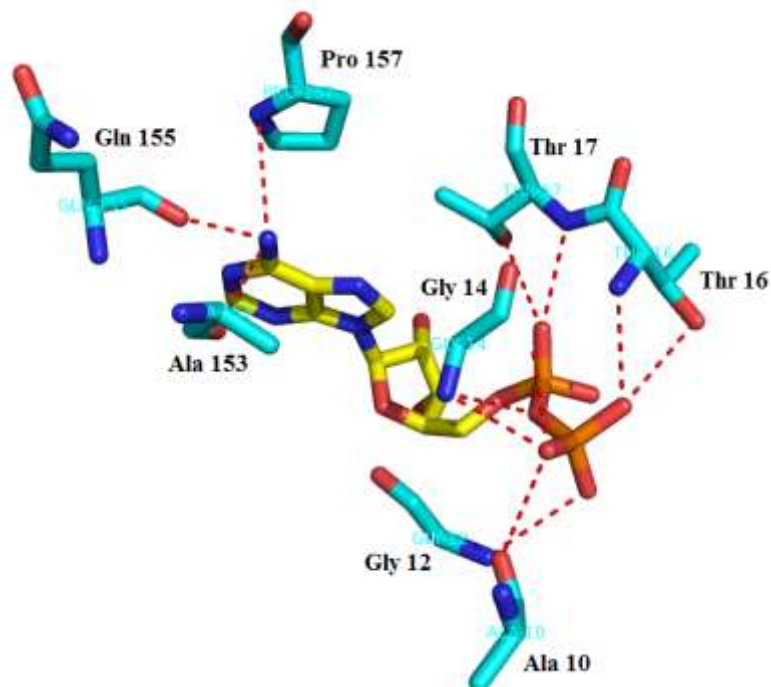


Figure 9. Mode de liaison de la ADP avec le site actif de Shikimate kinase chez *Erwinia chrysanthemi* (code pdb : 2SHK). Les résidus entourant le site actif sont démontrés en bleu ciel. Image générée par Pymol.

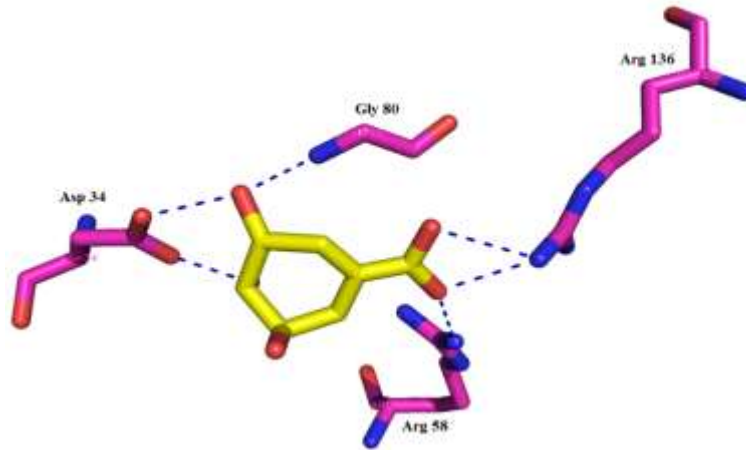


Figure 10. Mode de liaison de la shikimate avec le site actif de **Shikimate kinase** chez *Mycobacterium tuberculosis* (code pdb 2DFN). Les résidus entourant le site actif sont démontrés en rose. Image générée par Pymol.

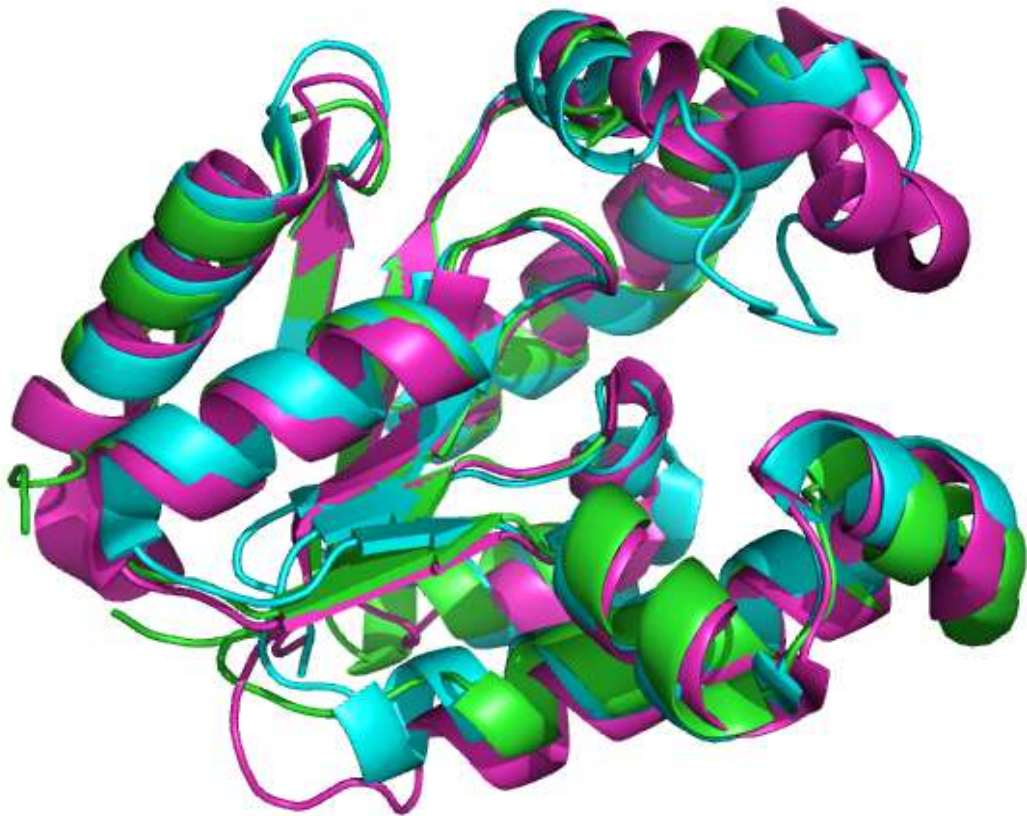


Figure 11. Superposition des structures des shikimate kinase (*Erwinia chrysanthemi* en vert code pdb : 2SHK, *Mycobacterium tuberculosis* en rose code pdb : 2DFN, *Helicobacter pylori* en bleu ciel code pdb : 3N2E).

I.3.2 La voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Zaghdad,2009).

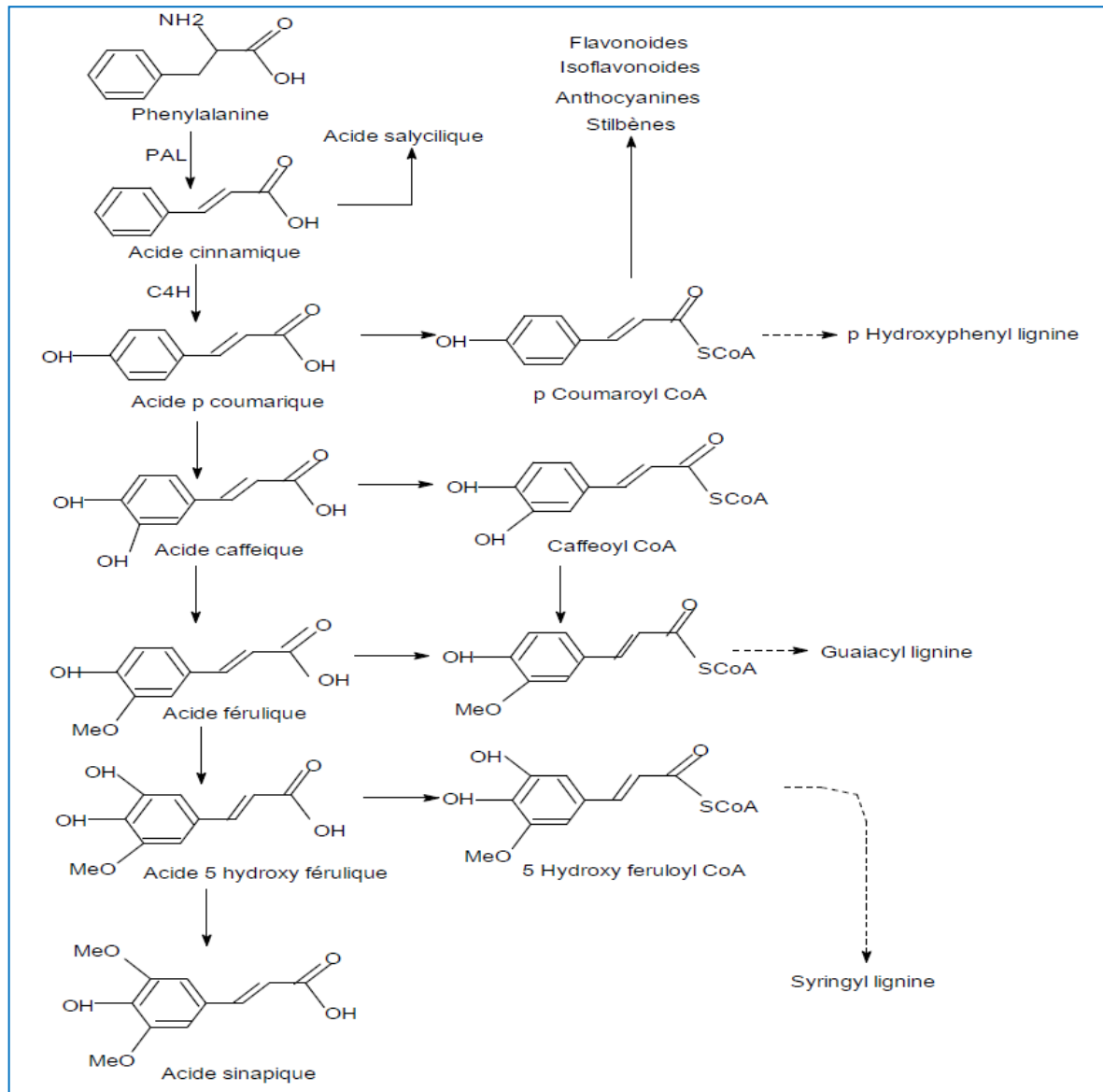


Figure 12. La voie de phénylpropanoïde (Hoffmann *et al.*, 2004).

I.4 Les flavonoïdes

I.4.1 Définition

Le terme flavonoïde (de flavus, « jaune » en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Bouakaz, 2006). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Havasteen, 2002).

I.4.2 Structure des flavonoïdes

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone qui fait de deux cycles phényles C₆, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Ce dernier est situé entre les cycles A et B et est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle centrale). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (Figure ci-dessous) (Bruneton, 1999). La Distinction des sous-classes se fait sur la conformation de la structure centrale (cycle C).

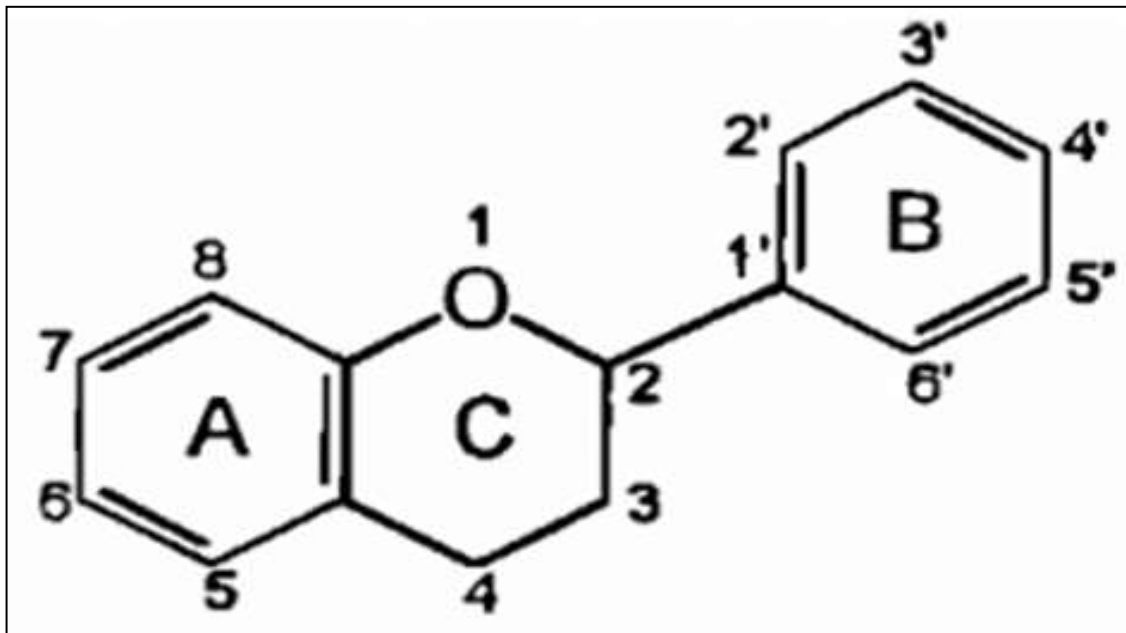
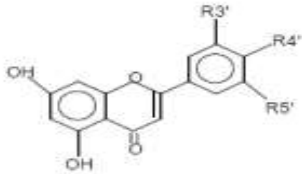
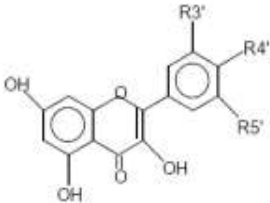
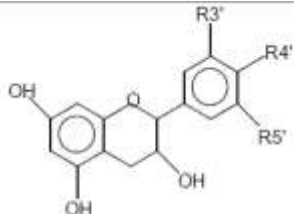
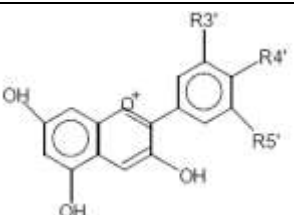
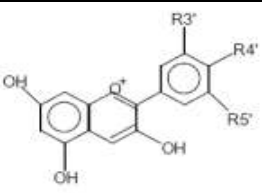
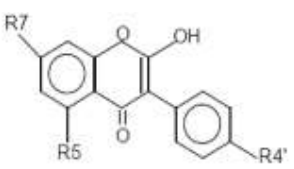


Figure 13. Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C.

I.4.3 Classification des flavonoïdes

Tableau 02. Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al*, 2001 ; W- Erdman *et al*, 2007).

Classes	Structures chimiques	R3	R4	R5	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavonones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictylo
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-GLU	OH	Daidezine

I.4.4 Localisation

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (Piquemal, 2008), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (Boudet, 2000). Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (Verhoeyen *et al.*, 2002).

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Lahouel, 2005 ; Piquemal, 2008 cité in Imad et Adel ; 2017).

I.4.5 Fonctions des flavonoïdes pour les plantes

Les plantes étant immobiles, elles ont dû mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement et conserver leur forme. La dureté au gel et la résistance à la sécheresse sont parfois attribuées aux flavonoïdes et autres composés phénoliques. Il semblerait notamment que les flavonoïdes antioxydants ont un effet protecteur contre le stress attribué à la sécheresse. Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium. Ils jouent un rôle important dans la protection contre les UV en absorbant les radiations UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles. Les flavonoïdes sont de puissants piègeurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et préviennent ainsi la peroxydation des lipides (Treutter, 2005).

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (Grayer *et al.*, 1994).

Chapitre 03:

Le Docking Moléculaire

I. Généralité

De façon générale, le but du docking est de prédire la structure du complexe formé par un ligand et son récepteur. Plus particulièrement, dans les travaux présentés ici, les ligands sont des petites molécules destinées à inhiber l'activité d'une protéine, qui constitue le récepteur.

Historiquement, les premiers outils de docking obéissaient au principe dit « lock-and key » (principe « clef-serrure ») selon lequel le ligand qui représente la clef, est complémentaire au niveau géométrique du site actif du récepteur, qui représente la serrure (Elkaim, 2011).

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques. Connaître la façon dont les protéines interagissent avec d'autres entités biochimiques est une étape essentielle pour comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées.

Le docking moléculaire est l'étude *in silico* des différents mécanismes et interactions qui interviennent lorsque plusieurs structures moléculaires s'assemblent, l'objectif étant de parvenir à déterminer comment ces molécules vont s'agencer les unes par rapport aux autres. Il existe deux grands types de docking moléculaire. Le docking rigide consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système protéine-ligand en considérant que chacune des deux molécules conserve une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte. Cependant, il est tout à fait concevable que les structures de la protéine et du ligand soient modifiées durant le processus de docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités. On parle, dans ce cas, de docking flexible (Teniou, 2012).

II. Programmes du docking les plus cités

Plus de 30 logiciels de docking sont actuellement disponibles. Les trois les plus fréquemment cités pèsent 53 % du total de citations trouvées dans la littérature sont : AutoDock (27 %), GOLD (15 %), FlexX (11 %) (Sousa *et al.*, 2006).

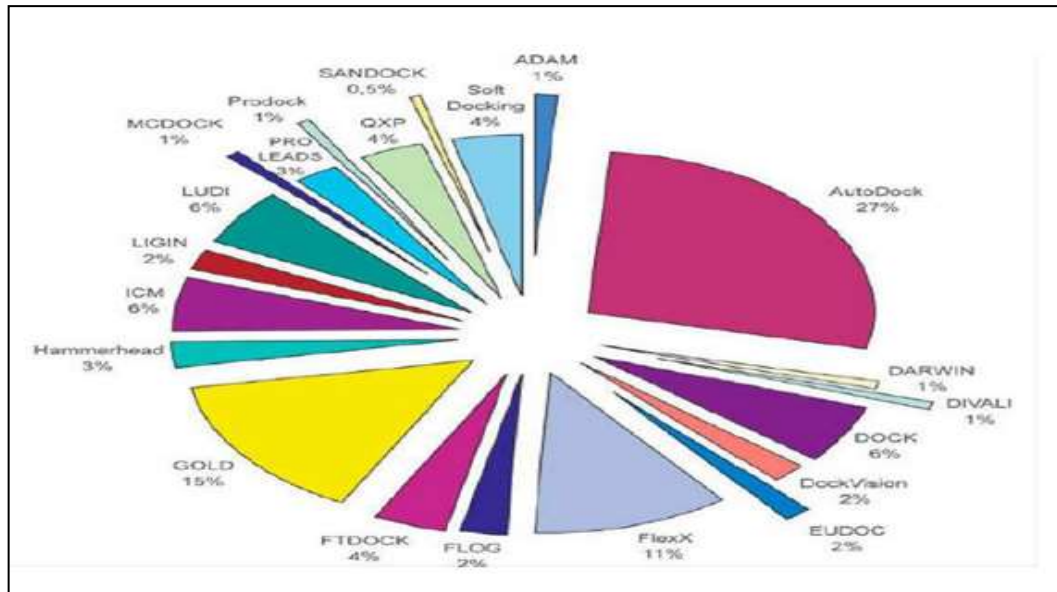


Figure 14. Comparaison du programmes de docking les plus cités (Sousa et al., 2006).

Tableau 03. Principaux programmes de docking moléculaire (Taylor et al., 2003).

Nom	Editeur	Site Internet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.htm

II.1 Principe théorique

Docking (ancrage ou amarrage en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interactions entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire (cible de docking) dont la structure tridimensionnelle est connue et d'une petite molécule (ligand). Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine. Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring.

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

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

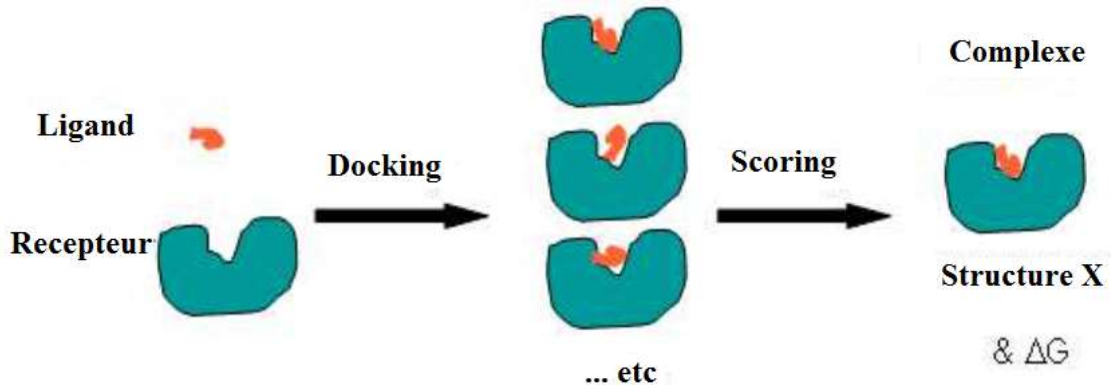


Figure 15. Principe générale d'un programme de docking.

II.2 Protocole Générale de Docking

Les approches utilisées actuellement sont exclusivement calculatoires et évaluées par des outils de visualisation. Ces approches peuvent être décomposées en quatre à cinq phases successives (figure 16) :

- 1- Choix du mode de représentation des protéines (tout atome, pseudo-atome, grille, etc),

- 2- Exploration conformationnelle (corps-rigide position/orientation du ligand et/ou flexible position/orientation/forme du ligand),
- 3- Minimisation de la fonction d'évaluation de l'énergie d'interaction (ou fonction de score) des conformations issues de l'exploration,
- 4- Regroupement par ressemblances et classification par évaluation plus fine du score, accompagnée d'une étape non automatique d'évaluation visuelle des résultats lorsque le score ne permet pas de discriminer la conformation native des différentes conformations générées.
- 5- Une étape optionnelle d'affinement des complexes sélectionnés par minimisation ou dynamique moléculaire.
- 6- Un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de modes de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison.

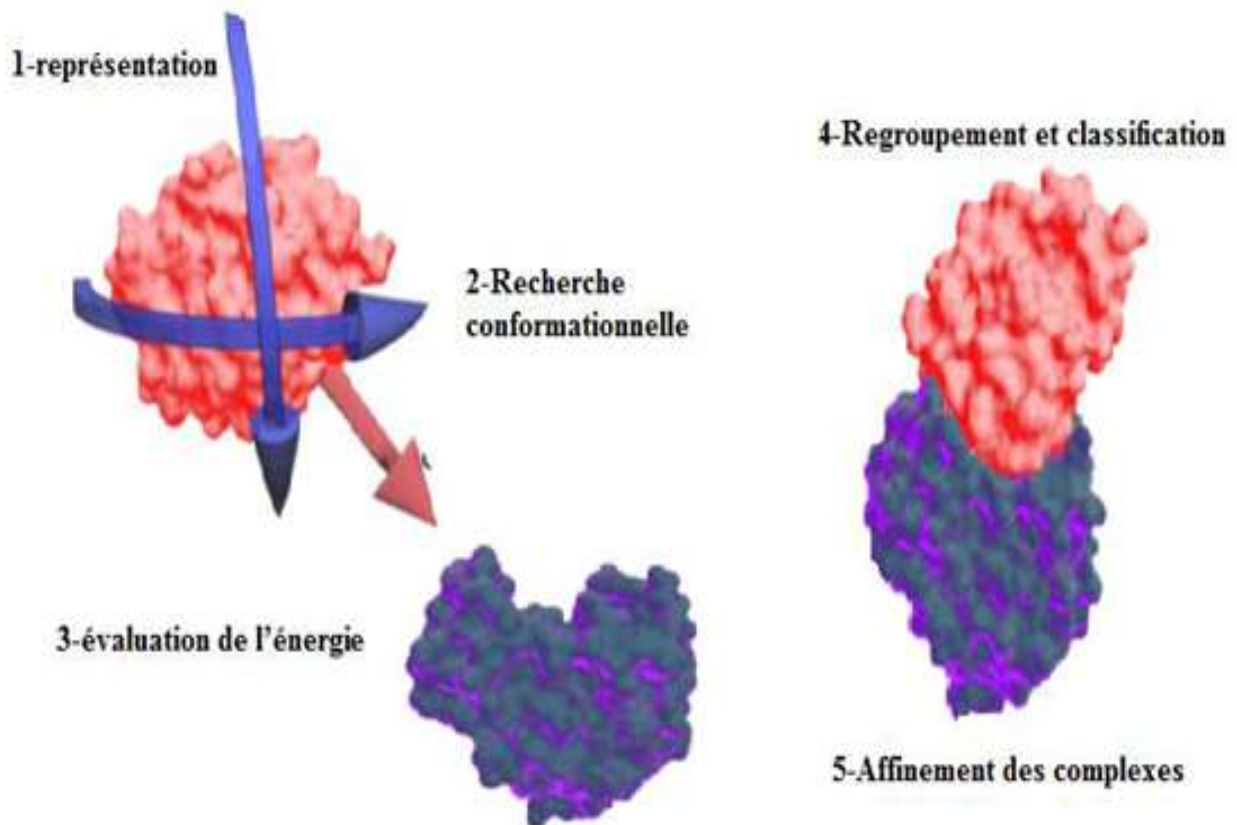


Figure 16. Protocole général de docking (Férey *et al.*, 2008).

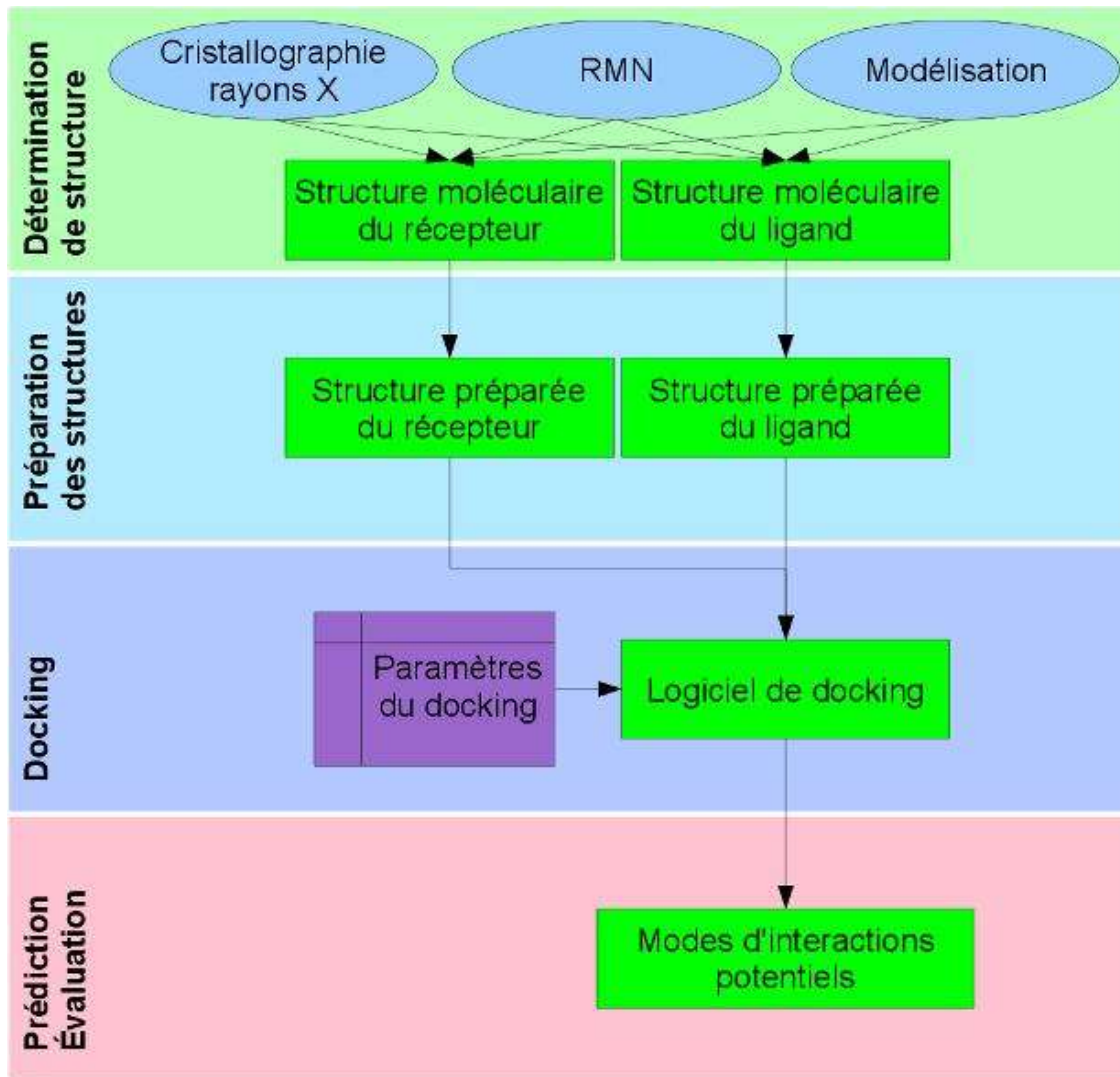


Figure 17. Les étapes typiques d'un docking.

III. Le programme GOLD

Le programme GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) est l'un des programmes de docking les plus réussis et largement utilisés, provient d'une collaboration entre l'Université de Sheffield, GlaxoSmithKline plc et CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*). Il est basé sur trois parties majeures : un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de modes de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison.

III.1 Algorithme de GOLD

GOLD utilise un algorithme génétique pour le docking de petites molécules (ligand) dans le site actif d'une protéine. Il considère le ligand comme flexible alors que la protéine est maintenue fixe sauf pour les groupements hydroxyles de certains résidus à savoir Tyrosine, Serine et Thréonine.

L'algorithme génétique est basé sur le principe de la sélection naturelle, développé par *Charles Darwin* en 1838. Les algorithmes génétiques fonctionnent par une génération successive d'individus ou structures du ligand. Chaque individu possède des gènes se sont ses caractéristiques. La méthode comporte trois phases : reproduction, *crossover*, mutation. La phase de reproduction vise à identifier les individus pouvant donner une autre génération.

Pour la première génération les éléments sont créés au hasard pour éviter la dépendance vis à vis de la structure de départ. Pour les générations suivantes elles sont composées des meilleurs éléments de la génération précédente sélectionnés par une fonction d'évaluation. Dans notre cas il s'agit souvent d'une fonction basée sur la Fitness. Durant la phase de *crossover*, les gènes des individus sélectionnés sont échangés 2 à 2 pour créer la nouvelle génération, le lieu de croisement est déterminé au hasard. La troisième étape est la mutation, certains individus peuvent être le résultat de mutations où un gène est modifié de façon aléatoire. Le cycle de génération est répété jusqu'à ce que soit atteint le nombre maximum de générations ou le nombre maximum d'évaluations de l'énergie.

III.2 Le mécanisme du placement du ligand dans le site actif

GOLD utilise une méthode unique pour ce faire, qui est fondée sur les points de fixation, il ajoute des points de fixation aux groupements de liaisons hydrogènes sur la protéine et le ligand, puis il va cartographier les points accepteurs qui se trouvent dans le ligand sur les points donateurs dans la protéine et vice versa. En outre, GOLD génère des points de fixation hydrophobiques dans la cavité de la protéine sur laquelle les groupements CH du ligand sont mappés.

III.3 La fonction de score

GOLD utilise différentes fonctions de score pour le processus d'optimisation : **GoldScore** (une fonction de score basée sur le champ de force), **ChemScore**, **ASP** (Astex Statistical Potential), **CHEM PLP** (Piecewise Linear Potential) et **User Defined Score**.

Cependant, Goldscore est la fonction originale pour GOLD, issue des travaux de Willet. Cette fonction est la somme de quatre éléments :

$$\text{GOLD Fitness} = Shb_ext + Svdw_ext + Shb_int + Svdw_int$$

- **Shb_ext** : est l'énergie de liaison hydrogène entre le récepteur et le ligand.
- **Svdw_ext** : est l'énergie des forces de Van der Waals (vdw) entre le récepteur et le ligand.
- **Shb_int** : est l'énergie de liaison hydrogène interne du ligand.
- **Svdw_int** : est le résultat de la contrainte intramoléculaire dans le ligand.

Les méthodes de « *scoring* » permettent d'évaluer l'énergie de liaison du complexe formé et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra d'une part de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées, mais également de classer la meilleure pose de différents ligands pour identifier les meilleurs d'entre eux. Dans les programmes de docking, on trouve différents types de fonction de score : celles utilisant un champ de force de mécanique moléculaire, celles reposant sur les connaissances actuelles et les méthodes empiriques.

Chapitre 04:

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1 Microordinateur

Dans notre étude, nous avons utilisé une station puissante (processeur Intel Core I7 2.8 GHz, 8 Go de RAM, plateforme: Windows7). Les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7 (64bits).

I.2 Programmes

I.2.1 PyMOL

PyMOL est un logiciel de visualisation moléculaire, créé par Warren Delano. En plus d'offrir de nombreuses possibilités de rendus en 3D, le logiciel PyMOL permet de réaliser des animations, des alignements de structure, de générer des structures, etc.... Il est l'un des outils le plus utilisé dans la publication scientifique. Il s'agit d'un logiciel libre et gratuit (Jérôme, 2014).

La fenêtre inférieure contient également " la fenêtre de visualisation." Ce contiendra une liste des objets moléculaires une fois que tu as chargé une structure de protéine. C'est dans cette fenêtre que la majorité du travail s'effectue. Elle permet de visualiser les différents Objets, de modifier les styles de visualisation, de réaliser des sélections, La partie principale de L'écran sert à visualiser les molécules chargées.

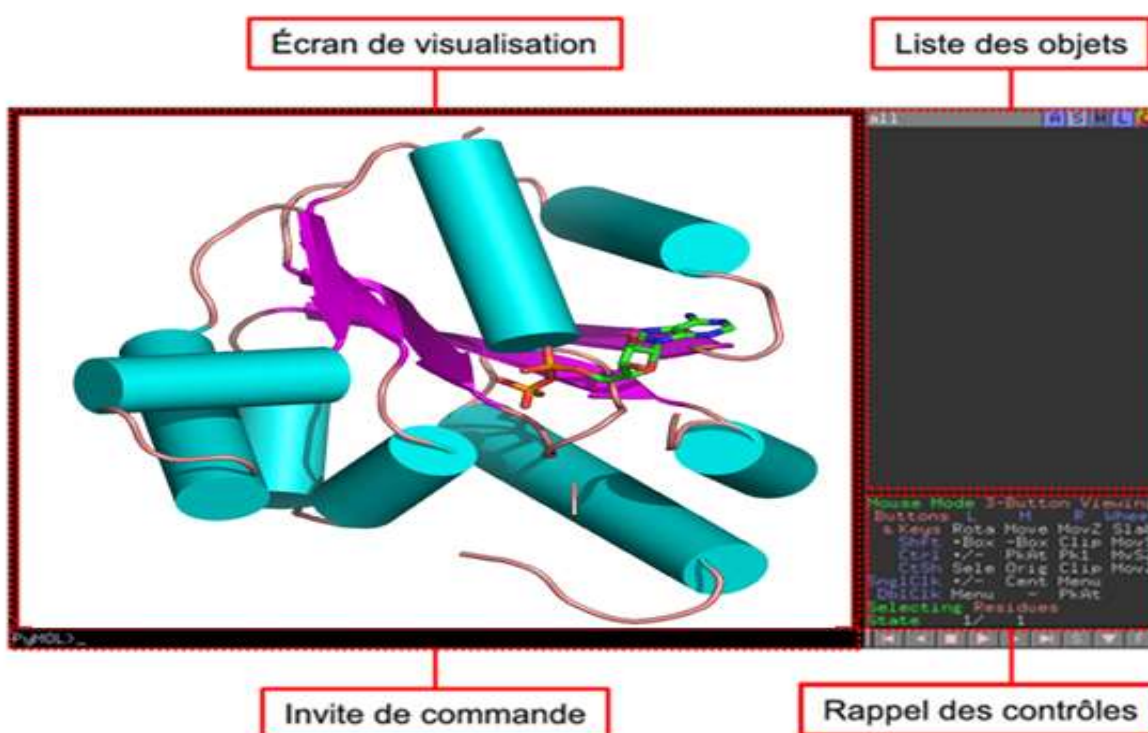


Figure18. La fenêtre de visualisation.

I.2.2 GOLD

GOLD est un programme de calcul des modes de docking de petites molécules dans les sites de liaison des protéines et est fourni dans le cadre de GOLD Suite, un ensemble de programmes pour la visualisation et la manipulation des structures (Hermes v 1.4), pour l'arrimage protéine-ligand (GOLD v 5.0.1) et pour le traitement et la visualisation des résultats de docking ([GoldMine v 1.3](#)).

Ses principaux avantages sont sa fiabilité à prédire des structures cristallographiques pour des complexes de type protéine-ligand et l'emploi d'un algorithme génétique efficace. De plus, le logiciel dispose d'une interface graphique simple d'emploi, et aisément scriptable et s'adapte particulièrement bien aux environnements de calcul parallèle.

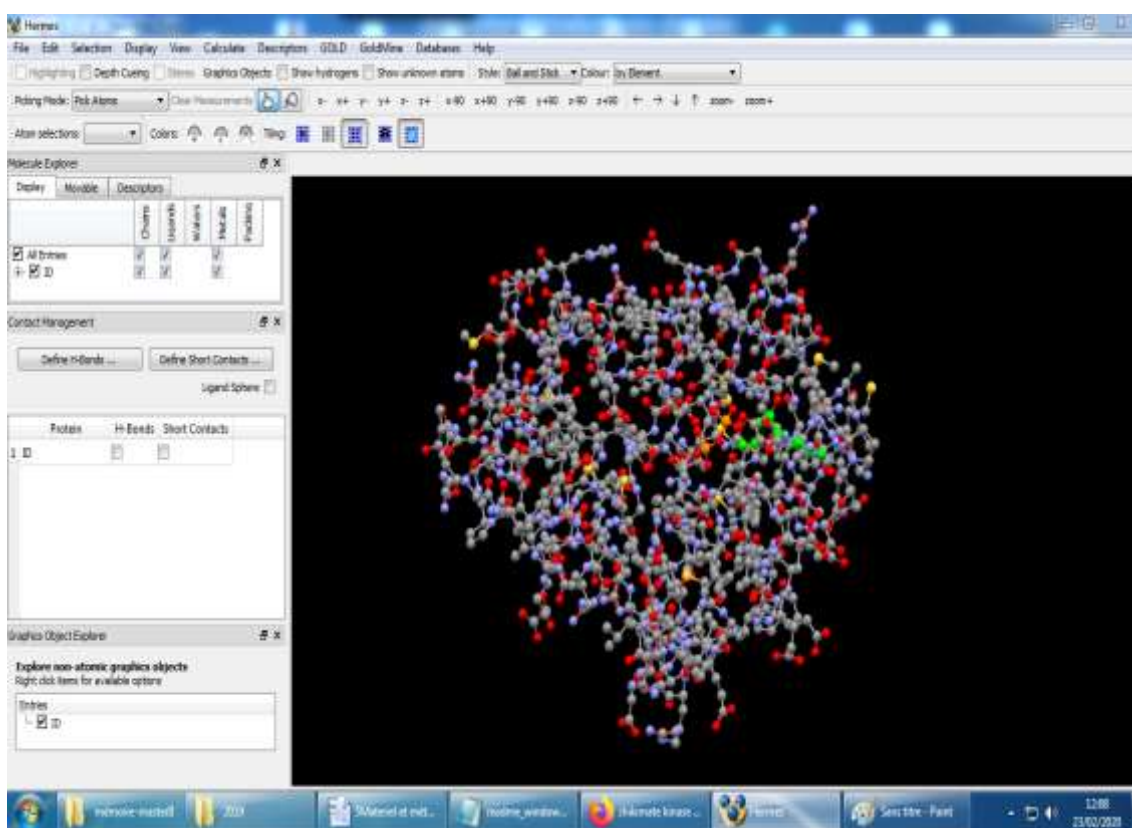


Figure 19. L'interface graphique du GOLD.

I.2.2.1 Hermes

Hermes est un programme permettant de visualiser la structure des protéines en trois dimensions. Ses caractéristiques comprennent:

- La capacité de lire les structures des protéines et de ligand à partir de fichiers externes.

- Une gamme d'options de visualisation 3D, y compris le choix des modèles d'affichage, les couleurs, la capacité de cacher et puis afficher à nouveau les atomes, les résidus, les ligands, les molécules d'eau, ...etc.
- La capacité de mesurer et afficher les distances, les angles et les angles de torsion.
- La capacité de trouver et montrer les liaisons hydrogène.
- La possibilité d'enregistrer les fichiers.
- La possibilité de modifier les ligands.
- La possibilité de charger et de visualiser les surfaces contournées.

I.3 Les banques des données

I.3.1 La banque de données protéiques (PDB)

La banque de données protéiques (Protein Data Bank) est la principale source de données de biologie structurale et permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont principalement déterminées par les deux méthodes la cristallographie à rayons X et la RMN. Les structuralistes du monde entier sont tenus d'y déposer leurs données expérimentales, de cette façon elles appartiennent au domaine public.

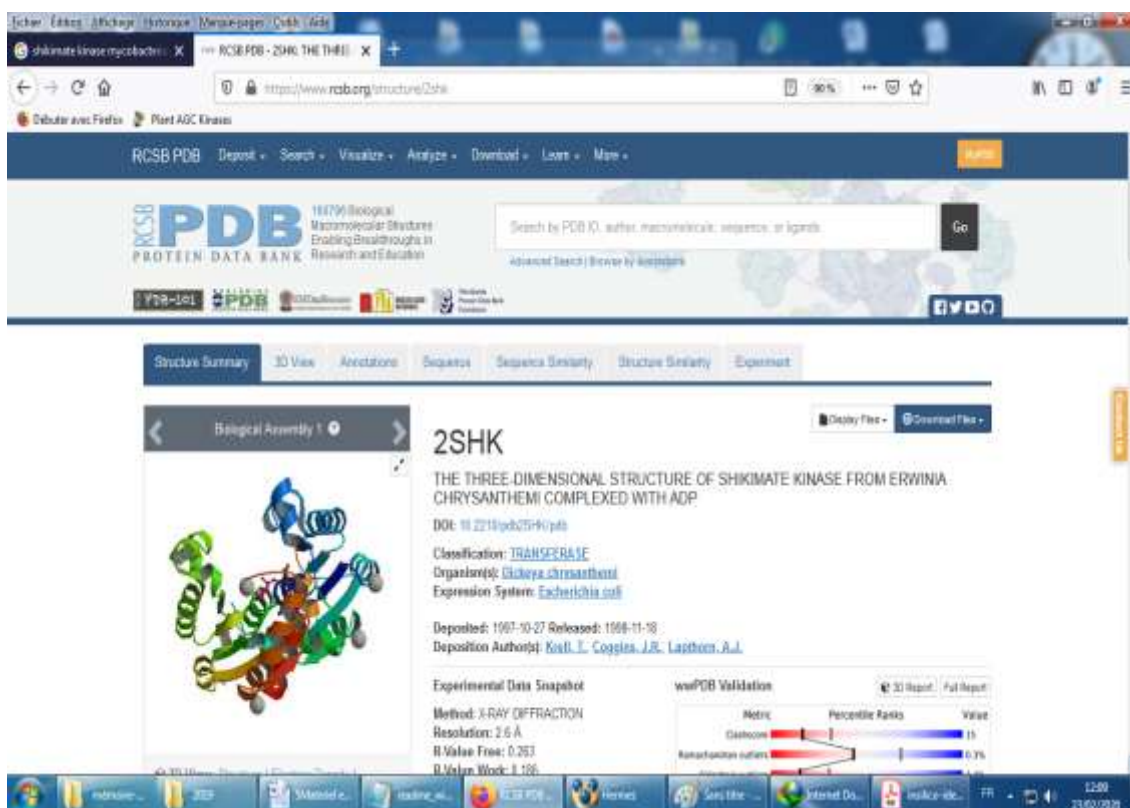


Figure 20. L'interface graphique du site web de la base de donnée PDB.

I.3.2 Pubchem

Pubchem est une banque de données américaine de molécules chimiques gérée par le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), branche de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis sous l'autorité de la *National Institutes of Health* (NIH) (Murray, 2001).

PubChem répertoire plusieurs millions de composés en mettant en ligne, gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres chimique, biochimique, Pharmacologique, production, toxicologie.

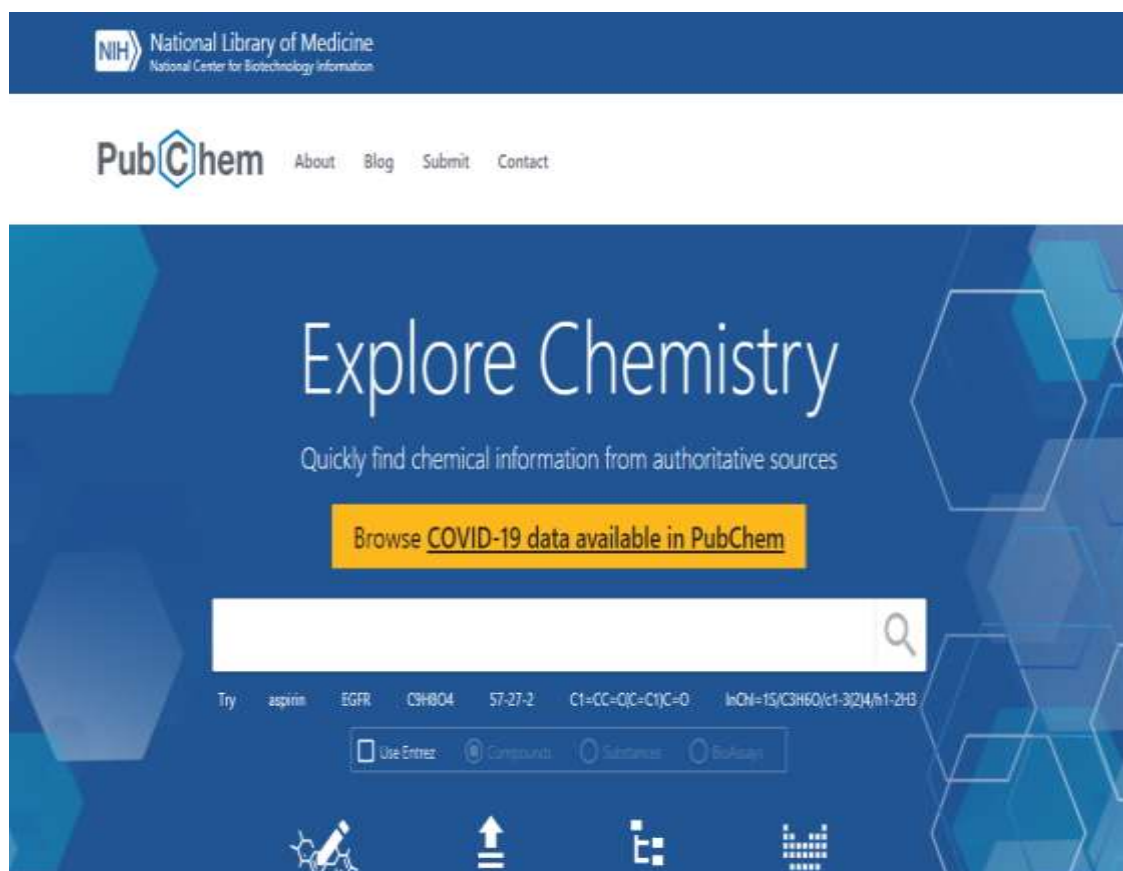


Figure 21. L'interface graphique du site web de la base de donnée Pubchem.

I.4 Structure des Shikimate kinase utilisée

Trente cinq structures tridimensionnelles pour la Shikimate kinase d'*Erwinia* sont disponibles sur la PDB, (le tableau 4 ci-dessous) Pour *Erwinia chrysanthemi*, ils existent trois structures identifiées par les codes : 1E6C, 1SHK, 2SHK.

Nous avons choisi celle portant le code 2SHK car elle constitue un compromis entre une bonne résolution (2.60 Å) et la présence d'un ligand cocrystallisé (ADP).

Les caractéristiques de ces enzymes sont regroupées dans le tableau 04 ci-dessous.

Tableau 04: Structures des Shikimate kinase utilisées.

Code PDB	Organisme	Résolution	Ligand cocristallisé	Référence
3NWJ	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.35	Aucune	Fucile <i>et al.</i> , 2011
3VAA	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1.7	Di (hydroxyethyl) ether	Être publié
3TRF	<i>Coxiella burnetii</i>	2.6	Aucune	Être publié
3N2E	<i>Helicobacter pylori</i> 2669	2.53	7-amino-4-hydroxy-3-[(E)-(5-hydroxy-7 sulf-onaphthalen-2-yl) di- azenyl]naphthalene-2-sulfonic acid and L (+) - Tartaric acid	Cheng <i>et al.</i> , 2012
3MRS	<i>Helicobacter pylori</i> 2669	2.40	Aucune	Cheng <i>et al.</i> , 2012
3MUF	<i>Helicobacter pylori</i>	2.3	Adenosine-5'-di phosphate and shikimate-3-phosphate	Cheng <i>et al.</i> , 2012
3HR7	<i>Helicobacter pylori</i> 2669	1.80	Aucune	Cheng <i>et al.</i> , 2012
3BAF	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.25	Phospho amino phosphonic acid adenylate ester and (3R, 4S, 5R)-3,4,5 Trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Être publié
2PT5	<i>Aquifexaeolicus</i> VF5	2.10	Aucune	Être publié
2DFT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.8	Adenosine-5' diphosphate	Dias <i>et al.</i> , 2007
2IYW	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.85	Adenosine-5' tri -phosphate	Hartmann <i>et al.</i> , 2006
2IYQ	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.80	Adenosine-5' diphosphate And (3R, 4S, 5R)-3,4,5 Trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Hartmann <i>et al.</i> , 2006
2IYR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.98	(3R, 4S, 5R)-3,4,5-Trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Hartmann <i>et al.</i> , 2006
2IYS	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.40	(3R, 4S, 5R)-3,4,5-TrihydroxycyclohexA-1-eneA-1-carbAoxylic Acid	Hartmann <i>et al.</i> , 2006
2IYT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.47	Aucune	Hartmann <i>et al.</i> , 2006
2IYU	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.85	Adenosine-5' diphosphate	Hartmann <i>et al.</i> , 2006
2IYV	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.35	Adenosine-5' diphosphate	Hartmann <i>et al.</i> , 2006
2IYX	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.49	(3R, 4S, 5R)-3,4,5 Trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Hartmann <i>et al.</i> , 2006
2IYY	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.62	Shikimate-3-phosphate	Hartmann <i>et al.</i> , 2006

1VIA	<i>Campylobacter jejuni</i>	1.57	Aucune	Être publié
1E6C	<i>Erwiniachrysanthe emi</i>	1.8 Å	Aucune	Krell <i>et al.</i> , 2001
1SHK	<i>Erwiniachrysanthe emi</i>	1.9 Å	Aucune	Krell <i>et al.</i> , 1997
2SHK	<i>Erwiniachrysanthe emi</i>	2.6 Å	ADP	Krell <i>et al.</i> , 1997
1KAG	<i>Escherichia coli</i>	2.05	Aucune	Romanowski <i>et al.</i> , 2002
1ZUH	<i>Helicobacter pylori</i> 2669	1.80	Aucune	Cheng <i>et al.</i> , 2005
1ZUI	<i>Helicobacter pylori</i> 2669	2.30	(3R, 4S, 5R)-3,4,5-Trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Cheng <i>et al.</i> , 2005
2DFN	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.93	Adenosine-5'-diphosphate and (3R, 4S, 5R)-3,4,5-Trihydroxycyclohex-	Dias <i>et al.</i> , 2007
2G1J	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.00	Aucune	Gan <i>et al.</i> , 2006
2G1K	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.75	(3R, 4S, 5R)-3,4,5-Trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Gan <i>et al.</i> , 2006
1ZYU	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.90	Phosphomethylphosphoic acid adenylate ester and (3R, 4S, 5R)-3,4,5-Trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Gan <i>et al.</i> , 2006
1WE2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.30	Adenosine-5'-diphosphate And 3-dehydroshikimate	Pereira <i>et al.</i> , 2004
1U8A	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.15	Adenosine-5'-diphosphate and (3R, 4S, 5R)-3,4,5-Trihydroxycyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	Dhaliwal <i>et al.</i> , 2004
1L4U	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.8	Adenosine-5'-diphosphate and HEPES	Gu <i>et al.</i> , 2002
1L4Y	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.0	ADP	GU <i>et al.</i> , 2002

II. Méthodes

II.1 Préparation des molécules à l'arrimage

Le complexe protéine-ligand est téléchargé dans le format *pdb* à partir de la banque de données en introduisant son code *pdb*.

GOLD utilise directement le format *pdb* et n'a pas besoin d'une préparation préalable.

II.2 Préparation des ligands

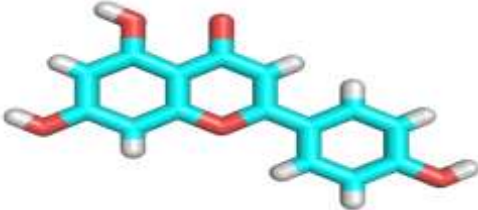

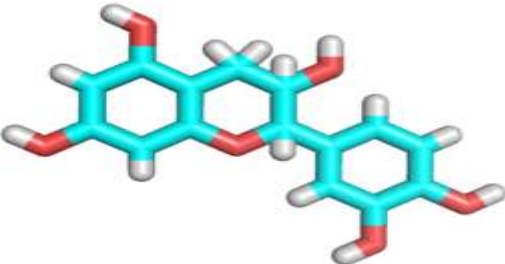
Les structures des **30 molécules** retenues pour le docking : Apigénine, Artémétine, Chrysin, Carchine, Curcumine, Cyanidine, Daidzéine, Epicatechine gallate, Epicatechine-7-glucuronides, Hespérétine, Epicatechine, Epicatechine pentaacétate,






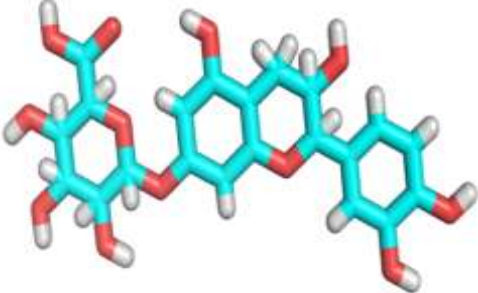
Epigallocatechine, Epigallocatechine gallate, Genisteine-7-glucoside, Génistéine, Isorhamnétine, Kaempférol, Kaempferol 3-glucuronide, Macluraxanthone, Lutéoline, Malvidine, Myricétine, Naringénine, Narirutine, Nébadensine, Péonidine, Quercétine, Rutine et Silibinine ont été téléchargées de la base de données PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) du National Center for Biotechnology Information, sous format **SDF** (2D).



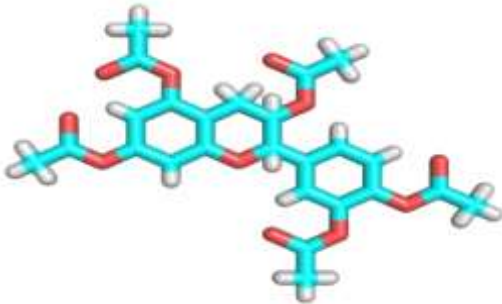


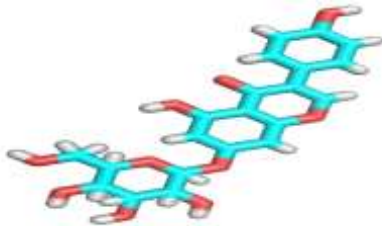
Les structures ont été converties au format 3D par LigPrep. Elles sont ensuite transformées dans le format .mol2 par l'intermédiaire du programme disponible gratuitement *mol2mol*.

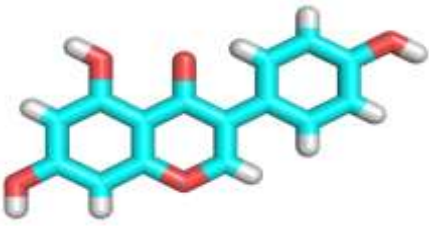
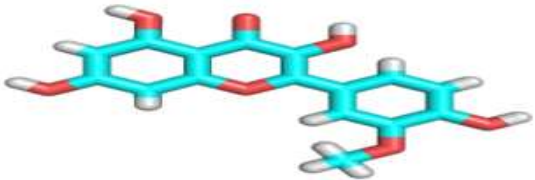

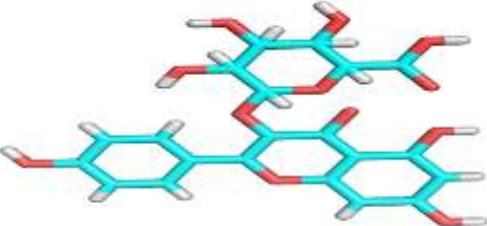
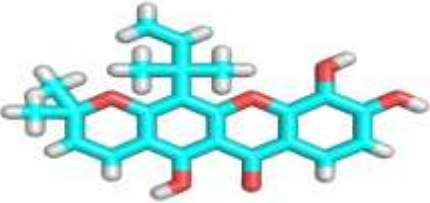


Toutes les structures chimiques des composés ligands utilisés dans l'étude ont montré sur Le tableau 05.

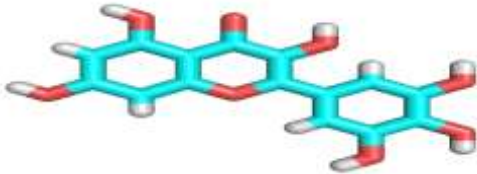

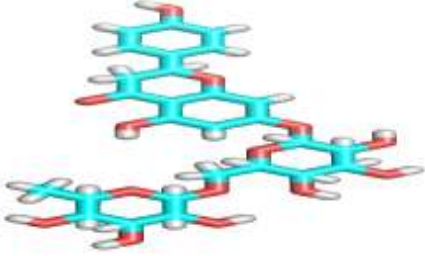


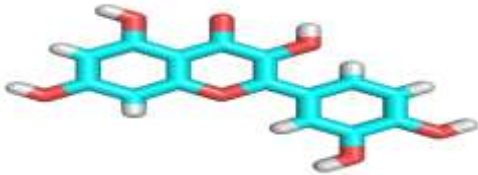

Tableau 05. Représentation des structures 2D et les formules des flavonoïdes.

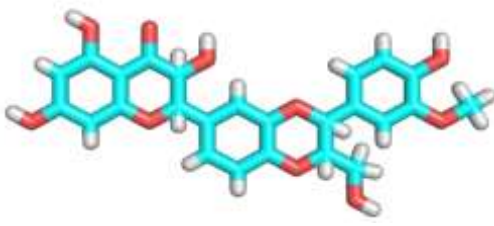
Nom des flavonoïdes		Structures 2D	Formules
1	Apigénine		$C_{15}H_{10}O_5$
2	Artémétine		$C_{20}H_{20}O_8$
3	Catéchine		$C_{15}H_{14}O_6$

4	Chrysine		$C_{15}H_{10}O_4$
5	Curcumine		$C_{21}H_{20}O_6$
6	Cyanidine		$C_{15}H_{11}O_6$
7	Daidzéine		$C_{15}H_{10}O_4$
8	Epicatchine gallate		$C_{22}H_{18}O_{10}$
9	Epicatchine-7-glucuronides		$C_{21}H_{22}O_{12}$

10	Hespérétine		$C_{16}H_{14}O_6$
11	Epicatéchine		$C_{15}H_{14}O_6$
12	Epicatécinepentaacétate		$C_{25}H_{24}O_{11}$
13	Epigallocatechine		$C_{15}H_{14}O_7$
14	Epigallocatechine gallate		$C_{22}H_{18}O_{11}$
15	Genisteine-7-glucoside		$C_{21}H_{20}O_{10}$

16	Génistéine		$C_{15}H_{10}O_5$
17	Isorhamnétine		$C_{16}H_{12}O_7$
18	Kaempférol		$C_{15}H_{10}O_6$
19	Kaempferol 3-glucuronide.		$C_{21}H_{18}O_{12}$
20	Macluraxanthone		$C_{23}H_{22}O_6$
21	Lutéoline		$C_{15}H_{10}O_6$
22	Malvidine		$C_{17}H_{15}O_7^+$

23	Myricétine		$C_{15}H_{10}O_8$
24	Naringénine		$C_{15}H_{12}O_5$
25	Narirutine		$C_{27}H_{32}O_{14}$
26	Nébadensine		$C_{18}H_{16}O_7$
27	Péonidine		$C_{16}H_{13}O_6^+$
28	Quercétine		$C_{15}H_{10}O_7$
29	Rutine		$C_{27}H_{30}O_{16}$

30	Silibinine		$C_{25}H_{22}O_{10}$
----	------------	--	----------------------

II.3 Les différentes étapes de docking

Après l'ouverture du visualiseur *Hermes*. On ouvre la fenêtre *GOLD setup wizard*, en cliquant sur *Wizard*. Le complexe *enzyme-ligand.pdb* sera téléchargé, en cliquant sur le bouton *LoadProtein*.

Les étapes suivantes sont nécessaires :

I.3.1 Addition des hydrogènes

Tous les atomes d'hydrogène doivent être présents dans le fichier d'entrée des protéines.

I.3.2 Suppression des molécules d'eau

Les molécules d'eau dans les cavités des protéines peuvent parfois être un élément fondamental. Elles sont capables d'assurer le relais entre le récepteur et le ligand et ainsi créer des réseaux de liaisons hydrogène. Dans nos études, nous n'avons pas mis en évidence l'intérêt d'introduire des molécules d'eau. Un clic sur l'option *Delete Remaining Waters* permet l'élimination des molécules d'eau.

I.3.3 Suppression des ligands

Le fichier protéine peut avoir un ou plusieurs ligands occupant le site de liaison qui doit être enlevé avant de pouvoir effectuer un docking. En cliquant sur *Delete Ligands* de la liste des options proposées, puis sur le bouton *Extract*. Le ligand extrait est enlevé du fichier de la protéine et automatiquement rechargé dans *Hermes* de sorte qu'il puisse être employé pour définir le site de liaison. Le ligand est sauvegardé sous forme *ligand.mol2*.

I.3.4 Définition de site de liaison

Il est nécessaire de préciser le site de liaison de l'enzyme, en cliquant sur *Define Binding Site* de la liste *Global Options* puis choisir l'option *One or more ligands*. Une

liste de ces ligands actuellement chargés dans le visualiseur *Hermes* sera montrée. Choisissez le ligand de référence que vous souhaitez utiliser à partir de cette liste.

I.3.5 La sélection du Ligand

Pour sélectionner le ligand, appuyer sur *Add*. Choisir *ligand .mol2* puis cliquer sur *Open*. Le *ligand .mol2* sera inscrit au *Ligand File*.

I.3.6 La fonction de score

La fonction *Goldscore* est utilisée dans le cadre du docking, pour l'évaluation de l'énergie des systèmes protéine-ligand.

I.3.7 Run GOLD

Avant de terminer la mise en place de notre arrimage, cliquer sur l'option *Advanced*, sélectionner *Output Options*. Cette page est séparée en trois vues tabulées : *File Format Options*, *Information in File* et *Selecting Solutions*, permettent de contrôler les informations des fichiers de sortie.

Enfin, le choix de l'option *Run GOLD* dans le menu permet de lancer les calculs. Une fois le travail terminé, le message *Finished Docking Ligand* apparaîtra dans la fenêtre *Run GOLD*. Les résultats de docking sont présentés sous forme de 5 fichiers de sortie, pouvant être observés dans la fenêtre *Run GOLD*:

↳ Les fichiers contenant des informations sur la protéine et le ligand initialisé (*gold_protein.mol2* et *gold_ligand.mol2*).

↳ Les fichiers contenant le ligand docké (*gold_soln_ligand_m1_n.mol2*).

↳ Les fichiers contenant le score de Fitness (*ligand_m1.rnk* et *bestranking.lst*) : les tentatives d'amarrage sont énumérées selon le score de Fitness. Donc, la meilleure solution est placée en premier.

↳ Les fichiers log des protéines et de ligand (*gold_protein.log* et *gold_ligand_m1.log*).

↳ Les fichiers contenant les messages d'erreur (*gold.err*).

Chapitre 05:

Résultats et discussion

Résultats et discussion

I. Les résultats

I.1 Fiabilité de programme utilisé

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la shikimate kinase par diverses molécules, nous avons tenté d'évaluer la fiabilité du logiciel GOLD utilisé dans cette étude. La performance de ce programme est jugée au moyen de deux critères différents :

- ↪ L'écart quadratique moyen ou le RMSD (*Root Mean Square Déviation*).
- ↪ L'analyse visuelle.

I.1.1 Le test RMSD

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (*root mean - square dérivation*) entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par le programme de docking. Un seuil maximal de 2Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne position d'une mauvaise position (Gabb *et al.*1997).

Dans notre cas, le test de fiabilité du programme GOLD par le RMSD a été réalisé sur **04 complexes** de la shikimate kinase disponibles dans la PDB. Les codes PDB des complexes et de leurs substrats Co-cristallisé ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenus avec GOLD sont mentionnés dans le tableau N°06.

Tableau 06. Valeur de RMSD de complexe shikimate kinase -ligand étudié

Code PDB	Ligand co-cristallisé	RMSD(Å)
2SHK	ADP	0.655
1WE2	ADP	0.771
1L4U	ADP	1.228
2DFT	ADP	1.339

Sur le complexe shikimate kinase-ligand étudié, le programme GOLD simule correctement les interactions, avec des valeurs de RMSD inférieurs à 2Å. Ceci prouve

davantage que ce programme est bien adapté à l'étude *in silico* de l'inhibition de la shikimate kinase qui nous intéresse ici.

Le test par le RMSD nous permet de conclure, que le programme GOLD peut être utilisé pour prédire les interactions enzyme-inhibiteurs. Il est généralement plus efficace en présence de petites molécules de ligand.

I.1.2 L'analyse visuelle

L'analyse visuelle par GOLD est une étape essentielle pour confirmer les résultats du RMSD. Elle permet de déterminer si un ligand simulé se superpose avec le ligand Co-cristallisé. (Figures : 22,23,24 et 25).

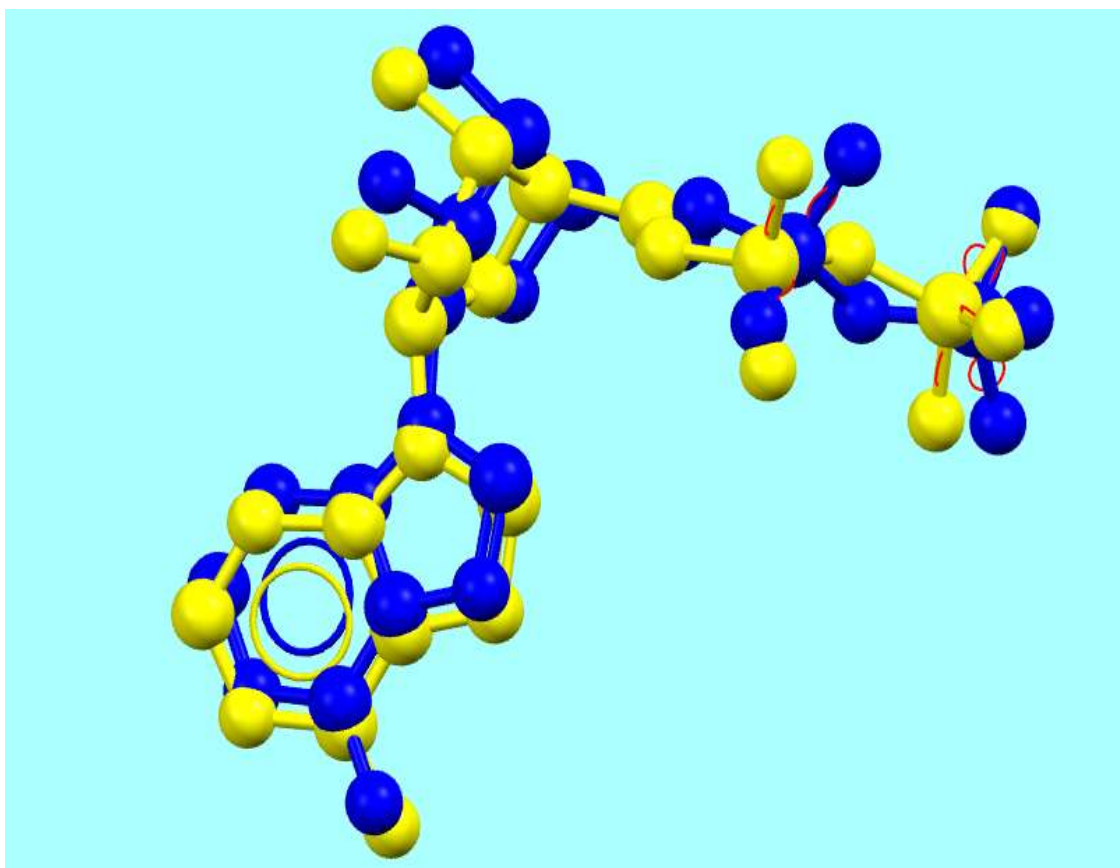


Figure 22. Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (coloré en bleu) et par docking avec GOLD (coloré en jaune). (Code pdb 2SHK. RMSD = 0.665 Å). Image générée par GOLD.

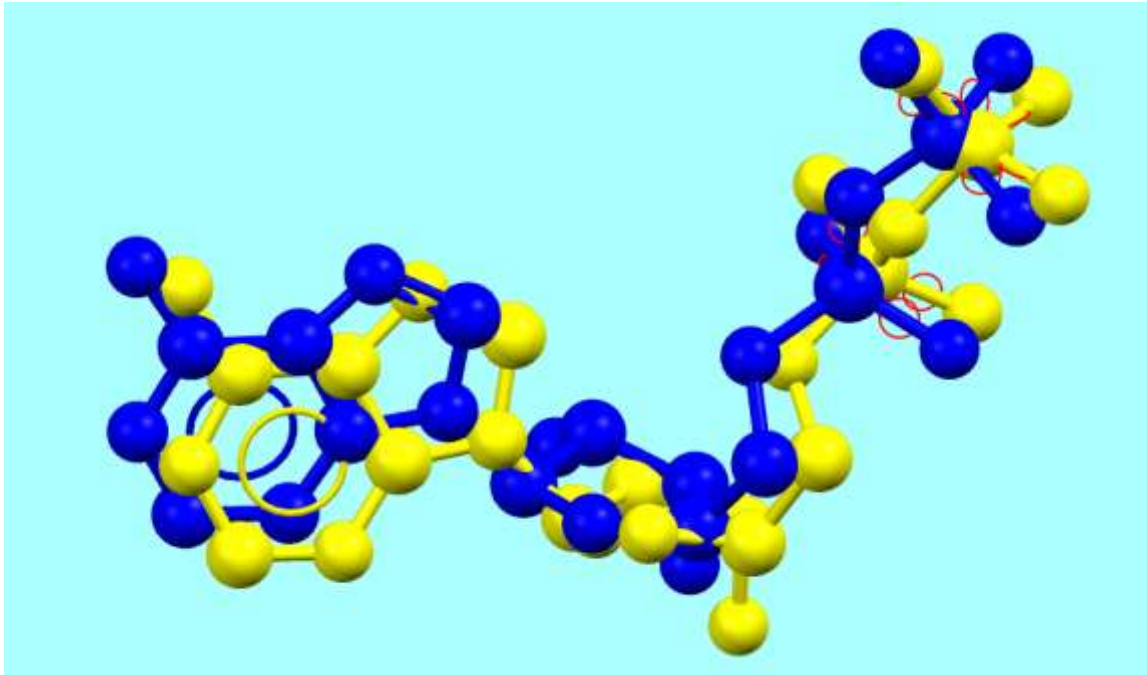


Figure 23. Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (coloré en bleu) et par docking avec GOLD (coloré en jaune). (Code pdb 1WE2. RMSD = 0.771Å). Image générée par GOLD.

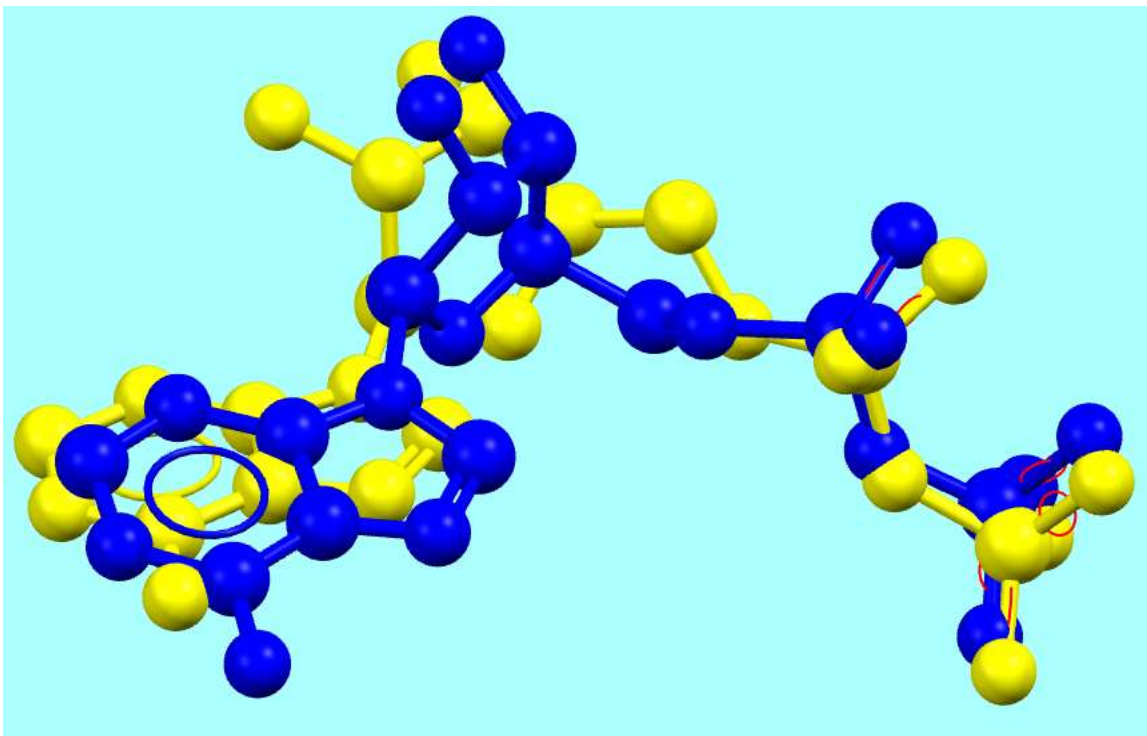


Figure 24. Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (coloré en bleu) et par docking avec GOLD (coloré en jaune). (Code pdb 114u. RMSD = 1.228Å). Image générée par GOLD.

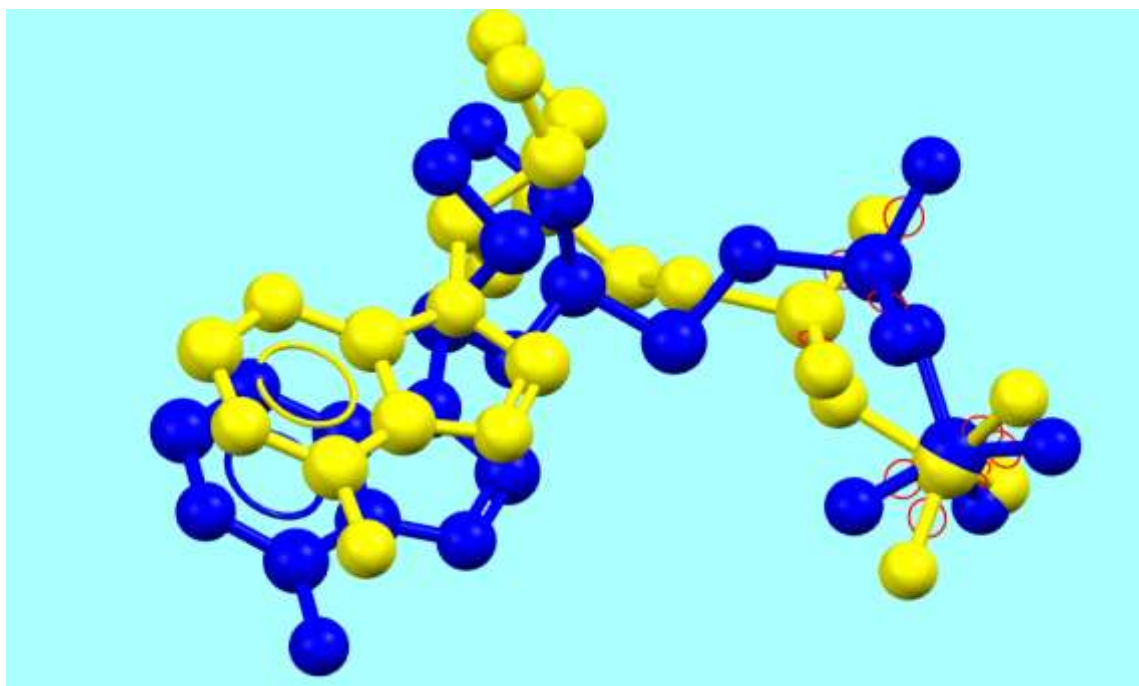


Figure 25. Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (coloré en bleu) et par docking avec GOLD (coloré en jaune). (Code pdb 2DFT. RMSD = 1.339.Å). Image générée par GOLD.

En effet, l'analyse visuelle par GOLD réalisée sur le complexe shikimate kinase-ADP montre que le modèle de ligand simulé par GOLD est correctement placé dans le site actif de la shikimate kinase d'*Erwinia chrysanthemi*. Il présente une conformation spatiale très proche voir même superposable à celle déterminé expérimentalement par cristallographie qu'on retrouve dans la PDB.

I.2 Le docking des diverses molécules sur le récepteur 2SHK par GOLD

I.2.1 Le complexe shikimate kinase -ligand (ADP)

Notre démarche consiste d'abord d'étudier l'interaction avec ADP, ligand de la cible. A l'aide du programme Pymol, nous avons pu définir les résidus de la cavité catalytique de la shikimate kinase (2SHK) en visualisant ceux entourant ligand ADP dans un périmètre de 6Å.

La figure (26) montre les résidus du site actif de la shikimate kinase en complexe avec le ligand ADP, ces résidus sont : ARG110, THR17, THR16, LYS15, GLY14, CYS13, GLY12, ARG11, ALA10, ALA153, GLN155, PRO156, PRO157 et ILE160.

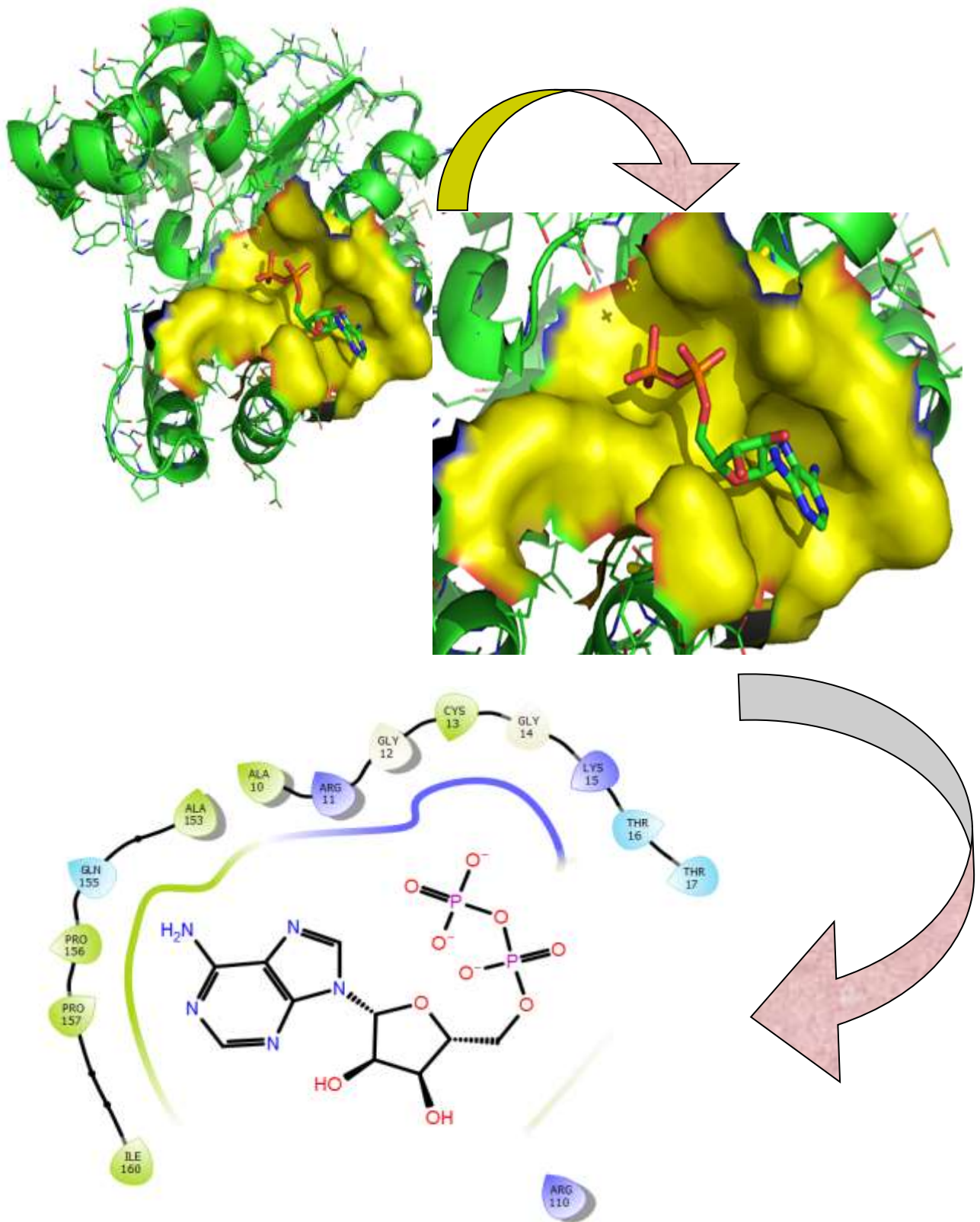


Figure 26. Emplacement de ADP dans le site actif de la shikimate kinase (code PDB :2SHK).
Image générée par Pymol.

L'analyse visuelle réalisée par GOLD montre que l'ADP est bien placé dans le site actif de la shikimate kinase où il est stabilisé par cinq liaisons hydrogènes grâce aux acides aminés suivant : ARG110, GLY 14 et THR17. (Tableau07 ; figure 27)

Tableau 07. Les interactions hydrogène entre la shikimate kinase et le ADP.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
ARG110 (N)	N	2.797
ARG110 (N)	N	3.061
GLY 14(N)	O	2.535
GLY 14(O)	O	2.993
THR17 (N)	O	3.033

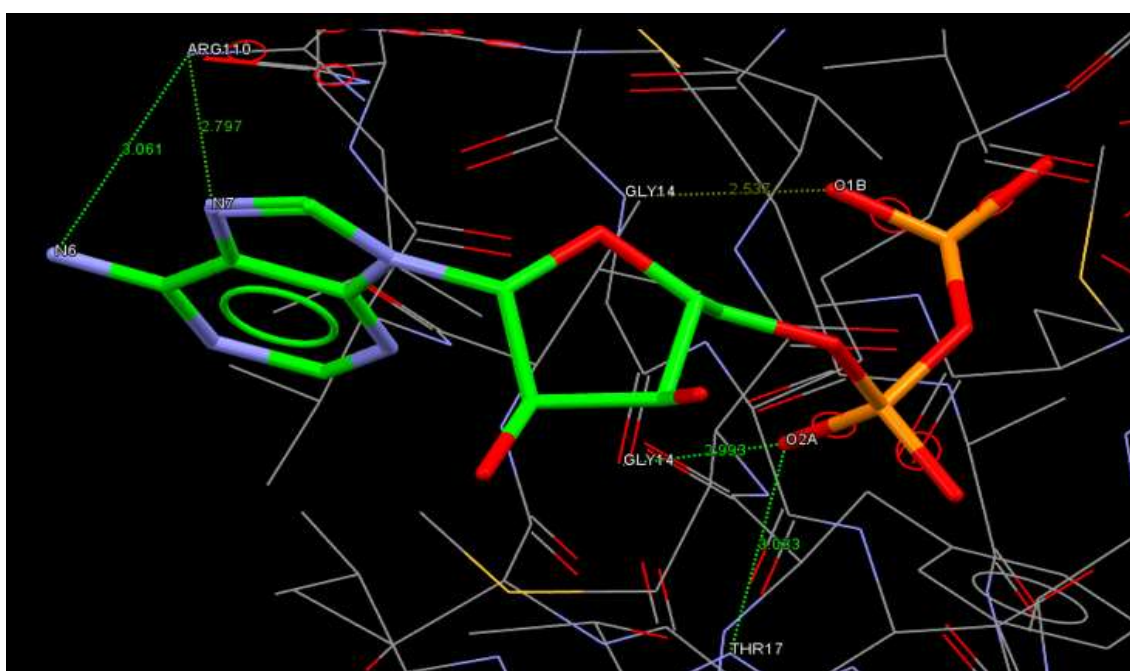


Figure 27. Mode de liaison de la ADP avec le site actif de la shikimate kinase (code pdb : 2SHK). Le ligand est en représentation « bâtonnets » de différents couleurs, et les acides aminés du site actif de l'enzyme sont représentés en « wireframe ». Image générée par GOLD.

I.2.2 Le docking des différents flavonoïdes sur le récepteur 2SHK

Le docking de **30 flavonoïdes** est effectué sur la structure de la protéine Co-cristallisée avec l'ADP.

Nous avons jugé intéressant de tester ces flavonoïdes, de comparer leurs scores (GOLD score) par rapport au ligand Co-cristallisé (ADP), pour proposer le meilleur

inhibiteur de l'enzyme shikimate kinase. Les résultats de docking sont présentés dans le tableau 08.

Tableau08. Résultats de docking avec le programme GOLD.

	Molécules	GOLD score (Kcal/mol)
1	ADP (ligand cocrystallisé)	75,56
2	Curcumine	71.09
3	Génistéine -7-glucoside	68.48
4	Daidzéine	64.38
5	Rutine	63.02
6	Epicatechine pentaacétate	61.50
7	Silibinine	60.09
8	Apigénine	55.89
9	Narirutin	53.48
10	Epicatechine -7-glucuronide	53.06
11	Epigallocatechine gallate	53.00
12	Epicatechine gallate	52.73
13	Myricétine	51.36
14	Péonidine	51.01
15	Kaempferol 3-glucuronide.	50.00
16	Catéchine	49.77
17	Lutéoléine	49.75
18	Isorhamnétine	49.37
19	Malvidine	48.75
20	Epicatechine	48.62
21	Chrysin	48.38
22	Hespéretine	47.25
23	Artémétine	46.98
24	Epigallocatechine	46.48
25	Macluraxanthone	45.89
26	Nébadensine	45.28
27	Génistéine	44.83
28	Cyanidine	43.69
29	Naringinine	41.83
30	Quercétine	41.11
31	Kaempférol	40.39

Parmi les complexes qui figurent dans le tableau 08, nous avons retenu les meilleurs résultats uniquement. C'est-à-dire ceux qui présentent un meilleur score de docking (Valeur d'énergie d'interaction) supérieures ou proches à celles du ligand de référence (Co-cristallisé).

La **Curcumine** et le **Génistéine -7-glucoside** ayant des Goldscore excellents : (**71.80 Kcal/mol** et **68.48 Kcal/mol**) respectivement (**le score de ligand Co-cristallisé ADP est 75.76 Kcal/mol**), pourraient avoir une activité potentielle très puissante contre la shikimate kinase.

I.2.2.1 Etude des interactions du Curcumine avec la shikimate kinase

Le mode d'interaction de ce composé avec le shikimate kinase *d'Erwinia chrysanthemi* a été étudié avec GOLD. L'analyse visuelle (figure 28) montre que la **Curcumine** forme sept liaisons hydrogène avec le site actif de shikimate kinase. (Tableau 09).

Tableau 09. Les ponts hydrogène entre le shikimate kinase et la Curcumine.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
GLY12 (N)	O	3.048
CYS13 (N)	O	2.927
ARG110 (N)	O	2.909
ASP32 (O)	O	2.901
ASP34 (O)	O	2.654
ASP34 (O)	O	2.274
GLY14 (N)	O	2.380

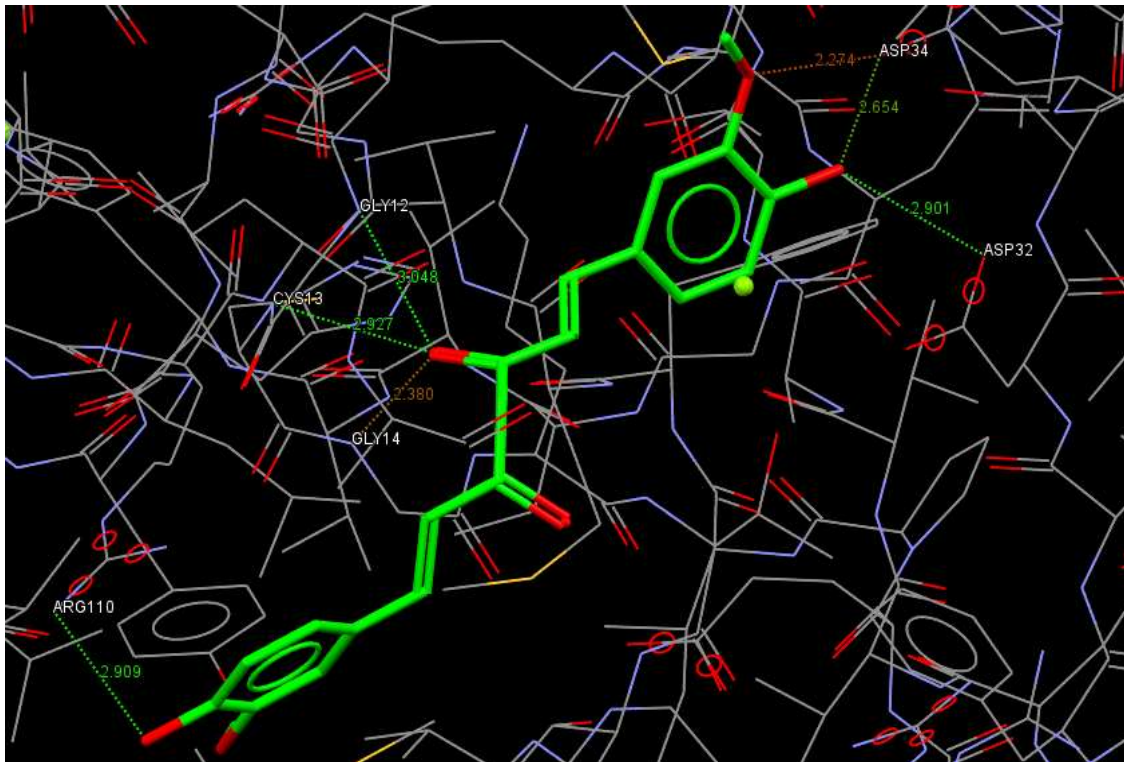


Figure 28. Représentation de liaison hydrogène formée par la Curcumine. Image générée par GOLD.

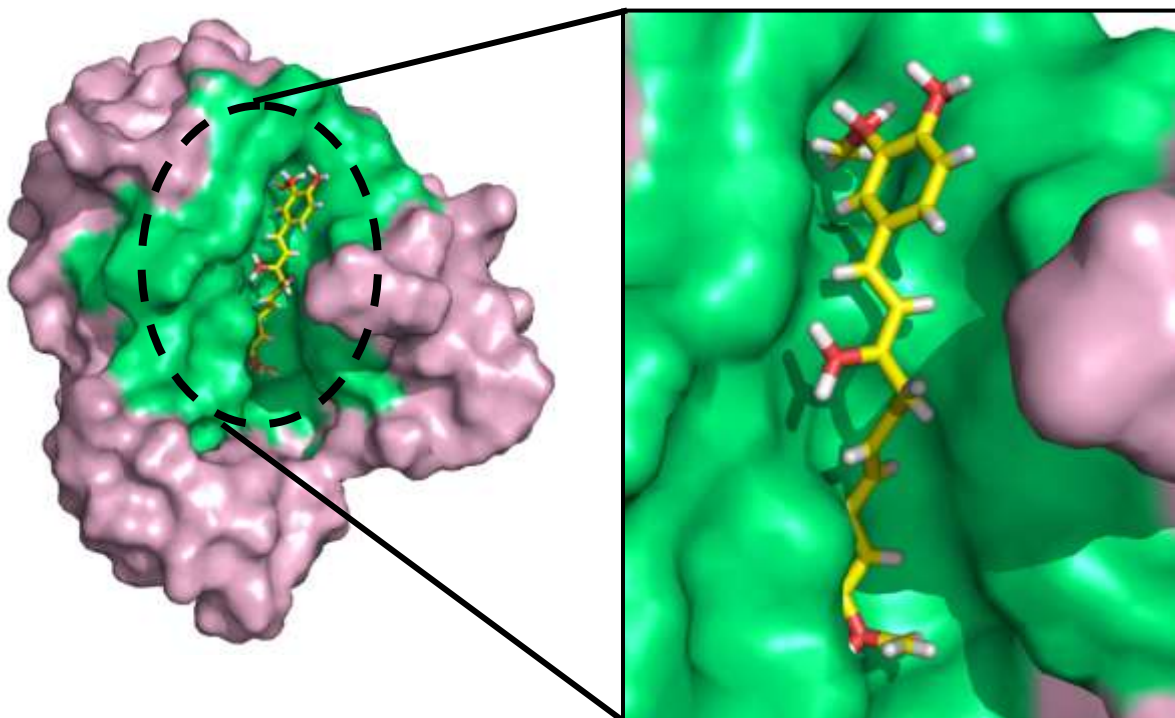


Figure 29. Emplacement de la Curcumine dans le site actif de shikimate kinase chez *Erwinia chrysanthemi*. Image générée par Pymol.

I.2.2.2 Etude des interactions du Génistéine -7-glucoside avec la shikimate kinase

Le mode d'interaction de ce composé avec la shikimate kinase a été étudié avec GOLD. L'analyse visuelle (figure 30 et tableau 10) montre que la **Génistéine -7-glucoside** forme Onze ponts hydrogène avec le site actif de la shikimate kinase. (Tableau 10).

Tableau10. Les ponts hydrogène entre la shikimate kinase et le Génistéine -7-glucoside.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
THR16 (O)	O	2.659
THR17 (O)	O	2.681
ALA153 (O)	O	2.771
ARG110 (N)	O	2.808
ARG110 (N)	O	2.521
CYS13 (N)	O	2.988
GLY14 (N)	O	2.508
GLY12 (N)	O	2.956
THR77 (O)	O	2.766
GLY78 (N)	O	2.763
ASP34 (O)	O	3.034

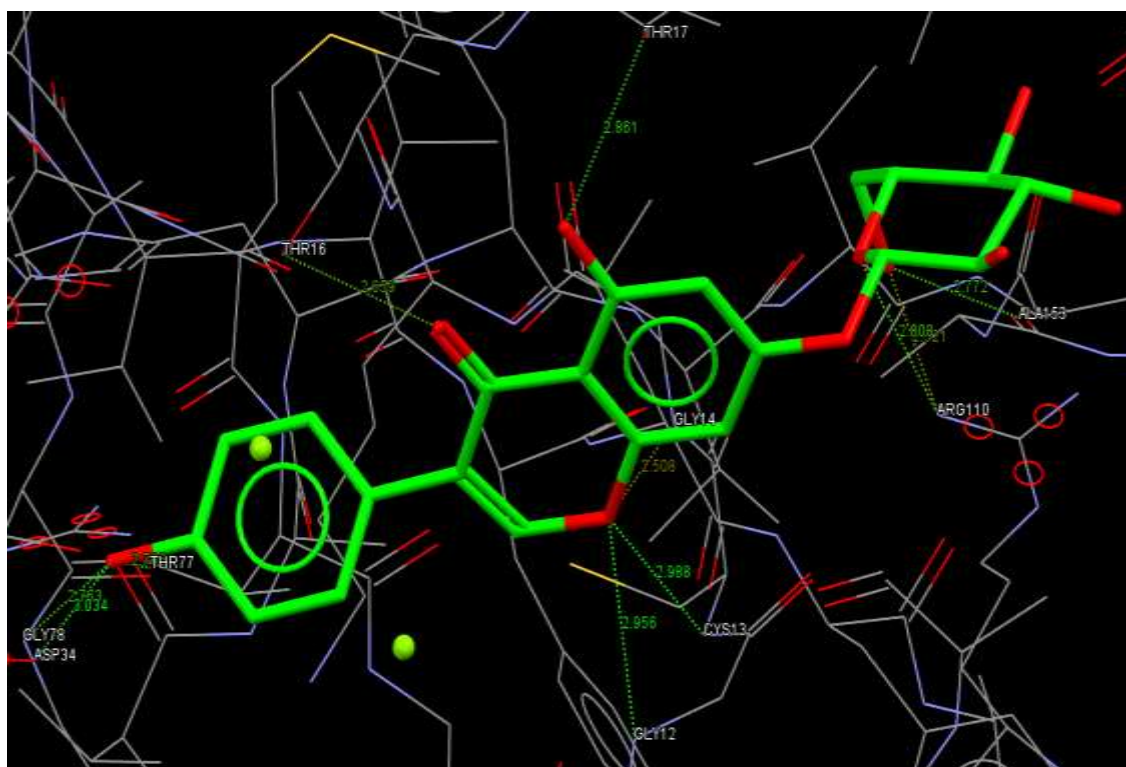


Figure 30. Représentation de liaison hydrogène formée par la Génistéine -7-glucoside. Image générée par GOLD.

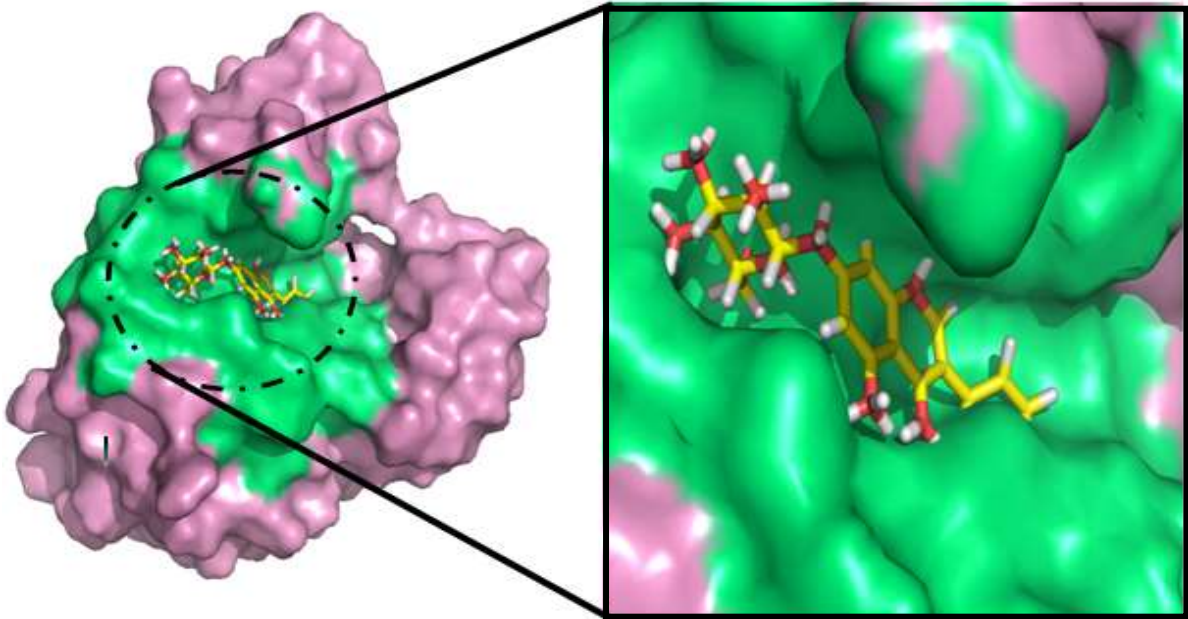


Figure 31. Emplacement de Génistéine -7-glucoside dans le site actif de shikimate kinase chez *Erwinia chrysanthemi*. Image générée par Pymol.

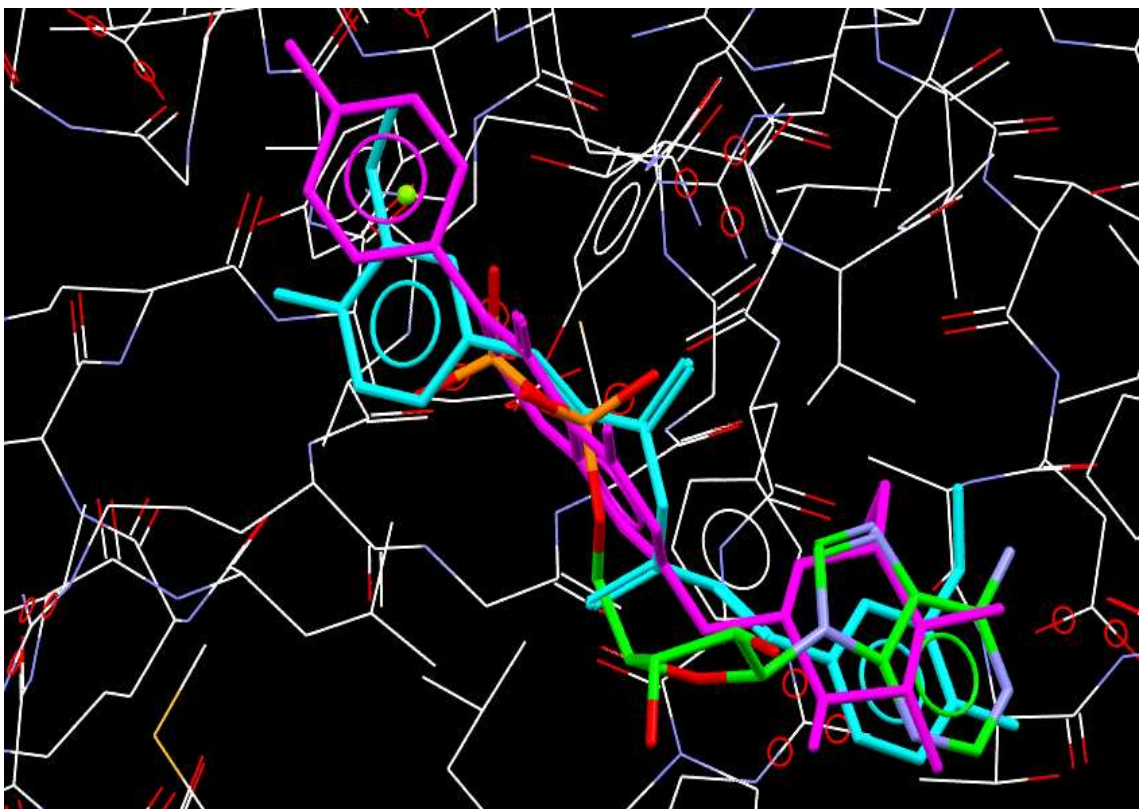


Figure 32. Superposition entre le substrat ADP (les atomes de carbones colorés en vert) et les composés Curcumine (les atomes de carbones colorés en bleu ciel) et genistéine-7- glucoside (les atomes de carbones colorés en violet) dans le site actif de shikimate kinase (code PDB : 2SHK) Image générée par GOLD.

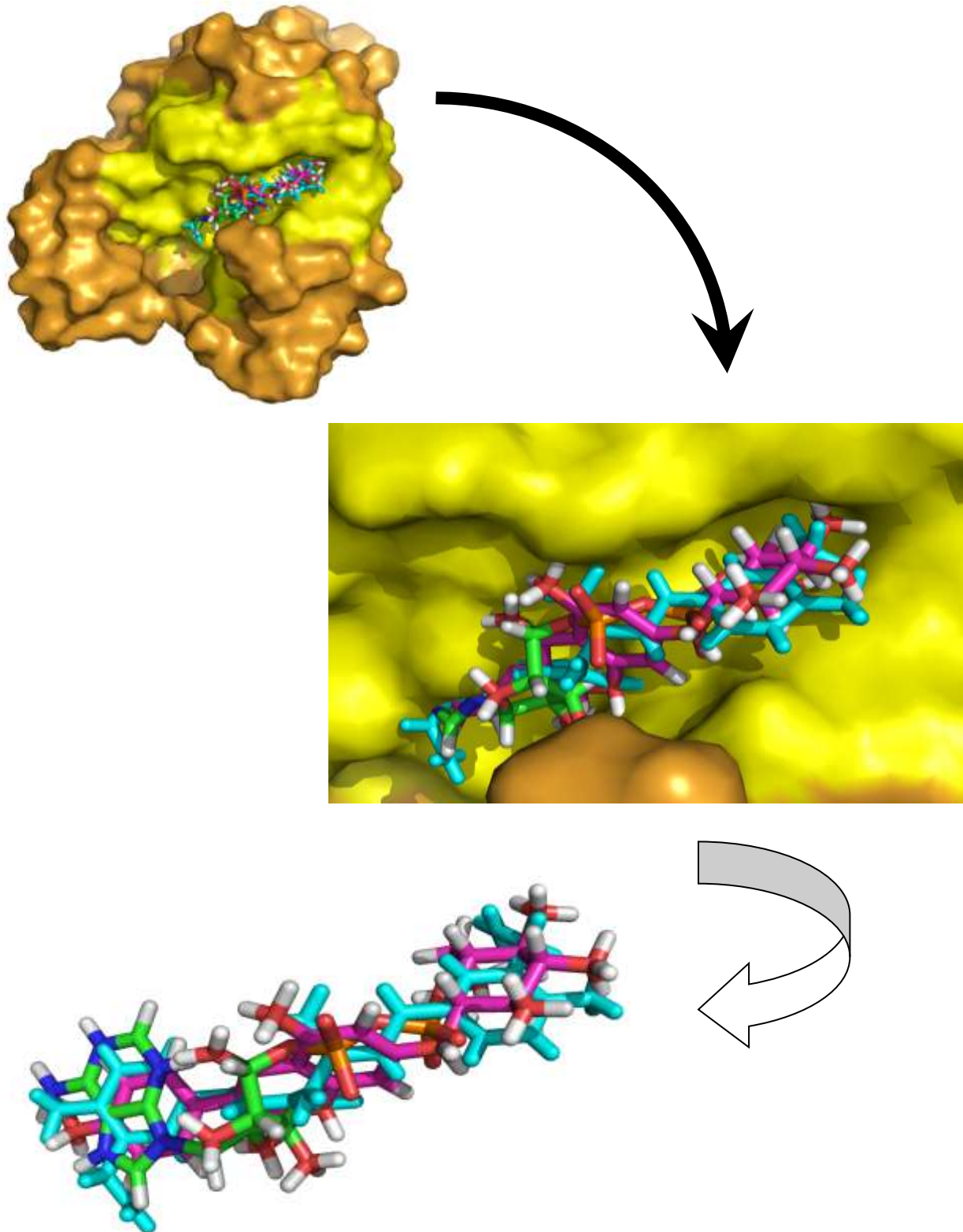


Figure 33. Superposition entre le substrat ADP (les atomes de carbones colorés en vert) et les composés Curcumine (les atomes de carbones colorés en bleu ciel) et genisteine-7- glucoside (les atomes de carbones colorés en violet) dans le site actif de shikimate kinase (code PDB : 2SHK) Image générée par *Pymol*.

II. La discussion

Les phytopathogènes constituent un des risques majeurs pour la sécurité alimentaire mondiale. Ils sont capables de réduire de manière significative les rendements des cultures et d'accroître les pertes post-récolte lors des étapes de transport et de stockage. L'émergence de nouveaux phytopathogènes constitue ainsi une menace pour les cultures d'importance économique comme le riz, le blé, le maïs et la pomme de terre.

L'effet des conditions environnementales sur le développement et l'intensité des maladies illustre parfaitement, en pathologie, les relations triangulaires qui relient ; environnement, hôte et pathogène (Francl, 2001).

Les *Pectobacterium* et *Erwinia chrysanthemi* font partie des dix pathogènes de plantes les plus importants de point de vue économique et scientifique (Mansfield *et al.*, 2012), ils sont responsables de dégâts importants pour la filière de pomme de terre et d'autres cultures en réduisant la qualité ainsi que le rendement lors de la culture ou au moment du stockage des tubercules (Pérombelon, 2002).

La pathogénicité de la phyto bactérie (exemple : *Erwinia chrysanthemi*) repose sur la macération des tissus. Cette macération est permise par la sécrétion d'exoenzymes (les pectinases et les cellulases) qui dégradent la paroi des cellules végétales ce qui, d'une part fournit des nutriments nécessaires à la croissance bactérienne et d'autre part, permet l'extension de la maladie.

La shikimate kinase est une enzyme présente que chez les champignons, les plantes supérieures et les bactéries. IL intervient pour une réaction enzymatique au niveau de la voie shikimate afin d'obtenir la synthèse du chorismate ; et ce dernier est considéré comme précurseur ou une introduction à la voie de biosynthèse des composés aromatiques suivant : PHE, TYR, TRP ; qui sont à leur tour l'origine de la plupart des classes de composés phénoliques.

Dans la présente étude, nous avons évalué l'affinité de 30 flavonoïdes vis à vis des shikimate kinase sur la base de leurs énergies de liaison.

D'après les résultats de docking, nous avons constaté que les meilleures conformations pour la **Curcumine et la Génistéine -7-glucoside** dans le site actif de la shikimate kinase simule parfaitement celle observée par le substrat (ADP).

Nous avons observé la formation de cinq liaisons hydrogènes entre le substrat (**ADP**) et les ARG110, GLY 14 et THR17 de la shikimate kinase. En revanche Nous avons observé la formation de sept liaisons hydrogène entre la **Curcumine** et les résidus GLY12, CYS13, GLY14, ASP32, ASP34 et ARG110 de la shikimate kinase et onze liaisons hydrogènes entre la **Génistéine-7-glucoside** et les GLY12, CYS13, GLY14, THR16, THR17, ASP34, THR77, GLY78, ARG110 et ALA153 de la shikimate kinase.

Nous avons remarqué que les résidus ARG110 et GLY 14 de la shikimate kinase forment des liaisons hydrogènes aussi bien avec l'**ADP** qu'avec la **Curcumine** et la **Génistéine -7-glucoside**, sachant que les liaisons hydrogènes jouent un rôle très important dans la stabilité de l'interaction entre la protéine et son ligand.

Les résultats montrent que la **Curcumine** et la **Génistéine -7-glucoside** présentent les meilleures affinités (**71.80 Kcal/mol** et **68.48 Kcal/mol** respectivement) vis à vis la shikimate kinase. D'autre part, les résultats de superposition entre l'ADP et les composés Curcumine et Génistéine -7-glucoside ont montrés les mêmes orientations au niveau du site actif, chose qui peut expliquer les valeurs proches du goldscore.

Nos résultats confirment les études expérimentales, qui montrent que les flavonoïdes sont de puissantes molécules antibactériennes. Il a été rapporté par [Razavi et al. \(2011\)](#) que les extraits des fleurs et des feuilles de la *Malva sylvestris* dans le méthanol présentaient de forts effets antibactériens contre *Erwinia carotovora*, un pathogène végétal, avec une valeur MIC de 128 et 256 Pg / ml, respectivement. L'extrait des fleurs a également montré des effets antibactériens élevés contre certaines souches humaines de bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, avec une valeur CMI de 192, 200 et 256 pg / ml, respectivement. En effet, les polyphénols sont reconnus comme des molécules antibactériennes et antifongiques.

Conclusion et perspectives

Notre travail avait pour but de nous initier aux outils de la simulation informatique et de développer nos compétences en particulier en docking moléculaire par GOLD afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la shikimate kinase et traiter de manière plus efficace la pourriture molle de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L).

Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé plusieurs étapes :

↳ La première étape : a permis de tester la fiabilité du programme **GOLD** par l'application du test de calcul des valeurs du RMSD de 04 complexes protéines-ligands téléchargés de la PDB et les résultats étaient satisfaisantes. Ce test nous apporte la preuve que le programme **GOLD** est hautement performant et de conclure qu'il peut être utilisé en toute fiabilité pour simuler les interactions des inhibiteurs de la shikimate kinase.

↳ La deuxième étape : consiste à comprendre les mécanismes d'interaction entre un ligand et son récepteur, en l'occurrence la shikimate kinase et son substrat (ADP). Le docking moléculaire avec **GOLD** nous a permis de constater que parmi les 30 flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation étudiés, **la Curcumine et la Génistéine -7-glucoside**, sont les meilleurs inhibiteurs de la shikimate kinase avec des scores égaux à 71.80 Kcal/mol et 68.48 Kcal/mol respectivement.

Nous avons complété notre travail par l'étude des interactions des molécules retenues (la curcumine et la génistéine -7-glucoside) avec le site actif de shikimate kinase en visualisant les différents types de liaisons faibles mis en jeu, notamment les liaisons Hydrogènes.

A travers l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que ces composés (la curcumine et la génistéine -7-glucoside) peuvent être proposés comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme la shikimate kinase.

Par ailleurs, nous envisageons de poursuivre ce travail par une étude approfondie de l'effet de ces composés sur l'inhibition de la shikimate kinase, en faisant appel à d'autres programmes de docking et de simulation *in silico*. Notre étude n'étant que préliminaire, des tests complémentaires *in vitro* s'imposent pour valider ces résultats théoriques.

Les références bibliographiques

Les références bibliographiques :

- ↵ **Agrios G.N. 2005.** Plant Pathology. Elsevier academic press. 5th ed. San Diego, California.
- ↵ **Alfano, J. R. and Collmer, A. (1996).** Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. The Plant Cell 8: 1683-1698.
- ↵ **Axelrood, P. E., Rella, M. and Schroth, M. N. (1988).** Role of antibiosis in competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. Applied and Environmental Microbiology 54: 1222-1229.
- ↵ **An, C. L., Lima, W. J., Hong, S. Y., Shin, E. C., Kim, M. K., Lee, J. R., Park, S. R., Woo, J. G., Lim, Y. P. and Yun, H. D. (2005).** Structural and biochemical analysis of the asc operon encoding 6-phospho- β -glucosidase in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* LY34. Research in Microbiology 156: 145-153.
- ↵ **Axelrood, P. E., Rella, M. and Schroth, M. N. (1988):** Role of antibiosis in competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. Applied and Environmental Microbiology 54: 1222-1229.
- ↵ **Basset, A., Khush, R.S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J.A., and Lemaitre, B (2000).** The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 3376–3381.
- ↵ **Beautrait A., 2008.** Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine fat de kinase d'adhérence focale FAK. Thèse. Université Henri Poincaré–Nancy I : 241P.
- ↵ **Beaulieu C., Boccara M., Van Gijsegem F. (1993).** Pathogenic behavior of pectinasedefective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. Mol. Plant-Microbe In. 6 : 197-202.

- ↵ **Bedin P. 1988.** Les maladies provoquées par les bactéries du genre *Erwinia*. *La pomme de terre française* 445, 65-68.
- ↵ **Bouakaz, I. (2006).** Etude phytochimique de la plante *GenistaMicrocephala*, Mémoire de magister.
- ↵ **Boudet A. M. 2000.** L'usine chimique. 9ème conférence de l'université de tous les savoirs. France. P1-16.
- ↵ **BOUFARES K., 2012 :** Comportement de trois variétés de pommes de terre (Spunta, Désirée et Chubak) entre deux milieux de culture substrat et hydroponique, Thèse Magistère en Agronomie « Amélioration de la production végétale et biodiversité », Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. P3.
- ↵ **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed. Médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- ↵ **Gabb H A , R M Jackson, M J Sternberg.1997.** Modelling Protein Docking Using Shape Complementarity, Electrostatics and Biochemical Information. 1997 Sep 12;272(1):106-20. doi: 10.1006/jmbi.1997.1203.
- ↵ **Cabarrot E., 2008.** Cancérogenèses, développement tumoral, classifications cours de cancérologie Module 10. Facultés de médecine de Toulouse : 23p.
- ↵ **Cauvin L., 2015.** Voies De Signalisation Impliquées Dans La Sensibilisation des Tumeurs Mammaires Au Docétaxel Par Les Acides Gras Polyinsaturés N-3, Thèse, Université François – Rabelais De Tours : 218p.
- ↵ **Charkowski, A.O. (2006).** The soft rot *Erwinia*. In, Plant-associated bacteria. Springer, pp. 423–505.

- ↵ **Cheng, W.C.; Chen, Y.F.; Wang, H.J.; Hsu, K.C.; Lin, S.C.; Chen, T.J.; Yang, J.M.; Wang, W.C.** Structures of *Helicobacter pylori* shikimate kinase reveal a selective inhibitor-induced-fit mechanism. *PLoS One*, 2012, 7, e33481- e33481.

- ↵ **Chikhi A., 2007.** Calculs et modélisation de l'interaction peptide deformylase-substances antibactériennes à l'aide de techniques de docking (arrimage) moléculaire. Thèse. Université Mentouri Constantine, 9 : 126p

- ↵ **Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., Motta, A. S., Souto, A. A. and Brandelli, A. (2006):** Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Canadian Journal of Microbiology* 52 : 533-539.

- ↵ **Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. (2005).** Use of plant growthpromoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and futurs prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 4951-4959.

- ↵ **Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., van Veen J.A., van der Wolf J.M. 2011.** Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* 60, 999-1013.

- ↵ **Dhaliwal, B.; Nichols, C.E.; Ren, J.; Lockyer, M.; Charles, I.; Hawkins, A.R.; Stammers, D.K. 2004.** Crystallographic studies of shikimate binding and induced conformational changes in *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase. *FEBS Lett*, 574, 49-54.

- ↵ **DjemaiZoughlacheS. (2008),** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L, mémoire magister, Université -El Hadj Lakhder –Batna.

- ↵ **Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

- ↵ **Dias, M.V. ; Faím, L.M. ; Vasconcelos, I.B. ; et al. 2007.** Effects of the magnesium and chloride ions and shikimate on the structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun*, 63, 1-6.
- ↵ **Dupuis, B., Michelante, D., Garcia-Albeniz, N. and Nimal, C. (2005) :** Le point sur les infections par *Erwinia* spp. En plant de pommes de terre. Journée d'étude Pomme de terre-CRA-W Gembloux 1-7.
- ↵ **El hassouni M., Chambost J.P., Expert D., Van Gijsegem F., Barras F. (1999).** The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *E. Chrysanthemi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 887-892.
- ↵ **Elkaim J., 2011.** Drug design in silico criblage virtuel de protéines a visée thérapeutique. Thèse. Université de bordeaux1 : 251p.
- ↵ **Elphinstone J.G., Pérombelon M.C.M. 1986a.** Contamination of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading. *Plant Pathology* 35, 25-33.
- ↵ **Elphinstone J.G. 1987.** Soft rot and blackleg of potato; *Erwinia* spp. Technical Information ulletin 21. International Potato Center, Lima, Peru.
- ↵ **Enard C., Diolez A., Expert D. (1988).** Systemic Virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Requires a Functional Iron Assimilation System, Laboratoire de Pathologie Vegetale, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 75231 Paris Cedex 05, France.
- ↵ **FAO, 2016 :** FAO Stat, produit par pays, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- ↵ **Férey N, Bouyer G, Martin C, Drif A, Bourdot P, Ammi M, Nelson J, Burkhart J-M, 2008.** Autin L. Docking De Protéines En Réalité Virtuelle : Une Approche Hybride Et Multimodale. 2e Soumission A Rsti, P 10.

- ↵ **Floss H. G. 1997.** Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports.*, 14 : 433-434.

- ↵ **Francl, L.J. (2001).** The Disease Triangle: A Plant Pathological Paradigm Revisited. *Plant Health Instr.*

- ↵ **Fucile, G.; Garcia, C.; Carlsson, J.; Sunnerhagen, M.; Christendat, D.** Structural and biochemical investigation of two *Arabidopsis* shikimate kinases: the heat-inducible isoform is thermostable. *Protein Sci*, 2011, 20, 1125-1136.

- ↵ **Gan, J.; Gu, Y.; Li, Y.; Yan, H.; Ji, X. 2006.** Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase in complex with shikimic acid and an ATP analogue. *Biochemistry*, 45, 8539-8545.

- ↵ **Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R. 2003.** Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 381-91.

- ↵ **Gebhardt C, Valkonen JPT. 2001.** Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu Rev Phytopathol* ;39: 79-102.

- ↵ **Grayer R.J. and Harborne J.B. (1994).** A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*. 37: 19-42.

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

- ↵ **Gu, Y.; Reshetnikova, L.; Li, Y.; Wu, Y.; Yahn, H.; Singh, S.; Ji, X.** Crystal structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis. *J. Mol. Biol.*, 2002, 319, 779-789.

- ↵ **Harrison M.D., Quinn C.E., Sells A.I., Graham D.C. 1977.** Waste potato dumps as sources of insects contaminated with soft rot coliform bacteria in relation to recontamination of pathogen-free potato stocks. *Potato Research* 20, 37-52.
- ↵ **Hartmann, M.D.; Bourenkov, G.P.; Oberschall, A.; Strizhov, N.; Bartunik, H.D., 2006,** Mechanism of phosphoryl transfer catalyzed by shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.*, 2006, 364, 411-423.
- ↵ **Havsteen, B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol, Therapeut.* P96, 67–202.
- ↵ **Hélias V., Andrivon D., Jouan B. 2000a.** Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* under field conditions and effects of these symptoms on the yield of individual potato plants. *Plant Pathology* 49, 23-32.
- ↵ **Hélias V., Andrivon D., Jouan B. 2000b.** Internal colonisation pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Pathology* 49, 33-42.
- ↵ **Hélias V. 2008.** *Pectobacterium* spp. Et *Dickeya* spp. De la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. *Cahiers Agricultures* 17, 349-54.
- ↵ **Hélia, V., 2008.** *Pectobacterium* spp. Et *Dickeya* spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie, *C. Agricultures*, 4 :349-354.
- ↵ **Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B. et Legrand M. 2004.** Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.*, 16 (6) : 1446- 1465.

- ↵ **Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condémine, G., Nasser, W. and Reverchon, S. (1996):** Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annual Review of Microbiology 50: 213-25.
- ↵ **Iserin P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersley Limited, Londres.
- ↵ **Jafra, S., Przynowa, J., Czajkowski, R., Michta, A., Garbeva, P. and Van der Wolf, J.M. (2006):** Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. Canadian Journal of Microbiology 52: 1006-1015.
- ↵ **Janse, J. D. and Ruissen, M. A. (1988):** Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in the Netherlands. Phytopathology 78: 800-808.
- ↵ **Janse, J.D.; Spit, B.E. (1989)** A note on the limitations of identifying soft rot erwinias by temperature tolerances and sensitivity to erythromycin on a pectate medium. Journal of Phytopathology 125,265-268.
- ↵ **Jérôme Pansanel., 2014.** Formation PyMOL – 11 et 12 décembre– Toulouse : 1/18p
- ↵ **Kamysz, W., Krolicka, A., Bogucka, K., Ossowski, T., Lukasiak, J. and Lojkowska, E. (2005)** Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Against Plant Pathogenic *Pectobacterium* Species. J. Phytopathol. 153: 313–317.
- ↵ **Kassi FM., Badou OJ., Tonzibo ZF., Salah Z., Lndge A. & Kone D., 2014.** Action du fongicide naturel NECO contre la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) chez le bananier plantain (AAB) en Côte d’Ivoire. Journal of Applied Biosciences ,75 : 6183– 6191.

- ↵ **Kening Y., Vincenzo D. L. et Normand B. 1995.** Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant cells.*, 7: 1787-1799.
- ↵ **Kim, J. F., Ham, J. H., Bauer, D. W., Collmer, A. and Beer, S. V. (1998):** The *hrpC* and *hrpN* operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by *plcA* and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 536-567.
- ↵ **Krell, T.; Coyle, J.E.; Horsburgh, M.J.; Coggins, J.R.; Laphorn, A.J.** Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of shikimate kinase from *Erwinia chrysanthemi*. *Acta Crystallogr. SectD*, 1997, 53, 612-614.
- ↵ **Krell, T.; Maclean, J.; Boam, D.J.; Cooper, A.; Resmini, M.; Brocklehurst, K.; Kelly, S.M.; Price, N.C.; Laphorn, A.J.; Coggins, J.R.** Biochemical and X-ray crystallographic studies on shikimate kinase: the important structural role of the P-loop lysine. *Protein Sci.*, 2001, 10, 1137-1149.
- ↵ **Kyöstiö, S. R. M., Cramer, C. L. and Lacy, G. H. (1991):** *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* extracellular protease; characterization and nucleotide sequence of the gene. *Journal of Bacteriology* 173: 6537-6546.
- ↵ **Lahouel M. 2005.** Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
- ↵ **Latour, X., Faure, D., Diallo, S., Cirou, A., Smadja, B., Dessaux, Y., and Orange, N. (2008)** Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*). *Cah. Agric.* 17: 355–360.
- ↵ **Lee, Y-A. and Yu, C-P. (2006):** A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Microbiological Methods* 64: 200-206.

- ↵ **Leroux P., 2003.** Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. Comptes Rendus de Biologies 326 : 9-21.
- ↵ **Lottmann, J., Heuer, H., De Vries, J., Mahn, A., Düring, K., Wackernagel, W., Smalla, K. and Berg, G. (2000):** Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. Federation of European Microbiological Societies Ecology 33: 41-49.
- ↵ **Mae, A., Heikinheimo, R. and Palva, T. (1995):** Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* SCC3193S cellulose gene *celV1* and the role of cellulose in phytopathogenicity. Molecular and General Genetics 247: 17-26.
- ↵ **Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., et al., 2012.** Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria. Mol. Plant Pathol. 13, pp 614–629.
- ↵ **Mcmillan G.P., Hedley D., Fyffe L., Perombelon M.C.M. (1993).** Potato resistance to softrot *Erwinias* is related to cell-wall pectin esterification. Physiological and Molecular Plant Pathology 42, 279–89.
- ↵ **Mills, A.A.S., (Bud) Platt, H.W., and Hurta, R.A.R. (2006)** Sensitivity of *Erwinia* spp. To salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage. Postharvest Biol. Technol. 41 : 208–214.
- ↵ **Mokrani E., 2012.** Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de La dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Mémoire. Biochimie. Université Mentouri Constantine : 121p.
- ↵ **Muraschi, T. F., Friend, M. and Bolles, D. (1965):** *Erwinia*-Like microorganisms isolated from animal and human hosts. American Society for Microbiology 13: 128-131.

- ↵ **Muraschi, T. F., Friend, M. and Bolles, D. (1965):** Erwinia-Like Microorganisms isolated from animal and human hosts. *American Society for Microbiology* 13: 128-131.
- ↵ **Murray J. F., 2001.** La tuberculose dans le monde : situation et perspective en l'an 2001. *Revue des Maladies Respiratoires*, 18 : 479-484.
- ↵ **Nassar, A., Bertheau, Y., Dervin, C., Narcy, J-P. and Lemattre, M. (1994):** Ribotyping of *Erwinia chrysanthemi* strains in relation to their pathogenic and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3781-3789.
- ↵ **Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.*, **33**: 2-16.
- ↵ **Nielsen LW. 1978.** *Erwinia* species in the lenticels of certified seed potatoes. *American Potato Journal* 55, 671-6.
- ↵ **Nykyri, J., Fang, X., Dorati, F., Bakr, R., Pasanen, M., Niemi, O., et al. (2014)** Evidence that nematodes may vector the soft rot-causing enterobacterial phytopathogens. *Plant Pathol.* 63 : 747–757.
- ↵ **Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M.M., and Biosca, E.G. (2006)** Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3482–3488.
- ↵ **Persson, P. ; Janse, J.D. (1988).** Ring rot-like symptoms in *Solanum melongena* cause by *Erwinia chrysanthemi* (potato strain) after artificial inoculation. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 575-578.
- ↵ **Pereira, J.H.; de Oliveira, J.S.; Canduri, F.; Dias, M.V.; Palma, M.S.; Basso, L.A.; Santos, D.S.; de Azevedo, W.F.Jr. 2004.** Structure of shikimate kinase from

- Mycobacterium tuberculosis reveals the binding of shikimic acid. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 60, 2310-2319.
- ↵ **Pérombelon M.C.M. 1973.** Sites of contamination and numbers of *Erwinia carotovora* present in store seed potato stocks in Scotland. *Annals of Applied Biology* 74, 59-65.
- ↵ **Pérombelon, M.C.M. and Lowe, R. (1975).** Studies on the initiation of bacterial soft rot in potato tubers. *Potato Res.* 18: 64–82.
- ↵ **Pérombelon M.C.M., Kelman A. 1980.** Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology* 18, 361–87.
- ↵ **Pérombelon M.C.M., Kelman A. 1980.** Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology* 18, 361–87.
- ↵ **Pérombelon, M.C.M. ; Hyman, L.J. (1986).** A rapid method for identifying and quantifying soft rot erwinias directly from plant material based on their temperature tolerance and sensitivity to erythromycin. *Journal of Applied Bacteriology* 60, 61-66.
- ↵ **Persson, P.; Janse, J.D. (1988)** Ring rot-like symptoms in *Solanum melongena* caused by *Erwinia chrysanthemi* (potato strain) after artificial inoculation. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 575-578
- ↵ **Pérombelon M.C.M., Salmond G. 1995.** Bacterial soft rot. *In:* Singh U.S., Singh R.P., et Kohmoto K., eds. *Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular basis*, Pergamon, United Kingdom 1, 1-20.
- ↵ **Pérombelon M.C.M. 2000.** Blackleg risk potential of seed potatoes determined by quantification by the causal agent and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: a critical review. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 30, 413-420.

- ↵ **Pérombelon, M. C. M. (2002):** Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 5: 1-12.
- ↵ **Persson, P. ; Janse, J.D. (1988).** Ring rot-like symptoms in *Solanum melongena* cause by *Erwinia chrysanthemi* (potato strain) after artificial inoculation. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 575-578
- ↵ **Pezet R., Viret O. et Gindro K., 2004.** Plant-microbe interaction: The *Botrytis* grey mould of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control management. In: *Advances in Plant Physiology* (Hemantaranjan A., ed), Scientific publishers, Jodhpur, India, 7, 71-116.
- ↵ **Piquemal G. 2008.** Cité in **Chekroun Imad Abdelatif et Bedjaoui Adel ; 2017.** Contribution à l'étude phytochimique et évaluation du pouvoir antioxydant des flavonoïdes extraits d'*Osyris alba* récoltée au niveau de la région de Beni-snousse-Tlemcen. *Nutrition et santé. Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen.*51
- ↵ **Razavi Seyed Mehdi, Gholamreza Zarrini, Ghader Molavi, Ghader Ghasemi.**2011. Bioactivity of *Malva Sylvestris* L., a Medicinal Plant from Iran. 2011 Nov;14(6):574-9
- ↵ **Regnault- Roger C., 2012.** Trends for Commercialization of Biocontrol Agent (Biopesticide) Products. *Plant Defense Biological control.* 12 : 139- 60.
- ↵ **Romanowski, M.J.; Burley, S.K.** Crystal structure of the *Escherichia coli* shikimate kinase I (AroK) that confers sensitivity to mecillinam. *Proteins*, 2002, 47, 558-562.
- ↵ **Rombouts, F.M. (1972).** Occurrence and properties of bacterial pectate lyases.
- ↵ **Rousselle, P., Robert, Y., and Crosnier, J.-C. (1996)** La pomme de terre production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations Institut national de la recherche agronomique : Institut technique des céréales et des fourrages, Paris.

- ↵ **Samson R., Legendre J.B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L. 2005.** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. As *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. And delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. And *Dickeya zaeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1415-27.
- ↵ **Samson, R.; Ngwira, N.; Rivera, N. (1990)** Biochemical and serological diversity of *Erwinia chrysanthemi*. In: Plant pathogenic bacteria; Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest 1989 (Ed. by Klement, Z.).
- ↵ **Sarni-Manchado, P ; Cheynier, V.2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Tec et Doc Lavoisier-Paris.
- ↵ **Sharga, B. M. and Lyon, G. D. (1998):** *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 777-783.
- ↵ **Shevchik V.E., Condemine G., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J. (1996),** Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937., *Mol Microbiol* 19(3), 455--466.
- ↵ **Sousa S. F., Fernandes P. A., Ramos M. J. (2006).** Protein ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*. 65, 15–26.
- ↵ **Tardy F., Nasser W., Robert-Baudouy J., Cotte-Pattat N.H. (1997),** Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors., *J Bacteriol* 179(8), 2503—2511.
- ↵ **Taylor R. D., Jewsbury P. J., Essex J. W. (2003).** FDS: flexible ligand and receptor docking with a continuum model and soft-core energy function. *J. Comput. Chem.* 24 (13), 1637–1656.

- ✦ **Teniou S., 2012.** Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Mémoire. Biochimie. Université Mentouri Constantine : 59p.
- ✦ **Van Den Broek D., Chin-A-Woeng, T.F.C., Eijkemans K., Mulders I.H.M., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J. (2003)** Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. Are regulated by phase variation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 1003-1012.
- ✦ **Van der Wolf J., Speksnijder A., Velvis H., Van der Haar J., Van Doorn J. 2007.** Why is *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* sp.) taking over? —The ecology of a blackleg pathogen. In: Hannukkala A, Segerstedt M (eds) New and old pathogens of potato in changing climate. *MTT Agrifood Research Working papers*, p. 30.
- ✦ **van Vuurde, J.W.L.; Roozen, N.J.M. (1990)** Comparison of immunofluorescence colony staining in media, selective isolation on pectate medium, ELISA and immunofluorescence cell staining for detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. chrysanthemi* in cattle manure slurry. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96, 75-89.
- ✦ **Verhoeyen M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S. 2002.** Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany.*, 53 (377): 209 -210.
- ✦ **Von Bodman, S. B., Bauer, W. D. and Coplin, D. L. (2003):** Quorum-sensing in plantpathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41: 455-82.
- ✦ **W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Burrowes J. 2007.** Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137 (3 supp 1): 718 s-737 s.

- ↵ **Weber J., Olsen O., Wegener C., Von Wettstein D. (1996).** Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48, 389–401.
- ↵ **Welch, M., Dutton, J. M., Glansdorp, F. G., Thomas, G. L., Smith, D. S., Coulthurst, S. J., Barnard, A. M. L., Salmond, G. P. C. and Spring, D. R. (2005):** Structure-activity relationships of *Erwinia carotovora* quorum sensing signaling molecules. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 15: 4235-4238.
- ↵ **Winslow, C-E, A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., krumwiede Jr, C., Rogers, L. A. and Smith, G. H. (1917):** The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of Bacteriology* 2 : 505-566.
- ↵ **Xue, A.G., Chen Y., Voldeng H.D., Fedak G., Savard M.E., Langle T., Zhang J. & Harman G.E., 2014.** Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Biological Control*, 73 : 2-7.
- ↵ **Yahiaoui-Zaidi, R. (2004) :** Contribution à l'étude des *Erwinia* pectinolytiques isolées chez *Solanum tuberosum* L. en Algérie. Thèse Doctorat, Université de Sétif, Algérie 187 p.
- ↵ **Yang Z., Cramer C.L., Lacy G.H. (1992).** *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectic enzymes – in planta gene activation and roles in soft-rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5,104–12.
- ↵ **Yaganza, E.-S., Rioux, D., Simard, M., Arul, J., and Tweddell, R.J. (2004)** Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6800–6808.

- ↪ **Yaganza, E-S. (2005)** : Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre : base physico-chimique. Thèse Ph.D. Université Laval, Québec, Canada 188 p.

- ↪ Zeghad Nadia, 2009. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Biotechnologie végétale. Constantine: Université Mentouri Constantine ,84p.

Résumé

L'objectif principal de cette étude était de découvrir, grâce au criblage virtuel, de nouveaux inhibiteurs de shikimate kinase chez *Erwinia chrysanthemi*, à partir d'un groupe de flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation étudiés. L'amarrage moléculaire a été réalisé en utilisant GOLD, pour étudier les interactions de liaison de 30 composés avec les cibles, seulement 2 molécules ont donné de bons résultats la curcumine et la génistéine -7-glucoside : à 71.80 Kcal/mol et 68.48 Kcal/mol respectivement par rapport à le ligand original (ADP) 75.56 Kcal / mol. Le programme d'approche de l'amarrage moléculaire avec GOLD est considéré parmi les meilleures techniques utilisées aujourd'hui pour développer des protéines plus efficaces.

Mots clés: GOLD, shikimate kinase, l'amarrage moléculaire, Inhibiteur, flavonoïdes, *Erwinia chrysanthemi*.

Abstract

The main objective of this study was to discover, thanks to virtual screening, new shikimate kinase inhibitors in *Erwinia chrysanthemi*, from a group of the most abundant flavonoids in the diet studied. Molecular docking was carried out using GOLD (Genetic Optimization of Ligand Docking), to study the binding interactions of 30 compounds with the targets, only 2 molecules gave good results, curcumin and genistein -7-glucoside: at 71.80 Kcal / mol and 68.48 Kcal. / mol respectively compared to the original ligand (ADP) 75.56 Kcal / mol. The molecular docking approach program with GOLD is considered one of the best techniques used today to develop more efficient proteins.

Keywords: GOLD, shikimate kinase, molecular docking, Inhibitor, flavonoids, *Erwinia chrysanthemi*.

الملخص:

باستعمال وسائل بيومعلوماتية Bioinformatic tools، ارتأينا في هذا البحث إجراء دراسة حول إمكانية تثبيط إنزيم shikimate kinase عند بكتيريا *Erwinia chrysanthemi* من طرف 30 من الفلافونويدات الأكثر انتشارا في أغذية الإنسان. أين قمنا بإرساء Docking هذه الفلافونويدات في الموقع الفعال للإنزيم المستهدف (shikimate kinase) بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD، أظهرت النتائج المتحصّل عليها أن كل من المركبات: curcumin و genistein -7-glucoside على الترتيب يملكان ألفة عالية affinity نحو الموقع الفعال لإنزيم shikimate kinase البكتيري، ما يُنبئ بإمكانية استعمالها كمثبطات انتقائية بهدف مكافحة العفن الطري (الساق السوداء) أحد أشهر الأمراض البكتيرية التي تصيب نبات البطاطا.

الكلمات المفتاحية: الإرساء الجزيئي، الفلافونويدات، برنامج **GOLD**، العفن الطري، *Erwinia chrysanthemi*.