

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 : Sciences Biologiques.

Spécialité: Biochimie Appliquée.

Département : Biologie.

### Thème :

Étude *in silico* de l'effet inhibiteur potentiel d'un groupe de flavonoïdes contre la Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis*.

### Présenté par :

\* Khamaissia Bouchra

\* Lamouri Abir

### Devant la commission composée de :

Zitouni A.	MCB	Président	Université de Guelma
Baali S.	MAA	Encadrant	Université de Guelma
Oumeddour A.	MCA	Examineur	Université de Guelma

Juin 2023



# Remerciement



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

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

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

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



*BOUCHRA et ABIR*





## **Dédicace :**



*D'abord notre créateur **Allah**, Grand et Miséricordieux qui nous a donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.*

*Que ce travail témoigne de mes respects .A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon Soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui S'est toujours sacrifié pour me voir réussir, mon très cher père **SADEK KHAMAISIA**.*

*À ma très chère mère **AICHA** ,Votre patience, votre bienveillance, votre dévouement et votre courage sont admirables. Vous étiez toujours présente pour nous écouter, nous reconforter et nous montrer le Vous avez déployé énormément d'efforts pour que nous ne manquions de rien. Vous êtes une mère formidable. Je t'aime et je te souhaite longue vie dans la bonne santé et le bonheur.*

*À mon tres cher mari **ABD EL HAKIM REZAIGUIA**, pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitudes. Merci infiniment.*

*À mes frères **MOHAMED EL AMINE ,OUSSAMA ,ZAKARIA et MOUATAZ BILLAH** pour leur soutien et leur amour.*

*« Ce Mémoire à vous tous »*

**BOUCHRA**





# Dédicace



*Je dédie cet humble travail à :*

- ❖ ***mes parents**, qui seront toujours présents dans ma vie. ; Je remercie*
- ❖ ***mes sœurs** :Houda, Bouchra et Younes ; Je présente également mon dévouement à*
- ❖ ***mon mari** : Said, et à toute*
- ❖ *ma famille, grande et petite, et à*
- ❖ ***mes fidèles amis** : Marwa, Nour et Sirin. Et à tous ceux qui m'offrent aide et encouragement de près ou de loin. Pour tous*
- ❖ ***les étudiants en Master 2** : Promotion de biochimie appliquée 2023*



**Abir**

---

## Résumé

L'objectif principal de cette étude était de découvrir, grâce au criblage virtuel, de nouveaux inhibiteurs de Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis*, 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 42 composés avec les cibles, seulement deux molécules ont donné de bons résultats l'Axillarin 7-sulfate et la Quercetin 3-sulfate : à 87.27 Kcal/mol et 84.75 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, *Mycobacterium tuberculosis*

---

## Abstract

The main objective of this study was to discover, through virtual screening, new Shikimate kinase inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*, from a group of the most abundant flavonoids in the diet studied. Molecular docking was performed using GOLD, to study the binding interactions of 42 compounds with the targets, only two molecules gave good results Axillarin 7-sulfate and Quercetin 3-sulfate: at 87.27 Kcal/mol and 84.75 Kcal/mol respectively compared to the original ligand (ADP) 75.56 Kcal/mol. The molecular docking approach program with GOLD is considered among the best techniques used today to develop more efficient proteins.

**Keywords:** GOLD, Shikimate kinase, molecular docking, Inhibitor, flavonoids, *Mycobacterium tuberculosis*.

## المُلخَص

باستعمال وسائل بيومعلوماتية Outils bioinformatiques ارتأينا في هذا البحث إجراء دراسة حول إمكانية تثبيط إنزيم Shikimate Kinase عند بكتيريا *Mycobacterium tuberculosis* من طرف إثنان وأربعون فلافونيداً تم اختيارها وتحميل بنيتها من بنك PubChem أين قُمنّا بإرساء Docking هذه الفلافونيدات في الموقع الفعال للإنزيم المُستهدف (موقع ارتباط ADP) بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي GOLD حيث كشفت النتائج المتحصل عليها عن اقتراح مركبين هما: Axillarin7-sulfate و Quercetin3-sulfate يمكن أن يلعبا دور مُثبِّط لإنزيم Shikimate Kinase. لما يملكانه من ألفة عالية *affinité* اتجاه الموقع الفعال للإنزيم ( 87.27 Kcal/mol و 84.75 Kcal/mol على الترتيب)، ما يُنبئ بإمكانية استعمالهما كمثبِّط إنزيمي من أجل التصدي لبكتيريا *Mycobacterium tuberculosis*.

**الكلمات المفتاحية:** إنزيم Shikimate Kinase، الإرساء الجزيئي، GOLD، الفلافونيدات، بكتيريا

*Mycobacterium tuberculosis*.

## *Liste des abréviations*

**Å** : Angström.

**ADMET**: Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity.

**ADP**: Adenosines Diphosphate.

**ATP**: Adenosines tri-phosphate.

**B.A.A.R** : Bactéries acido- alcoolo-résistantes

**ES**: Enzyme -Substrat.

**FDA**: Food Drug Administration.

**GA** : Algorithme Génétique.

**GOLD**: Genetic Optimization for Ligand Docking.

**Log P**: Logarithme P.

**MacOS** : Macintosh Operating System .

**MT** : *Mycobacterium tuberculosis*

**NCBI**: National Center for Biotechnology Information.

**NIH**: National Institutes of Health.

**NMP** : Nucléosidiques mono-phosphates.

**PDB** : Protein Data Bank.

**RAM**: Random Access Memory.

**RMSD**: Root Mean Square Deviation.

**SDF**: Stands for structure-data file.

**SK**: Shikimate kinase.

**UNIX**: Universal Network Information Exchange.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	<b>Tableau 1.</b> Principaux programmes de docking moléculaire (Taylor et <i>al.</i> , 2003).	<b>5</b>
<b>Tableau 02</b>	Structure des Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> disponible dans la PDB.	<b>15</b>
<b>Tableau 03</b>	Représentation des structures 2D et les formules des flavonoïdes	<b>16</b>
<b>Tableau 04</b>	Valeur de RMSD de complexe Shikimate kinase -ligand étudié	<b>32</b>
<b>Tableau 05</b>	Les interactions hydrogènes entre la Shikimate kinase et le ADP.	<b>34</b>
<b>Tableau 06</b>	Résultats de docking avec le programme GOLD.	<b>35</b>
<b>Tableau 07</b>	Les ponts hydrogènes entre le Shikimate kinase et la Axillarin 7-sulfate.	<b>37</b>
<b>Tableau 08</b>	Les ponts hydrogènes entre le Shikimate kinase et la Quercetin 3-sulfate	<b>38</b>

## Liste des figures

<b>Figure 01</b>	Comparaison du programmes de docking les plus cités.	<b>5</b>
<b>Figure 02</b>	Principe générale d'un programme de docking.	<b>6</b>
<b>Figure 03</b>	Protocole général de docking.	<b>7</b>
<b>Figure 04</b>	Les étapes typiques d'un docking.	<b>8</b>
<b>Figure 05</b>	L'interface graphique du logiciel <i>PyMOL</i>	<b>11</b>
<b>Figure 06</b>	L'interface graphique du GOLD.	<b>12</b>
<b>Figure 07</b>	L'interface graphique du site web de la base de données PDB.	<b>13</b>
<b>Figure 08</b>	L'interface graphique du site web de la base de données PubChem.	<b>14</b>
<b>Figure 09</b>	Modèle tridimensionnel de la Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , le <b>domaine CORE</b> en rouge, le <b>domaine LID</b> en bleu, et le <b>domaine de liaison au substrat (SB)</b> en bleu ciel, (pdb : <b>1L4U</b> ). Le substrat cocrystallisé(ADP) est démontrés en sticks (les atomes de carbones colorés en orange. Image générée par <i>PyMOL</i> .	<b>29</b>
<b>Figure 10</b>	Modèle tridimensionnel de la Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , avec le site catalytique marqué (la région bleu marine). (Code PDB <b>1L4U</b> ). Le substrat cocrystallisé (ADP) est démontrés en sticks (les atomes de carbones colorés en bleu). Image générée par <i>PyMOL</i> .	<b>30</b>
<b>Figure 11</b>	Mode de liaison de la ADP avec le site actif de <b>Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> (code pdb : <b>1L4U</b> ). Les résidus entourant le site actif sont démontrés en vert. Image générée par <i>PyMOL</i> .	<b>31</b>
<b>Figure 12</b>	Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (carbone coloré en vert) et par docking avec GOLD (carbone coloré en rose). (Code pdb <b>1L4U</b> . RMSD = 0.550 Å). Image générée par GOLD.	<b>33</b>
<b>Figure 13</b>	Mode de liaison de la ADP avec le site actif de la Shikimate kinase (code pdb : <b>1L4U</b> ). 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.	<b>34</b>
<b>Figure 14</b>	Représentation de liaison hydrogène formée par l' <b>Axillarin 7-sulfate</b> . Image générée par GOLD.	<b>37</b>
<b>Figure 15</b>	Emplacement de l' <b>Axillarin 7-sulfate</b> dans le site actif de Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Image générée par <i>PyMOL</i> .	<b>38</b>
<b>Figure 16</b>	Représentation de liaison hydrogène formée par la <b>Quercetin 3-sulfate</b> . Image générée par GOLD.	<b>39</b>
<b>Figure 17</b>	Emplacement de la <b>Quercetin 3-sulfate</b> dans le site actif de Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Image générée par <i>PyMOL</i> .	<b>39</b>
<b>Figure 18</b>	Superposition entre le substrat <b>ADP</b> (les atomes de carbones colorés en vert) et <b>Axillarin 7-sulfate</b> (Les atomes de carbones colorés en rose) et la <b>Quercetin 3-sulfate</b> (les atomes de carbones colorés en bleu ciel) dans le site actif de Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (code PDB : <b>1L4U</b> ) Image générée par <b>GOLD</b> .	<b>40</b>
<b>Figure 19</b>	Superposition entre le substrat <b>ADP</b> (les atomes de carbones colorés en vert) et les composés <b>Axillarin 7-sulfate</b> (Les atomes de carbones colorés en rose) et la <b>Quercetin 3-sulfate</b> (les atomes de carbones colorés en bleu ciel) dans le site actif de Shikimate kinase chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (code PDB : <b>1L4U</b> ) Image générée par <i>PyMOL</i> .	<b>41</b>

# Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale ..... 1

**Chapitre 1 : Docking moléculaire..... 4**

1. Généralité ..... 4

1. Programmes du docking les plus cites ..... 4

2. Principe théorique ..... 6

3. Protocole Générale de Docking ..... 6

4. Le programme GOLD ..... 8

4.1.Algorithme de GOLD ..... 9

4.2. Le mécanisme du placement du ligand dans le site actif..... 9

5.3. La fonction de score ..... 10

**Chapitre 2 : Matériel et méthodes..... 11**

Matériel ..... 11

1. Microordinateur..... 11

2. Programmes..... 11

2.1 .PyMOL..... 11

2.2 .GOLD..... 12

<b>3. Les banques des données.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. La banque de données protéiques (PDB).....</b>	<b>13</b>
<b>3.2. PubChem.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Structure de Shikimate kinase utilisé.....</b>	<b>14</b>
<b>Méthodes.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Préparation des molécules à l'arrimage.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Préparation des ligands.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Les différentes étapes docking.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Addition des hydrogènes.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Suppression des molécules d'eau.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Suppression des ligands.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. Définition de site de liaisons.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5. La sélection du Ligand.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6. La fonction de score.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7. Run Gold.....</b>	<b>28</b>
<b>Chapitre 3 : Résultat et discussion.....</b>	<b>29</b>
<b>1. Description structurale de la Shikimate kinase bactérienne.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Fiabilité de programme utilisé.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Le test RMSD.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2. L'analyse visuelle.....</b>	<b>32</b>

<b>3. Le docking des diverses molécules sur le récepteur 1L4U par GOLD.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Le complexe Shikimate kinase -ligand (ADP).....</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Le docking des différents flavonoïdes sur le récepteur 1L4U.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.1. Etude des interactions du L'Axillarine 7-sulfate avec la SK.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2. Etude des interactions du Quercetin 3-sulfate avec la SK.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Application de la règle 5 du Lipinski .....</b>	<b>42</b>
<b>5. La discussion.....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>44</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>47</b>

**المخلص**

**Résumé**

**Abstract**

*Introduction*

*générale*

## ***Introduction***

La tuberculose (TB) est la principale des causes de décès dans le monde par les maladies bactériennes infectieuses. Elle est causée par le complexe Mycobacterium (M.) incluant principalement *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. mungi* et *M. orygis* (Yombi & Olinga, 2015)

Bien que la tuberculose pulmonaire soit la plus répandue, il existe d'autres formes de la maladie dans lesquelles les bacilles peuvent se propager dans d'autres tissus ou organes, tels que le foie et les os. Ces formes sont connues sous le terme de tuberculose extrapulmonaire. La maladie est dite miliaire ou disséminée lorsque plusieurs tissus sont infectés simultanément (Golden & Vikram, 2005)

La tuberculose se transmet d'un être humain à un autre par la libération de gouttelettes des poumons ou des voies respiratoires d'une personne infectée. La propagation peut se produire en toussant, en éternuant, en chantant, en jouant à un instrument à vent et en parlant (dans une moindre mesure). Pour être infecté, il faut inhaler la bactérie de la tuberculose. La bactérie se transmet par gouttelettes dans la salive ou les crachats. Ses victimes se localisent à la fois dans les pays en développement et dans les pays industrialisés (Griffith *et al.*, 2007)

Effectivement, selon le dernier rapport de l'organisation mondiale de la santé, un quart de la population mondiale infectée et 1,6 millions de décès en 2021, (dont 187 000 présentaient également une infection à VIH), À l'échelle mondiale, la tuberculose est la treizième cause de mortalité et la deuxième due à une maladie infectieuse, derrière la COVID-19 (et avant le sida). (General *et al.*, 2022)

En l'Algérie, la situation épidémiologique de la tuberculose est très inquiétante, selon le ministère de la santé, 18.420 nouveaux cas déclarés en 2022.

Depuis 1950, la découverte d'antituberculeux efficaces et l'amélioration des conditions de vie avaient guéri beaucoup des patients tuberculeux surtout dans les pays développés (Newton *et al.*, 2000). Cependant, l'accroissement de la pauvreté, le non suivi de traitement, la mauvaise observance, l'émergence des souches multi-résistantes aux antibiotiques (Rashighi & Harris, 2017) et l'association de *M. tuberculosis* avec le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) ont provoqué la recrudescence de la tuberculose

(Komrower & Thillai, 2015). En outre, le seul vaccin actuellement disponible, Bacille de Calmette-Guérin (BCG), est qualifié d'«égoïste» car son efficacité pour offrir une protection contre la forme pulmonaire d'adulte, la plus commune de la maladie, est variable en allant de 0% à 80% dans les différents essais cliniques (Zahir *et al.*, 2018). D'un autre côté, il entraîne essentiellement une protection de l'enfant vacciné contre les formes extrapulmonaires. Il est de ce fait, sans effet de protection collective. Tous ces facteurs ont contribué largement à aggraver l'impact de cette maladie en la rendant un problème majeur de santé publique (Zahir *et al.*, 2018).

D'autre part l'utilisation non raisonnée de l'antituberculeux conduit à l'émergence de souches résistantes de *Mycobacterium tuberculosis*. Cette bactérie présente souvent une multirésistance importante aux différentes familles d'antibiotiques notamment l'isoniazide et les rifampicines et les fluoroquinolones. (Yombi & Olinga, 2015)

Par conséquent, il est nécessaire de rechercher et développer de nouveaux agents inhibiteurs de la croissance des bacilles tuberculeux en empruntant plusieurs voies de recherches à savoir l'investigation des plantes produisant des substances à effet anti-mycobactérien (D'Ambrosio *et al.*, 2015). L'exploration des microorganismes (Prince *et al.*, 2012), ainsi que le criblage virtuel des composés chimiques en utilisant des outils de bioinformatique.

Or, la découverte de nouveaux médicaments est un processus extrêmement long et fastidieux, nécessitant 12 à 15 ans et près d'un milliard de dollars. Récemment, et avec le développement de la cristallographie par rayons X et l'outil informatique, les méthodes de modélisation par docking moléculaire sont devenues des étapes cruciales dans de nombreux programmes de découverte de nouveaux médicaments. Le criblage virtuel a offert une nouvelle voie d'identification de molécules bioactives. En se basant sur la structure 3D de la protéine cible, le criblage virtuel consiste à amarrer et à prédire l'affinité d'un très grand nombre de ligands (collectées en chimiothèques) pour le site actif en question, ce qui est plus facile à mettre en place, plus rapide, pour un coût bien moindre que les criblages expérimentaux. Par la suite, les molécules les plus prometteuses seront sélectionnées, achetées ou synthétisées puis testées expérimentalement. (Docking *et al.*, 1998)

Généralement, il existe deux catégories de criblage virtuel, basé ligands et basé structure. La première catégorie est utilisée lorsque la structure de la cible thérapeutique est manquante, tandis que, dans la deuxième catégorie, la structure 3D de la cible est nécessaire pour mesurer le score de l'interaction cible- ligands. Entre ces deux catégories, une hybridation « criblage virtuel hybride » pour exploiter les avantages de chacune est possible. Une des méthodes, la plus utilisée dans le criblage virtuel basé structure c'est l'amarrage moléculaire « docking » qui se base sur la théorie de la serrure-clé, où il compare la cible à une serrure et le ligand à une clé. Le ligand doit avoir une taille et une forme précises pour pouvoir s'adapter la cible « récepteur » (Sid & Batouche, 2021)

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 chez *Mycobacterium tuberculosis* 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 trois chapitres, le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur le docking moléculaire. Au niveau du second chapitre on étale les méthodes et les techniques utilisées pour mener ce travail ; Les résultats obtenus ainsi que leurs discussions sont présentés dans le troisième chapitre et on termine par une conclusion et perspectives.

**Chapitre I :**

*Docking*

*moléculaire*

## 1. 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.

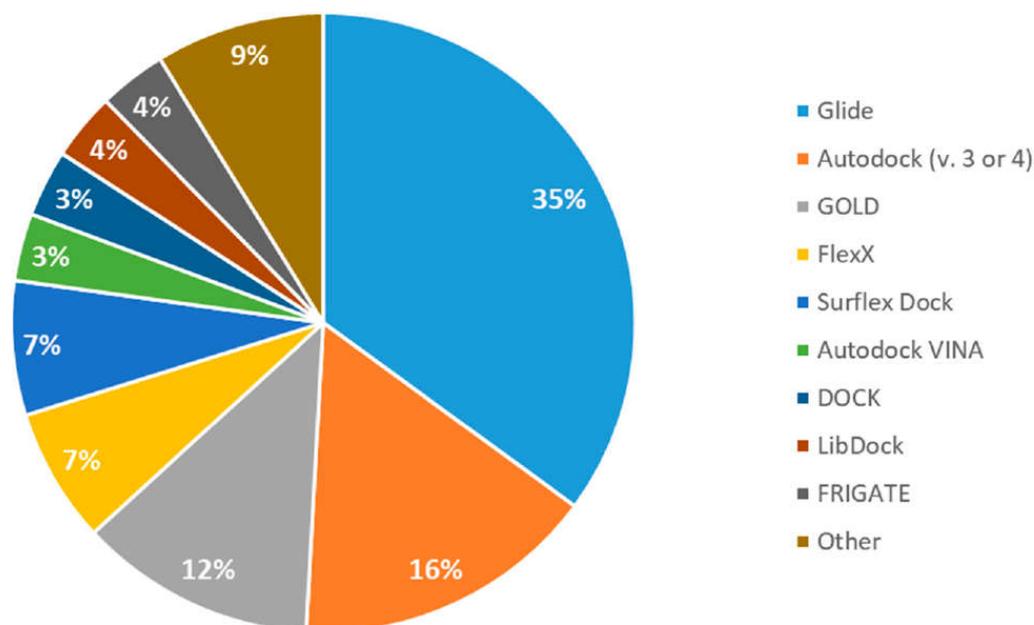
Historiquement, les premiers outils de docking obéissaient au principe dit « lock-and key » (principe « clef-serrure ») selon lequel le ligand qui représente la clef, est complémentaire au niveau géométrique du site actif du récepteur, qui représente la serrure (Fischer, 1894)

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 (Stanzione *et al.*, 2021)

## 2. 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 : Glide 35, AutoDock (16 %) et GOLD (12 %). (Timo *et al.*, 2019)



**Figure 1.** Comparaison du programmes de docking les plus cités. (Timo *et al.*, 2019)

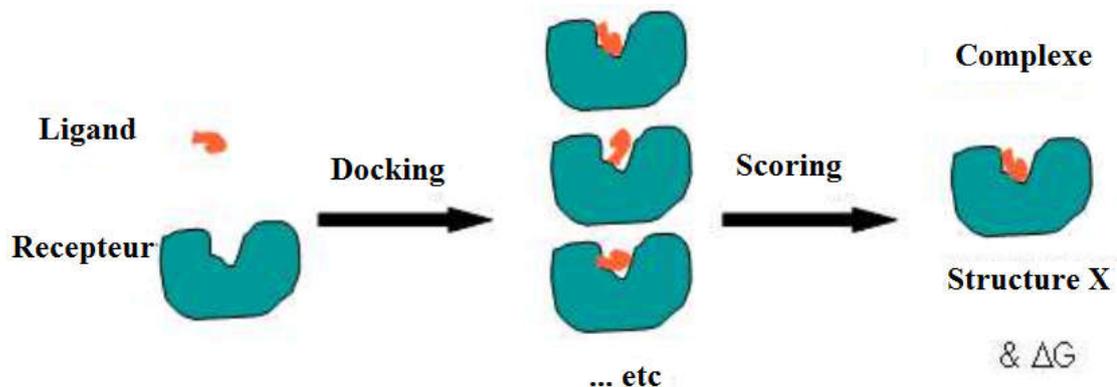
**Tableau 1.** Principaux programmes de docking moléculaire (Taylor *et al.*, 2003)

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

### 3. 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.



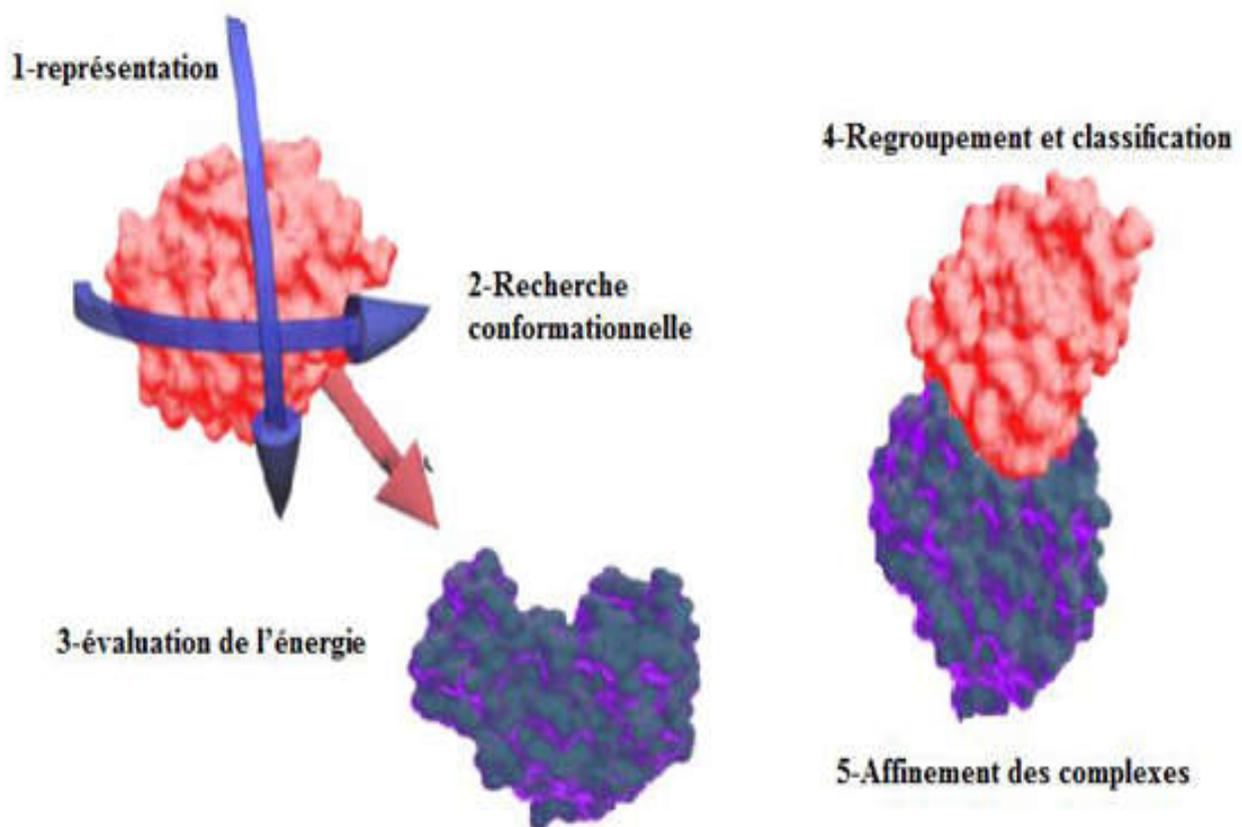
**Figure 2.** Principe générale d'un programme de docking. (Férey *et al.*, 2009)

### 4. 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 17) :

- 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 3.** Protocole général de docking (Férey *et al.*, 2009)

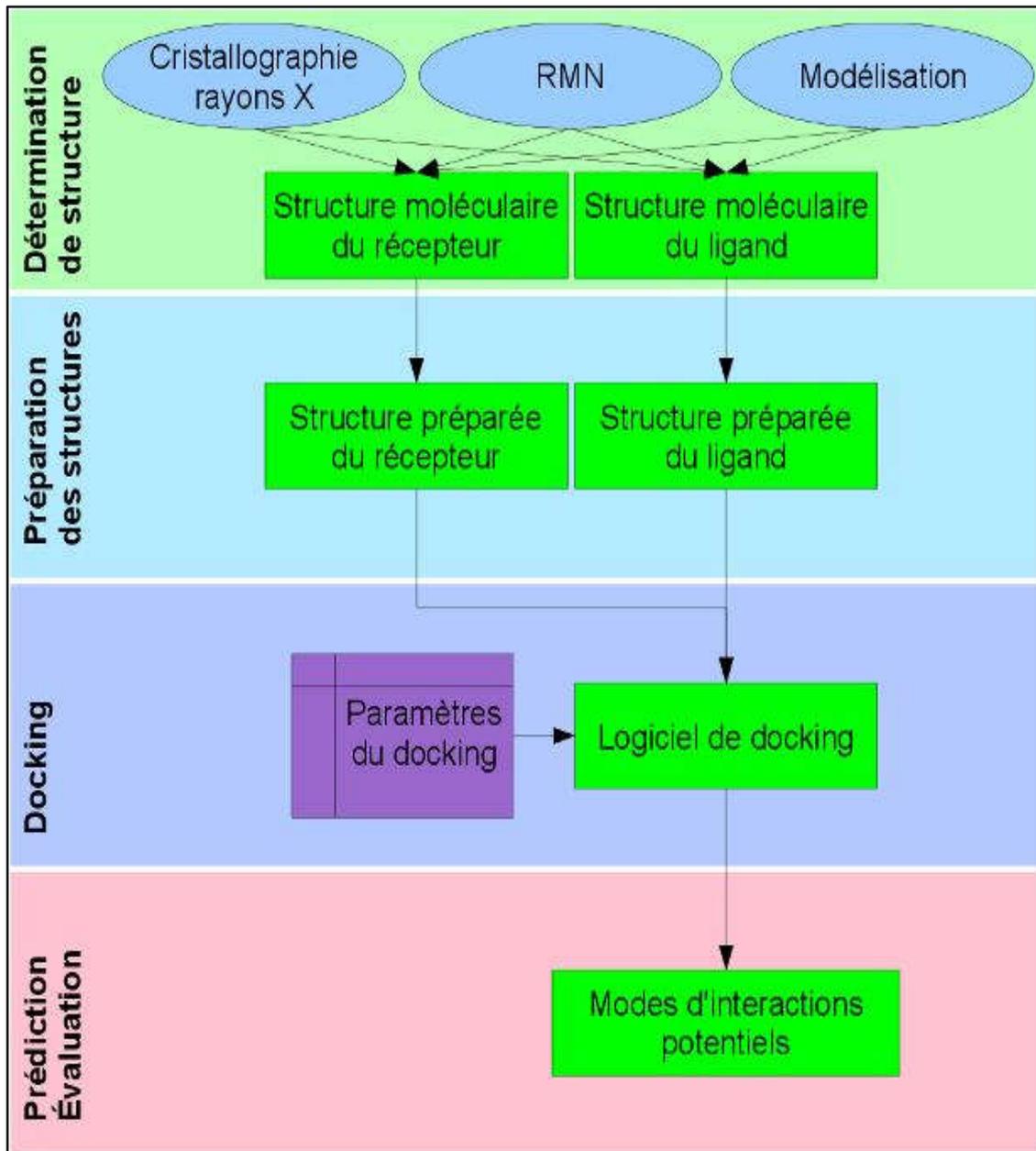


Figure 4. Les étapes typiques d'un docking. (Morris & Lim-Wilby, 2008)

## 5. 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.

### **5.1. 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. ([Study et al., 2022](#))

### **5.2. 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.

### **5.3. 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**.(Singh & Villoutreix, 2022)

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

$$\mathbf{GOLD\ Fitness = Shb\_ext + Svdw\_ext + Shb\_int + Svdw\_int}$$

- **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.(Site *et al.*, 2021)

## **Chapitre II :**

*Matériel*

*et*

*méthodes*

## Matériel

### 1. Microordinateur

Dans notre étude, nous avons utilisé une station puissante (processeur Intel Core I7 2.8 GHz, 8 Go de RAM, plateforme: Windows(10. Les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows10 (64bits).

### 2. Programmes

#### 2.1. PyMOL

PyMOL est un logiciel de visualisation moléculaire, utilisé pour visualiser les structures des protéines étudiées. Il s'agit d'un logiciel libre et gratuit, géré et distribué par Schrödinger, est téléchargeable sur le site <http://pymol.sourceforge.net>. Il est disponible pour les systèmes d'exploitation Linux, Mac OS et Windows. 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. (Pymol, 2015)

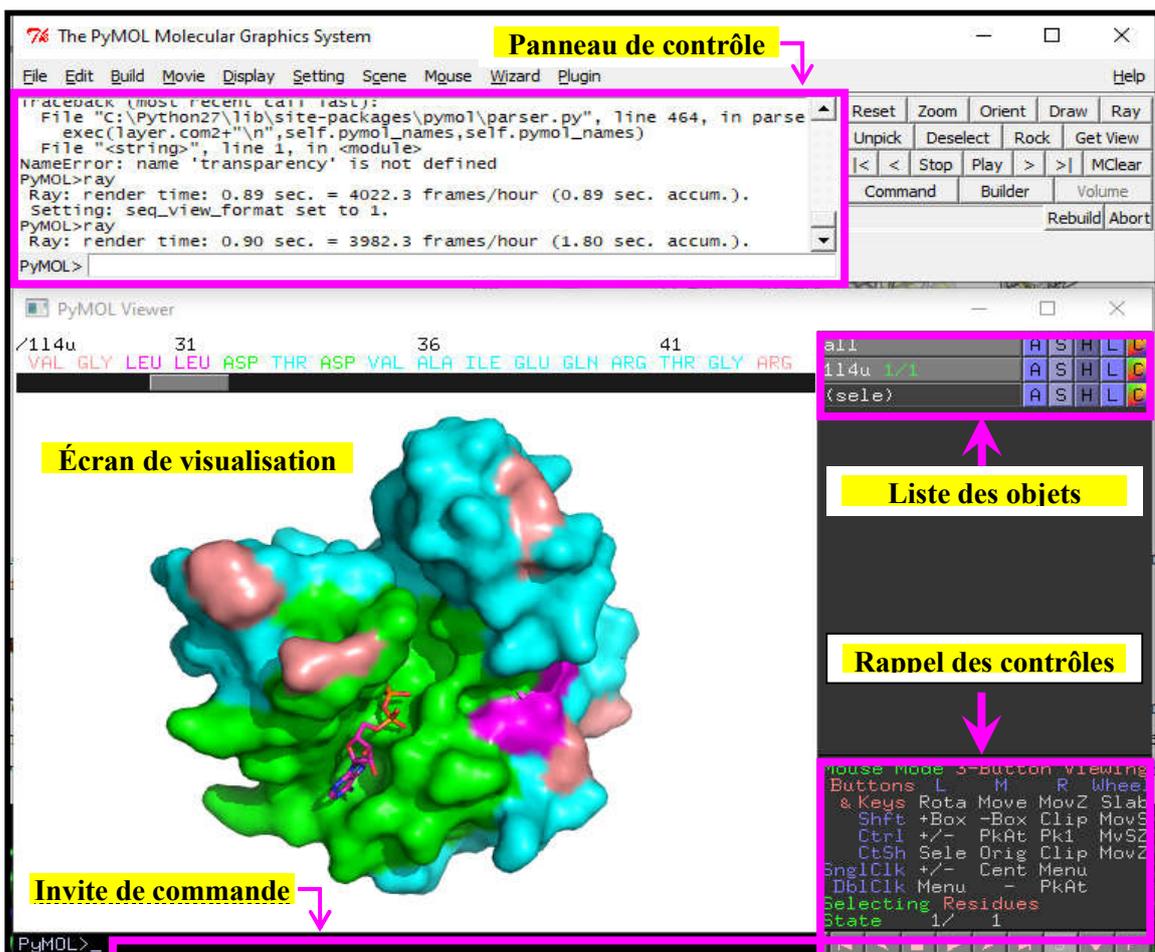


Figure 5.L'interface graphique du logiciel *Pymol*

## 2.2. GOLD

Est un programme commercial de docking développé par “Cambridge Crystallographic Data Center” (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/>). Il est basé sur trois parties majeures: un algorithme génétique pour explorer les possibilités de modes de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site actif et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison. La population constituant la première solution est obtenue aléatoirement. (Study *et al.*, 2022)

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

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.

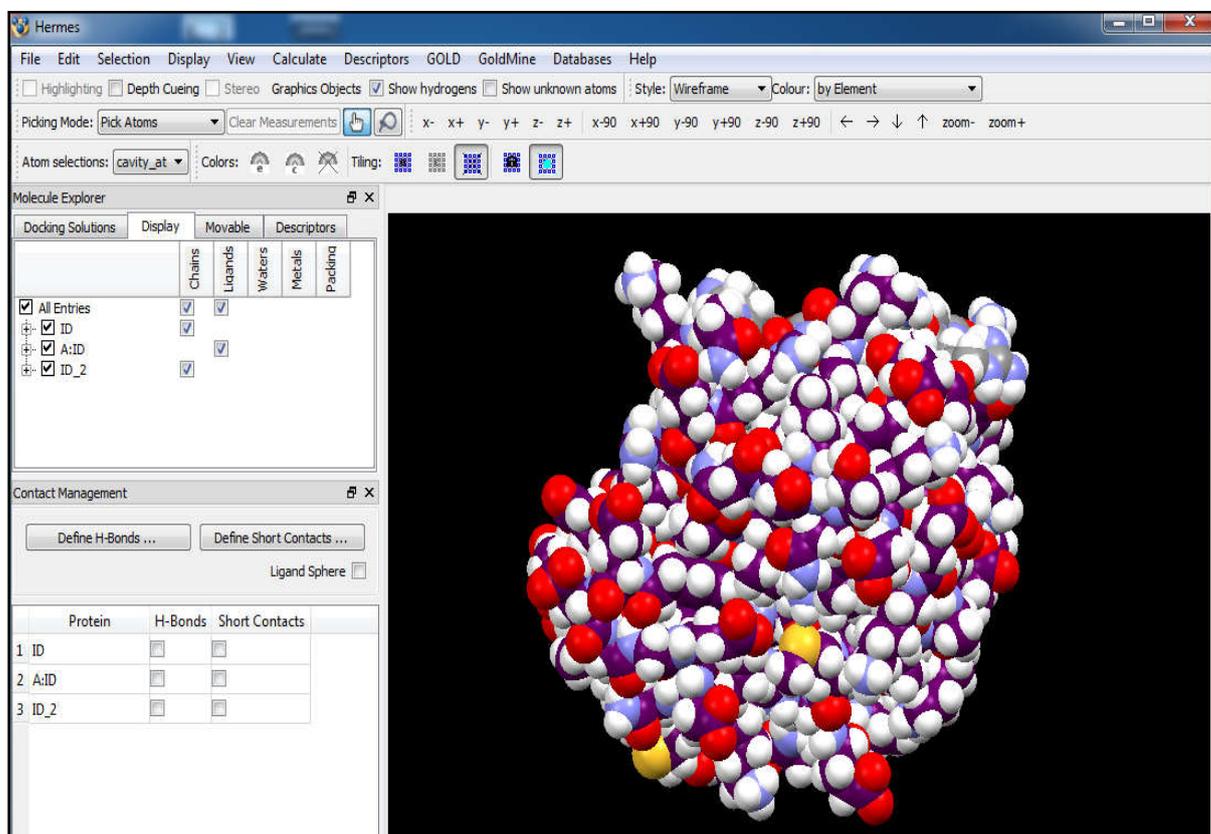


Figure 6. L'interface graphique du GOLD.

### 3. Les banques des données

#### 3.1. La banque de données protéiques (PDB)

En bioinformatique, les banques de données sont utilisées pour stocker et organiser les données. Beaucoup de ces entités collectent des séquences d'ADN et d'ARN à partir d'articles scientifiques et de projets sur le génome. De nombreuses bases de données sont entre les mains de consortiums internationaux. Pour s'assurer que les données de séquences sont librement disponibles, les revues scientifiques exigent que les nouvelles séquences nucléotidiques soient déposées dans une base de données accessible au public comme condition de publication d'un article. (Des conditions similaires s'appliquent aux structures d'acide nucléique et de protéine.) La principale base de données de la structure macromoléculaire biologique est la banque mondiale de données sur les protéines (ww.PDB), un effort conjoint du Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) aux États-Unis, de la Protein Data Bank Europe (PDBe) de l'Institut européen de bioinformatique dans le Royaume-Uni et la Protein Data Bank Japan de l'Université d'Osaka. La PDB est la principale source de données de biologie structurale et permet surtout d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique.

The screenshot shows the RCSB PDB website interface for entry 1L4U. The main content area includes a 3D ribbon diagram of the protein structure, a title 'CRYSTAL STRUCTURE OF SHIKIMATE KINASE FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN COMPLEX WITH MGADP AND PT(II) AT 1.8 ANGSTROM RESOLUTION', and various metadata fields such as Classification (TRANSFERASE), Organism(s) (Mycobacterium tuberculosis), and Experimental Data Snapshot (Method: X-RAY DIFFRACTION, Resolution: 1.80 Å). A wwPDB Validation report is also visible, showing percentile ranks for Rfree (0.246), Clashscore (10), Ramachandran outliers (0.6%), and Sidechain outliers (1.6%).

Figure 7. L'interface graphique du site web de la base de données PDB.

### 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 nationale de sous l'autorité de la *National Institutes of Health* (NIH) (Kim *et al.*, 2016)

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.

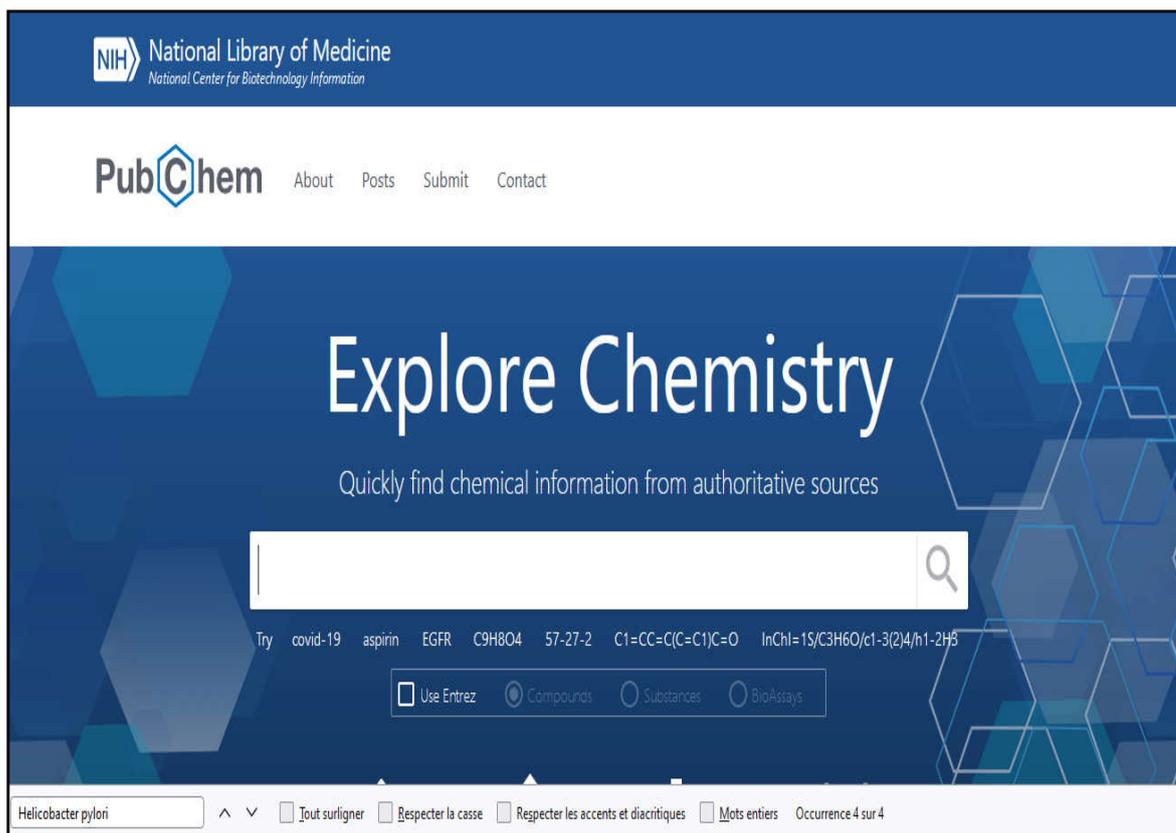


Figure 8. L'interface graphique du site web de la base de données PubChem.

### 4. Structure de la Shikimate kinase utilisée

Vingt-et-un structures tridimensionnelles pour la Shikimate kinase de *Mycobacterium tuberculosis* sont disponibles sur la PDB, identifiées par les codes : 2IYV, 2IYS, 2IYT, 2IYX, 2IYY, 2G1K, 1L4U, 2IYQ, 2IYU, 2IYW, 2DFN, 2IYR, 1L4Y, 2G1J, 1U8A, 4BQS, 3BAF, 2IYZ, 1WE2, 2DFT, 1ZYU.

Nous avons choisi celle portant le code **1L4U** car elle constitue un compromis entre une bonne résolution (1.80 Å) et la présence d'un ligand cocrystallisé (ADP).

Les caractéristiques de ces enzymes sont regroupées dans le tableau 2 ci-dessous.

**Tableau 2:** Structure des Shikimate kinase de *Mycobacterium tuberculosis* disponible dans la PDB.

Code PDB	Résolution	Ligand cocristallisé	Référence
2IYV	1.35 Å	ADP	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
2IYS	1.40 Å	Shikimate-3phosphate	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
2IYT	1.47 Å	Aucune	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
2IYX	1.49 Å	Shikimate-3phosphate	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
2IYY	1.62 Å	Shikimate-3-phosphate	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
2G1K	1.75 Å	Shikimate-3phosphate	(Gu <i>et al.</i> , 2002)
1L4U	1.80 Å	ADP	(Gu <i>et al.</i> , 2002)
2IYQ	1.80 Å	Shikimate-3phosphate et ADP	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
2IYU	1.85 Å	ADP	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
2IYW	1.85 Å	ATP	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
2DFN	1.93 Å	Shikimate-3phosphate et ADP	(Dias <i>et al.</i> , 2007)
2IYR	1.98 Å	Shikimate-3phosphate	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
1L4Y	2.00 Å	ADP	(Gu <i>et al.</i> , 2002)
2G1J	2.00 Å	Aucune	(Gan <i>et al.</i> , 2006)
1U8A	2.15 Å	Shikimate-3phosphate et ADP	(Dhaliwal <i>et al.</i> , 2004)
4BQS	2.15 Å	Shikimate-3phosphate et ADP	(Blanco <i>et al.</i> , 2013)
3BAF	2.25 Å	Ester d'adénylate d'acide phosphométhylphosphonique et ADP	Faim <i>et al.</i> , 2008
2IYZ	2.30 Å	Shikimate-3phosphate et ADP	(Hartmann <i>et al.</i> , 2006)
1WE2	2.30 Å	Shikimate-3phosphate et ADP	(Pereira <i>et al.</i> , 2004)
2DFT	2.80 Å	ADP	(Pereira <i>et al.</i> , 2004)
1ZYU	2.90 Å	Ester d'adénylate d'acide phosphométhylphosphonique et Shikimate-3phosphate	(Gan <i>et al.</i> , 2006)

## Méthodes

### 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.

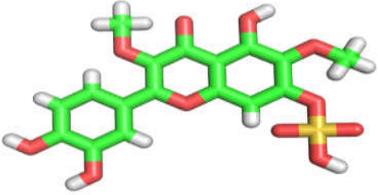
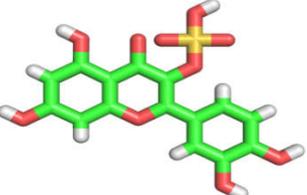
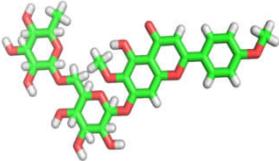
## 2. Préparation des ligands

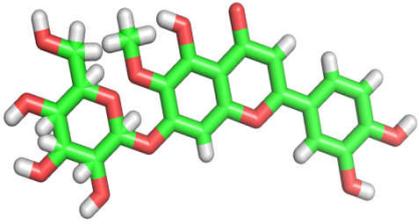
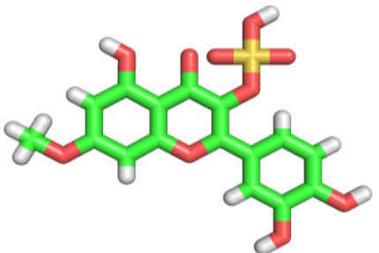
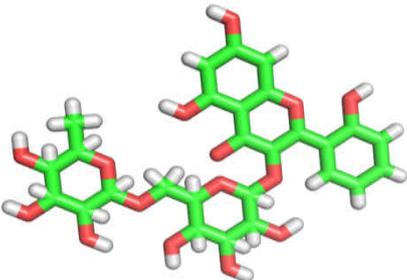
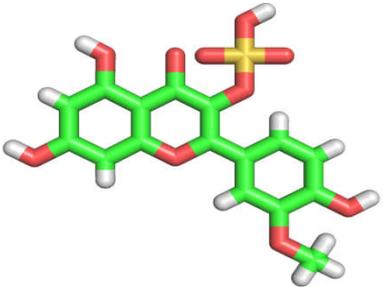
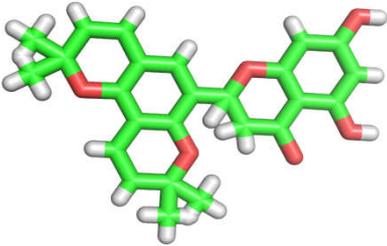
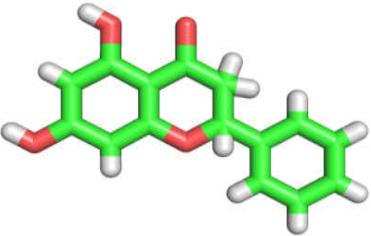
Les structures des 42 flavonoïdes retenues pour le docking : Axillarin7-sulfate, Pinocembrin, Rutin, Isosaponarin, Caflanone, Neohesperidin, Nicotiflorin, Flavonoid LP, Isorhamnetin 3-glucuronide, Curcumin, Quercetin 3-glucuronide, Amorphin, Flavonoid Ip, Icariin, Kaempferol 3-glucuronide, Garcinia biflavonoid, Lonicerin, Artocarpin, kurzichalcolactone, Naringin, Kaempferol, Myricitrin, Morin, Elatin, Isoquercitrin, Laricitrin, Astragalin, Apigenidin, Icaritin, Epigallocatechin Gallate, Baicalein, Catechin, Epicatechin, Acacetin, Sakuranetin, Propolis neoflavonoid, Quercetin 3-sulfate, Pectolarine, Nepitrin, Rhamnetin 3-O-sulfate, Datiscin, Persicarin, Sanggenol O 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).

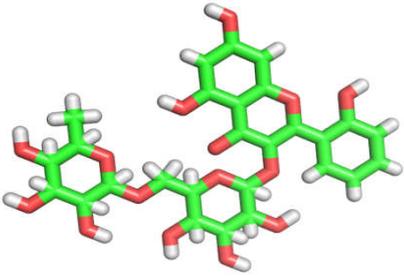
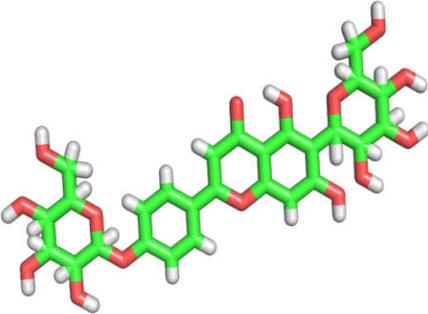
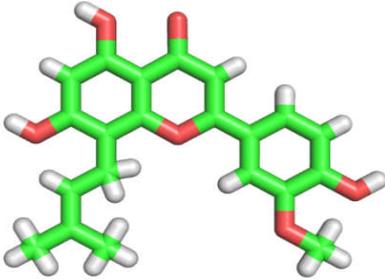
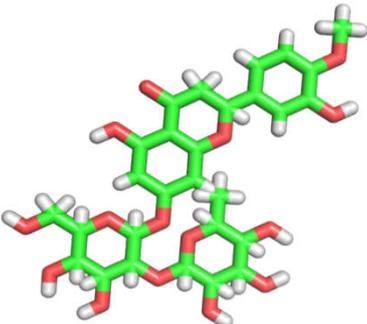
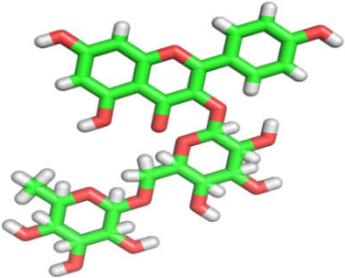
Les structures ont été converties au format 3D par le programme **LigPrep**. Elles sont ensuite transformées dans le format **mol2** par l'intermédiaire du programme disponible gratuitement **mol2mol**.

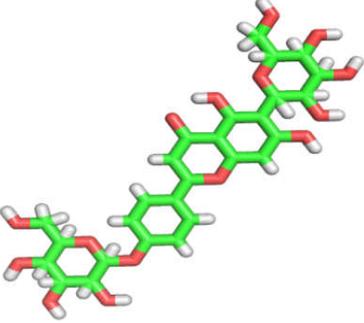
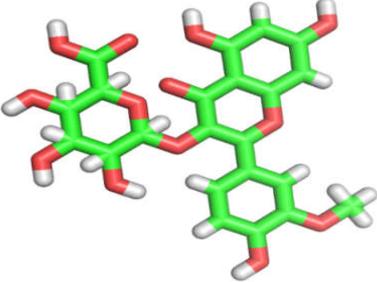
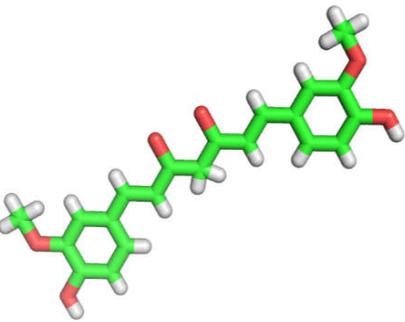
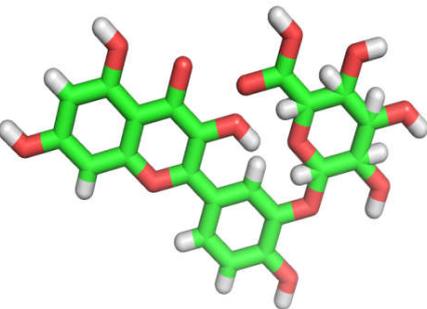
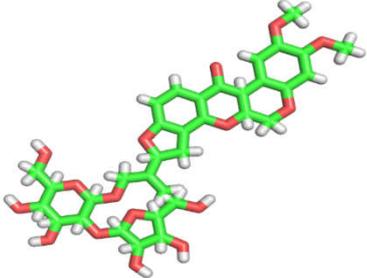
Toutes les structures chimiques des composés ligands utilisés dans l'étude ont montré sur le tableau 3.

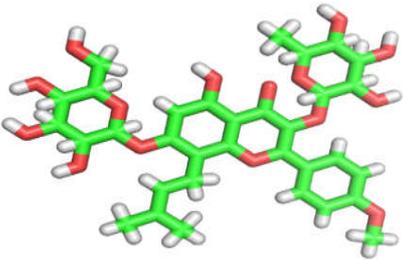
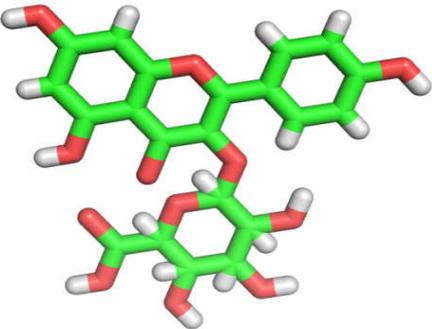
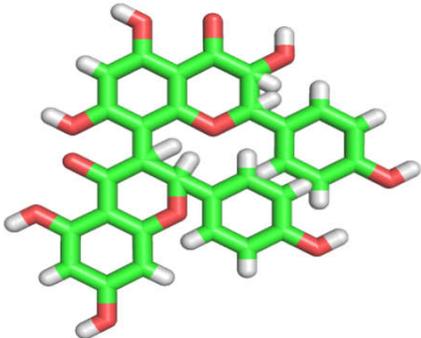
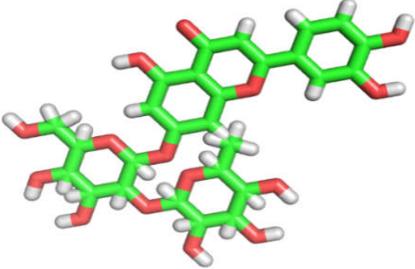
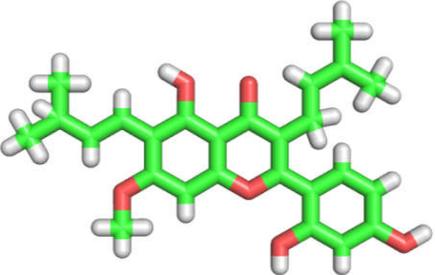
**Tableau 3.** Représentation des structures 2D et les formules des flavonoïdes.

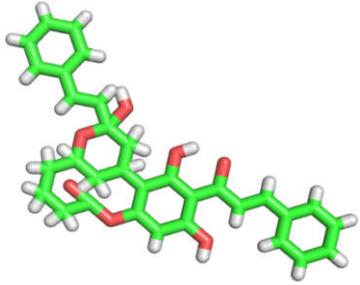
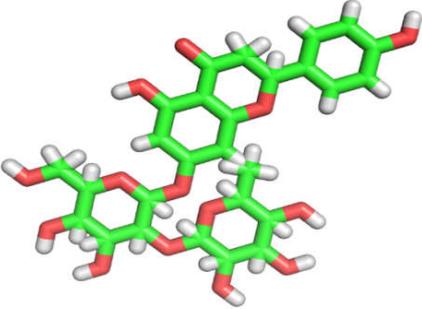
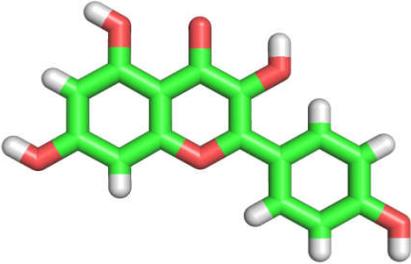
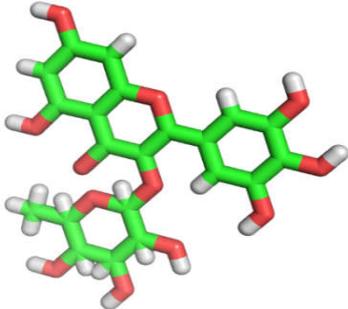
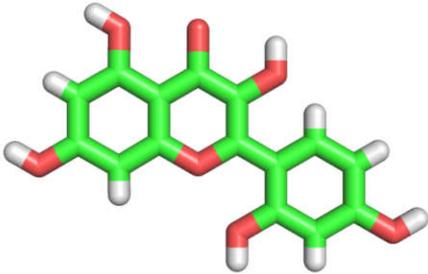
Structures 2D	Formule	Nom des flavonoïdes
	$C_{17}H_{14}O_{11}S$	<b>Axillarin 7-sulfate</b>
	$C_{15}H_{10}O_{10}S$	<b>Quercetin 3-sulfate</b>
	$C_{29}H_{34}O_{15}$	<b>Pectolarine</b>

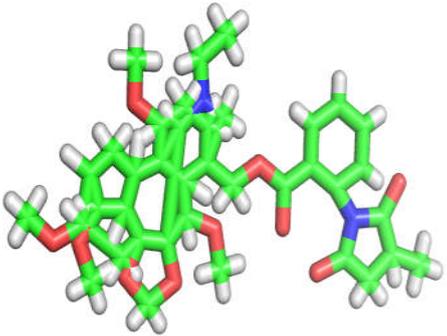
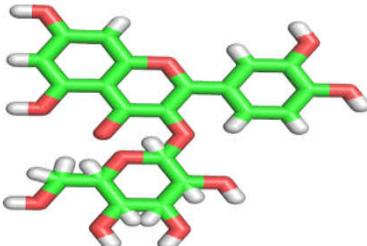
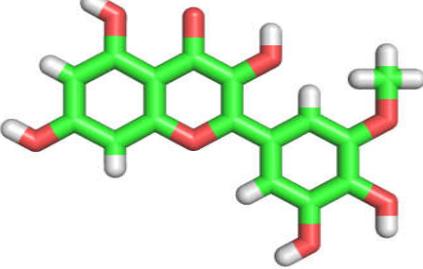
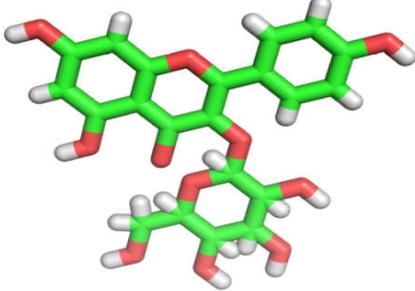
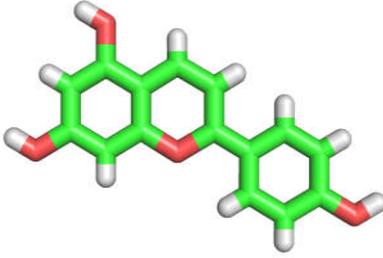
	$C_{22}H_{22}O_{12}$	<b>Nepitrin</b>
	$C_{16}H_{12}O_{10}S$	<b>Rhamnetin3-O-sulfate</b>
	$C_{27}H_{30}O_{15}$	<b>Datiscin</b>
	$C_{16}H_{12}O_{10}S$	<b>Persicarin</b>
	$C_{25}H_{24}O_6$	<b>Sanggenol O</b>
	$C_{15}H_{12}O_4$	<b>Pinocembrin</b>

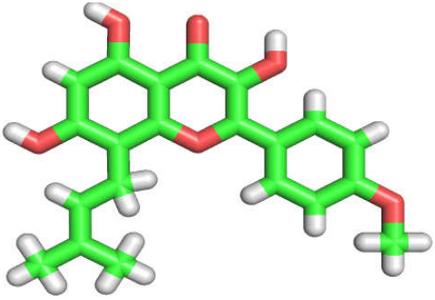
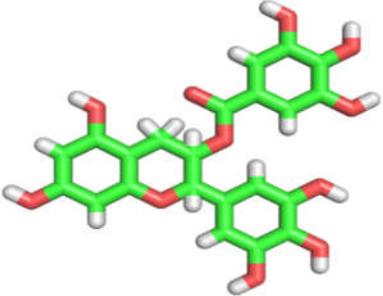
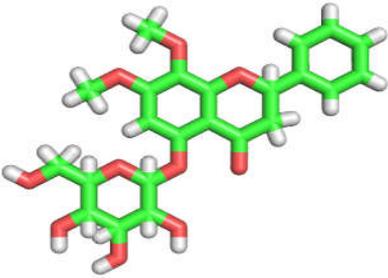
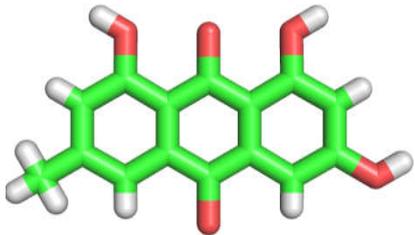
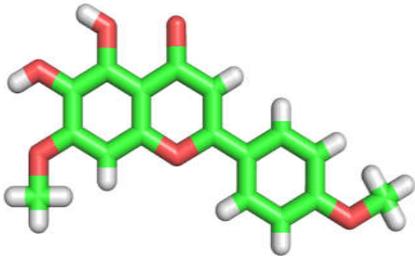
	<p><math>C_{27}H_{30}O</math></p>	<p><b>Rutin</b></p>
	<p><math>C_{27}H_{30}O_{15}</math></p>	<p><b>Isosaponarin</b></p>
	<p><math>C_{21}H_{20}O_6</math></p>	<p><b>Caflanone</b></p>
	<p><math>C_{28}H_{34}O_{15}</math></p>	<p><b>Neohesperidin</b></p>
	<p><math>C_{27}H_{30}O_{15}</math></p>	<p><b>Nicotiflorin</b></p>

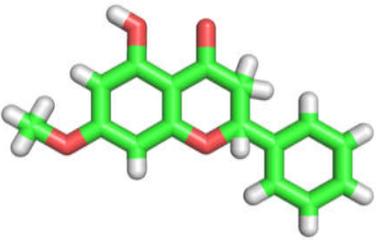
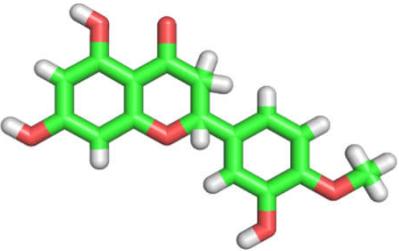
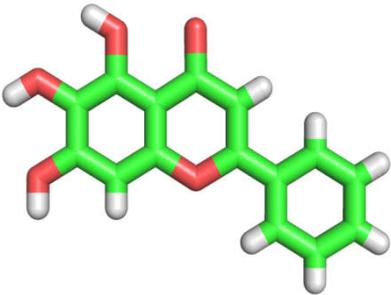
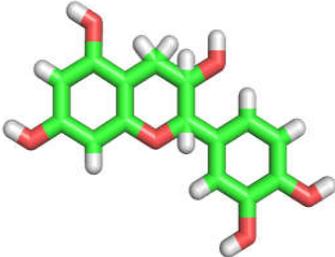
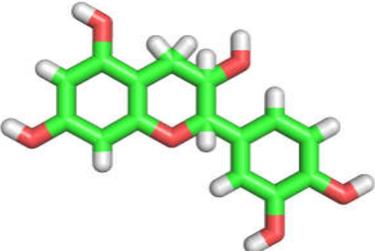
	$C_{27}H_{30}O_{15}$	<b>Flavonoid LP</b>
	$C_{22}H_{20}O_{13}$	<b>Isorhamnetin 3- _glucuronide</b>
	$C_{21}H_{20}O_6$	<b>Curcumin</b>
	$C_{21}H_{18}O_{13}$	<b>Quercetin_3-glucuronide</b>
	$C_{34}H_{40}O_{16}$	<b>AmorphinFlavonoid</b>

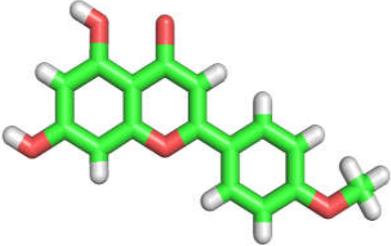
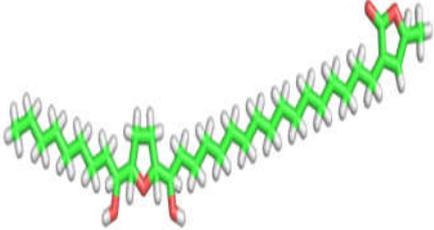
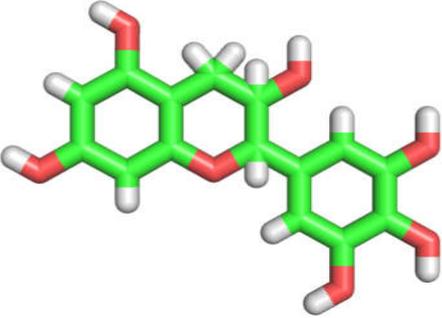
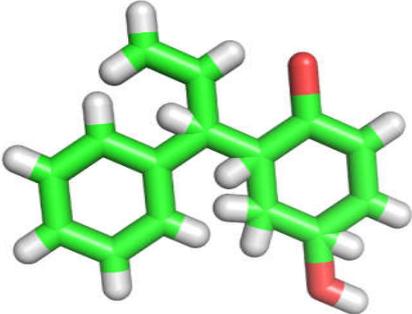
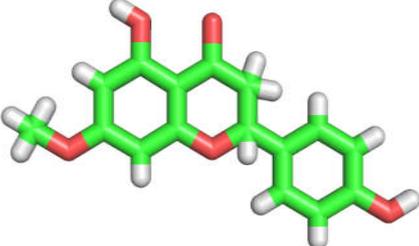
	$C_{33}H_{40}O_{15}$	<b>Icariin</b>
	$C_{21}H_{18}O_{12}$	<b>Kaempferol 3-glucuronide</b>
	$C_{30}H_{22}O_{12}$	<b>Garcinia biflavonoid</b>
	$C_{27}H_{30}O_{15}$	<b>Lonicerin</b>
	$C_{26}H_{28}O_6$	<b>Artocarpin</b>

	$C_{32}H_{30}O_7$	<b>kurzichalcolactone</b>
	$C_{27}H_{32}O_{14}$	<b>Naringin</b>
	$C_{15}H_{10}O_6$	<b>Kaempferol</b>
	$C_{21}H_{20}O_{12}$	<b>Myricitrin</b>
	$C_{15}H_{10}O_7$	<b>Morin</b>

	<p><math>C_{38}H_{50}NO_{10}</math></p>	<p><b>Elatin</b></p>
	<p><math>C_{21}H_{20}O_{12}</math></p>	<p><b>Isoquercitrin</b></p>
	<p><math>C_{16}H_{12}O_8</math></p>	<p><b>Laricitrin</b></p>
	<p><math>C_{21}H_{20}O_{11}</math></p>	<p><b>Astragalin</b></p>
	<p><math>C_{15}H_{10}O_4</math></p>	<p><b>Apigenidin</b></p>

	<p><math>C_{15}H_{11}O_6</math></p>	<p><b>Icaritin</b></p>
	<p><math>C_{22}H_{18}O_{11}</math></p>	<p><b>Epigallocatechin Gallate</b></p>
	<p><math>C_{23}H_{26}O_{10}</math></p>	<p><b>Andrographidin A</b></p>
	<p><math>C_{15}H_{10}O_5</math></p>	<p><b>Emodin</b></p>
	<p><math>C_{17}H_{14}O_6</math></p>	<p><b>Ladanein</b></p>

	$C_{16}H_{14}O_4$	<p><b>Pinocembrin-7-methylether</b></p>
	$C_{16}H_{14}O_6$	<p><b>Hesperetin</b></p>
	$C_{15}H_{10}O_5$	<p><b>Baicalein</b></p>
	$C_{15}H_{14}O_6$	<p><b>Catechin</b></p>
	$C_{15}H_{14}O_6$	<p><b>Epicatechin</b></p>

	<p><math>C_{16}H_{12}O_5</math></p>	<p><b>Acacetin</b></p>
	<p><math>C_{35}H_{64}O_5</math></p>	<p><b>Laurifolin</b></p>
	<p><math>C_{15}H_{14}O_7</math></p>	<p><b>Epigallocatechin</b></p>
	<p><math>C_{15}H_{16}O_2</math></p>	<p><b>Propolis neoflavonoid</b></p>
	<p><math>C_{16}H_{14}O_5</math></p>	<p><b>Sakuranetin</b></p>

### **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 ***Load Protein***.

Les étapes suivantes sont nécessaires :

#### **3.1. Addition des hydrogènes**

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

#### **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.

#### **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*.

#### **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.

#### **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*.

### 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.

### 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 *FinishedDocking Ligand* apparaîtra dans la fenêtre *RunGOLD*. 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*).

## 4. Règle de Lipinski

Chaque médicament éventuel doit de se conformer à plusieurs critères de base, tel son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité. Dans ce contexte, « la règle de 5 » communément appelé «règle de **LIPINSKI**» permet de déterminer si un composé chimique ayant des propriétés médicamenteuses est susceptible d'être administré par voie orale chez les humains. Selon cette règle, un composé est capable d'être administré par voie orale s'il remplit au moins trois (3) critères des cinq suivants :

- ↗ Un poids moléculaire  $\leq 500$ g/mol.
- ↗ Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène un maximum de 5 ( $\leq 5$ ).

↪ Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène un maximum de 10 ( $\leq 10$ ).

↪ Le nombre de fonctions rotatives (flexibles et linéaires)  $\leq 15$

↪ Un coefficient de partition (logP) ou une lipophile  $\leq 5$ .

•**LogP** est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau.

Le  $\text{LogP} = \text{Log}(C_{\text{ oct }} / C_{\text{ eau }})$ , doit être compris entre -2 et 5. Cette valeur permet de déterminer le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. S'il est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement (Ntie-Kang, 2013).

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur **Molinspiration** se trouvant en réalisant les étapes suivantes sur le site web :

<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>

↪ Ouverture du site web indiqué au-dessus.

↪ Entrer l'inhibiteur dans la case « **Enter SMILES** ».

↪ Click sur le bouton « **calculate properties** ».

## **Chapitre III :**

*Résultats*

*et*

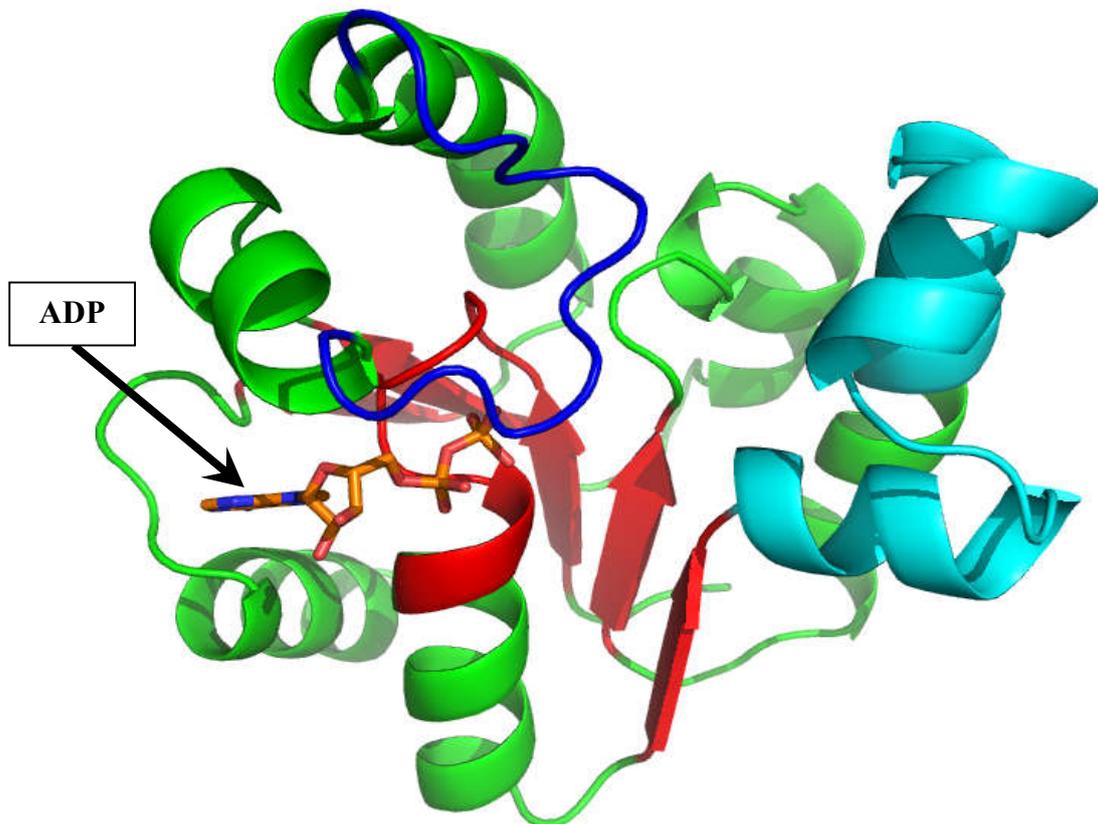
*discussion*

## Résultats et discussion

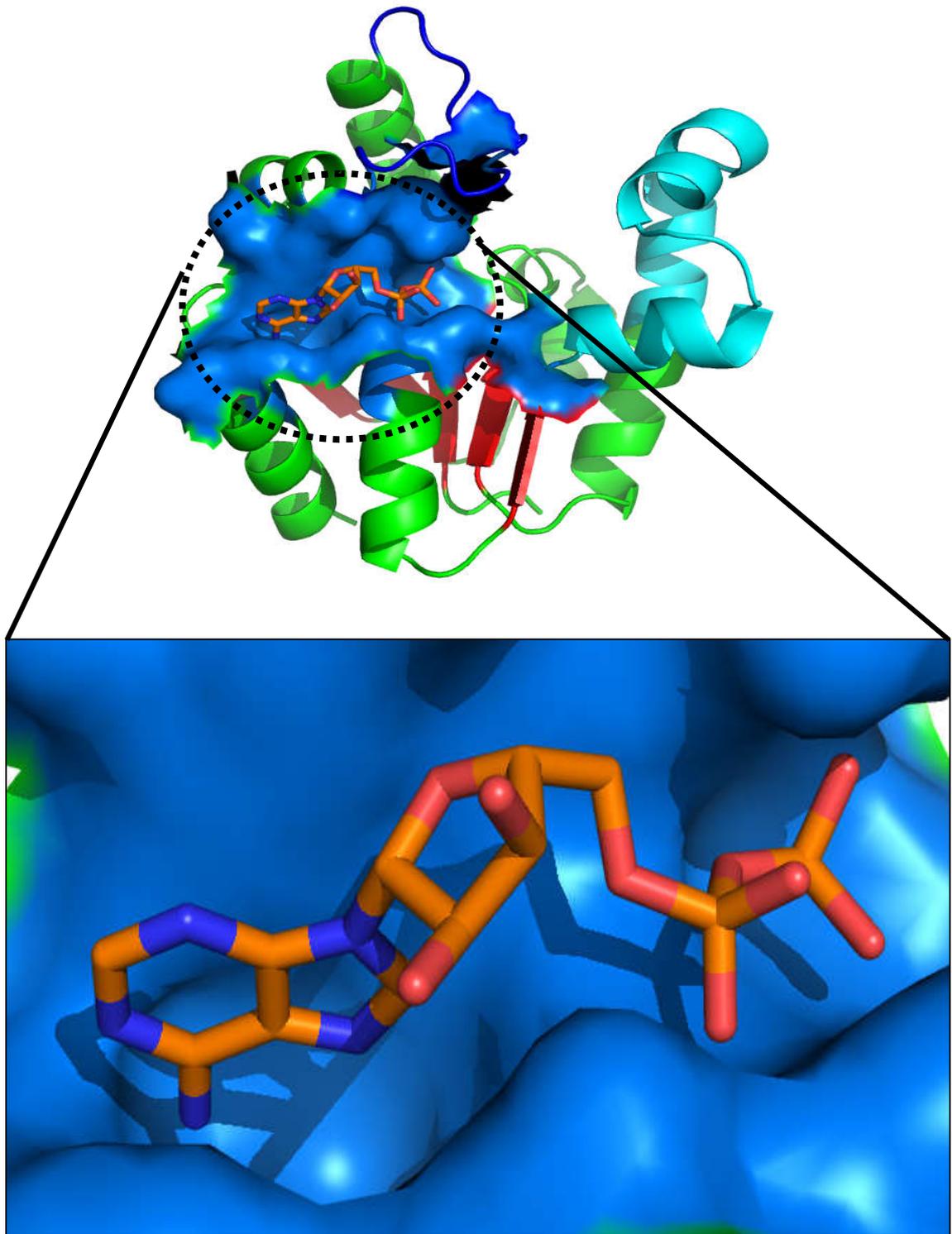
### 1. Description structurale de la Shikimate kinase bactérienne

La Shikimate kinase appartient à la famille des kinases nucléosidiques monophosphates (NMP). Le cœur de sa structure (Fig. 9, code PDB : **1L4U**, résolution 1.8 Å) est composé de cinq feuillets  $\beta$  parallèles entourée de huit hélices  $\alpha$ .

La Shikimate kinase se compose de trois domaines : (1) le domaine CORE contenant les cinq feuilles  $\beta$  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. (Ojeda-May, 2022)



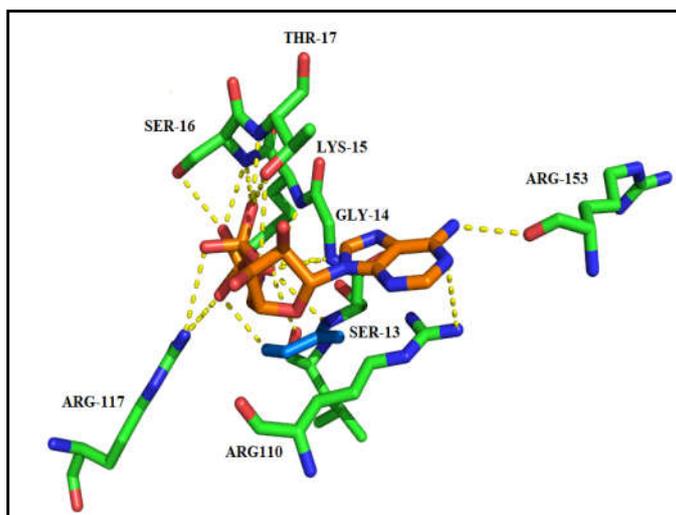
**Figure 9.** Modèle tridimensionnel de la Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis*, le **domaine CORE en rouge**, le **domaine LID en bleu**, et le **domaine de liaison au substrat(SB) en bleu ciel**, (code pdb : **1L4U**). Le substrat cocrystallisé (ADP) est démontrés en sticks (les atomes de carbones colorés en orange. Image générée par *PyMOL*.



**Figure 10.** Modèle tridimensionnel de la Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis*, avec le site catalytique marqué (la région bleu marine). (Code PDB 1L4U). Le substrat cocrystallisé (ADP) est démontrés en sticks (les atomes de carbones colorés en bleu). Image générée par PyMOL.

A l'aide du programme **PyMOL**, nous avons pu définir les résidus de la cavité catalytique de la Shikimate kinase (Code PDB :**1L4U**) en visualisant ceux entourant ligand ADP dans un périmètre de 6Å.

La figure (11) montre les résidus du site actif de la Shikimate kinase en complexe avec le ligand ADP, ces résidus sont : SER13, GLY14, LYS15, THR16, THR17, ARG110, ARG117, ARG153.



**Figure 11.** Mode de liaison de la ADP avec le site actif de **Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis*** (code pdb : **1L4U**). Les résidus entourant le site actif sont démontrés en vert. Image générée par *PyMOL*.

## 2. 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.

## 2.1. Le test RMSD

La déviation quadratique moyenne ou RMSD (*root mean-square dérivation*) est la mesure de la distance moyenne entre les atomes des molécules superposées. Il est souvent utilisé pour valider le protocole du docking en comparant la conformation d'un complexe protéine-ligand conçu par le logiciel du docking vis-à-vis de la conformation cristallographique de référence (observée expérimentalement). Un seuil maximal de 2Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne position d'une mauvaise position (Castro-Alvarez *et al.*, 2017)

Dans notre cas, le test de fiabilité du programme GOLD par le RMSD a été réalisé sur le complexe de la Shikimate kinase 1L4U. (Le tableau N°01).

**Tableau 4.** Valeur de RMSD de complexe Shikimate kinase -ligand étudié

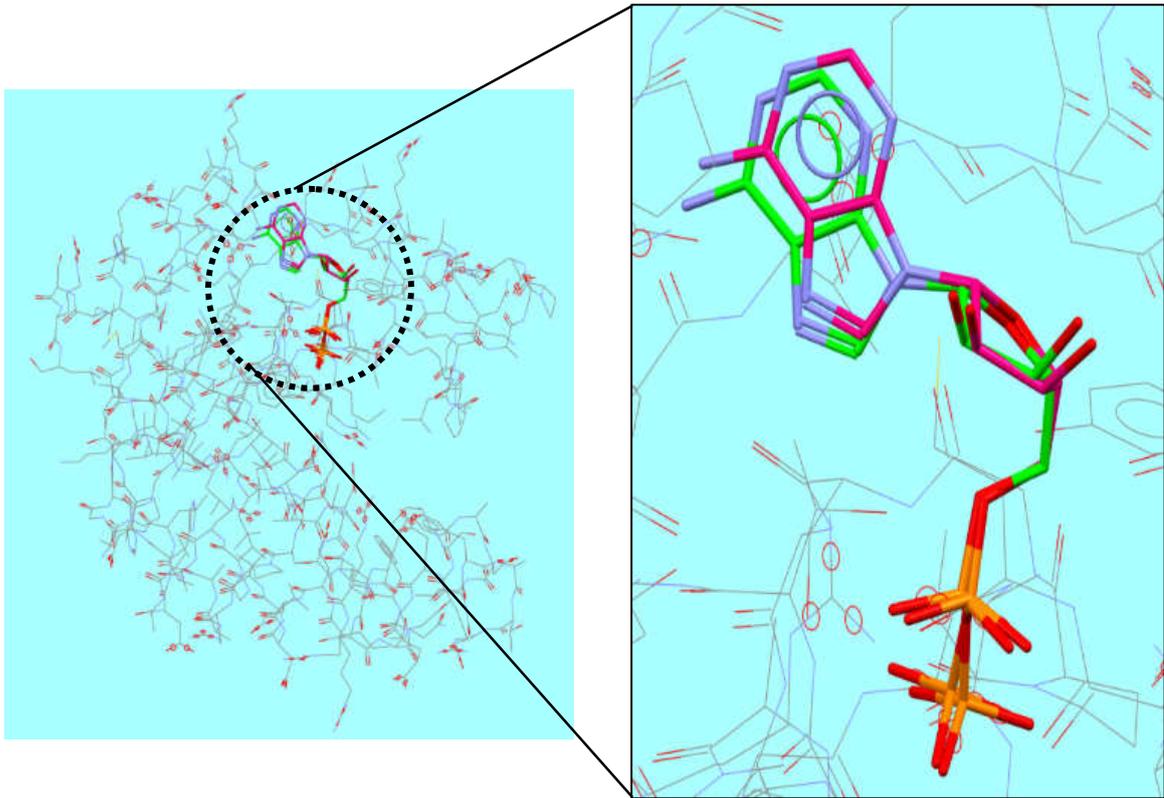
Code PDB	Ligand co-cristallisé	RMSD(Å)
1L4U	ADP	0.550

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.

## 2.2. L'analyse visuelle

Pour confirmer les résultats du RMSD, l'analyse visuelle par GOLD permet de déterminer si un ligand simulé se superpose avec le ligand cocrystallisé. (Figures 12).



**Figure 12.** Superposition des géométries de l'ADP donnée par rayons X (carbone coloré en vert) et par docking avec GOLD (carbone coloré en rose). (Code pdb **1L4U**. RMSD = 0.550 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 du *Mycobacterium tuberculosis*. Il présente une conformation spatiale très proche voir même superposable à celle déterminé expérimentalement par cristallographie qu'on retrouve dans la PDB.

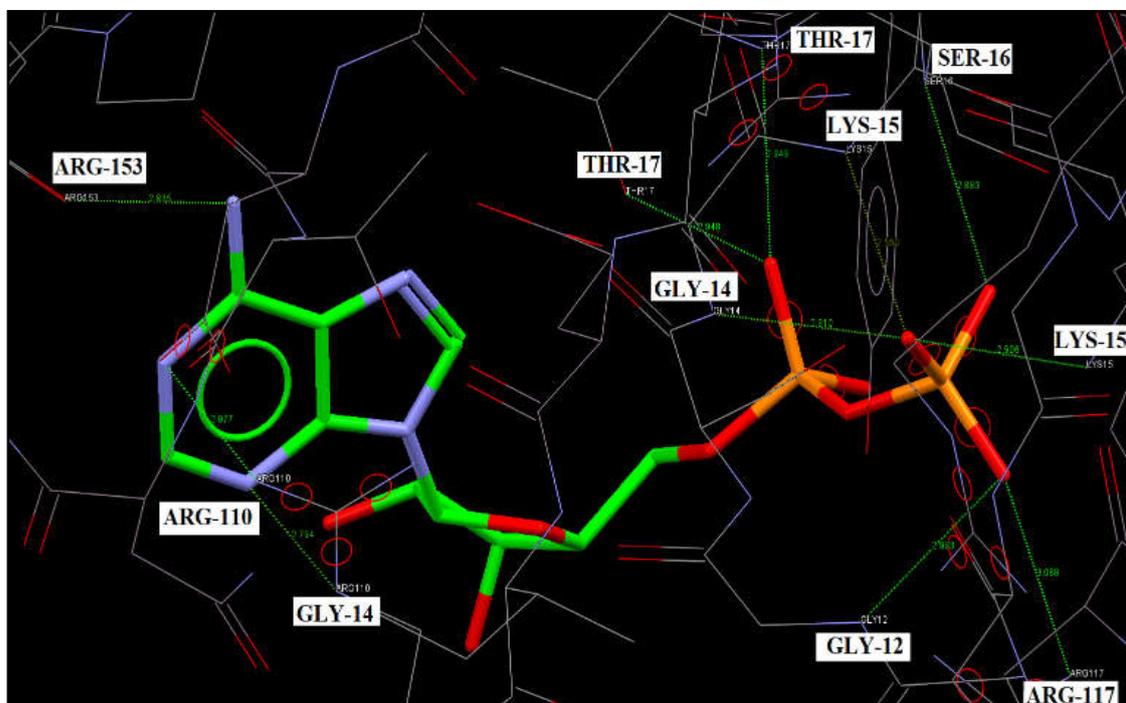
### 3. Le docking des diverses molécules sur le récepteur 1L4U par GOLD

#### 3.1. Le complexe Shikimate kinase-ligand (ADP)

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 onze liaisons hydrogènes grâce aux acides aminés suivant : GLY12, GLY 14, LYS 15, SER 16, THR17, ARG110, ARG 117, ARG 153.(Tableau 5 et figure 13).

**Tableau 5.** Les interactions hydrogènes entre la Shikimate kinase et le ADP.

Résidus impliqués	Atome du Résidus	Atome du ligand	Distance (Å)
GLY12	N	O	2.993
GLY 14	O	O	2.810
LYS 15	O	O	2.906
	O	O	2.550
SER 16	N	O	2.883
THR17	N	O	2.949
THR17	O	O	2.948
ARG110	N	N	2.977
	N	N	2.794
ARG 117	N	O	3.068
ARG 153	O	N	2.835



**Figure 13.** Mode de liaison de la ADP avec le site actif de la Shikimate kinase (code pdb : 1L4U). 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.

### 3.2. Le docking des différents flavonoïdes sur le récepteur 1L4U

Le docking de **42 flavonoïdes** est effectué sur la structure de la protéine cocrystallisée avec l'ADP.

Nous avons jugé intéressant de tester ces flavonoïdes, de comparer leurs scores (GOLD score) par rapport au ligand cocrystallisé (**ADP**), pour proposer le meilleur inhibiteur de l'enzyme Shikimate kinase. Les résultats de docking sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Résultats de docking avec le programme GOLD.

	Molécules	GOLD score (Kcal/mol)
1	ADP (ligand cocrystallisé)	100.82
2	Axillarin7-sulfate	87.27
3	Quercetin3-sulfate	84.75
4	Pectolarine	81.66
5	Rhamnetin 3-O-sulfate	71.03
6	Nepitrin	69.50
7	Datiscin	69.56
8	Persicarin	67.91
9	Sanggenol O	67.44
10	Pinoembrin	67.02
11	Rutin	65.68
12	Isosaponarin	65.54
13	Caflanone	65.30
14	Neohesperidin	64.12
15	Nicotiflorin	63.18
16	Flavonoid LP	62.93
17	Isorhamnetin 3-glucuronide	62.04
18	Curcumin	61.78
19	Quercetin 3-glucuronide	60.38
20	AmorphinFlavonoid	60.08
21	Icariin	60.05
22	Kaempferol 3-glucuronide	59.65
23	Garcinia biflavonoid	57.47
24	Lonicerin	57.65
25	Artocarpin	56.35

26	kurzichalcolactone	56.03
27	Naringin	55.11
28	Kaempferol	56.10
29	Myricitrin	55.77
30	Morin	55.50
31	Elatin	55.44
32	Isoquercitrin	55.40
33	Laricitrin	55.33
34	Astragalin	55.23
35	Apigenidin	54.32
36	Icaritin	53.01
37	Epigallocatechin Gallate	51.77
38	Baicalein	49.35
39	Catechin	49.20
40	Epicatechin	49.54
41	Acacetin	49.78
42	Sakuranetin	49.55
43	Propolis neoflavonoid	48.44

Parmi les complexes qui figurent dans le tableau 6, 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 (cocristallisé).

**L'Axillarine 7-sulfate et la Quercetin 3-sulfate** ayant des Goldscore excellents : **(87.27 Kcal/mol et 84.85 Kcal/mol)** respectivement (le score de ligand cocristallisé ADP est **100.82 Kcal/mol**), pourraient avoir une activité potentielle très puissante contre la Shikimate kinase.

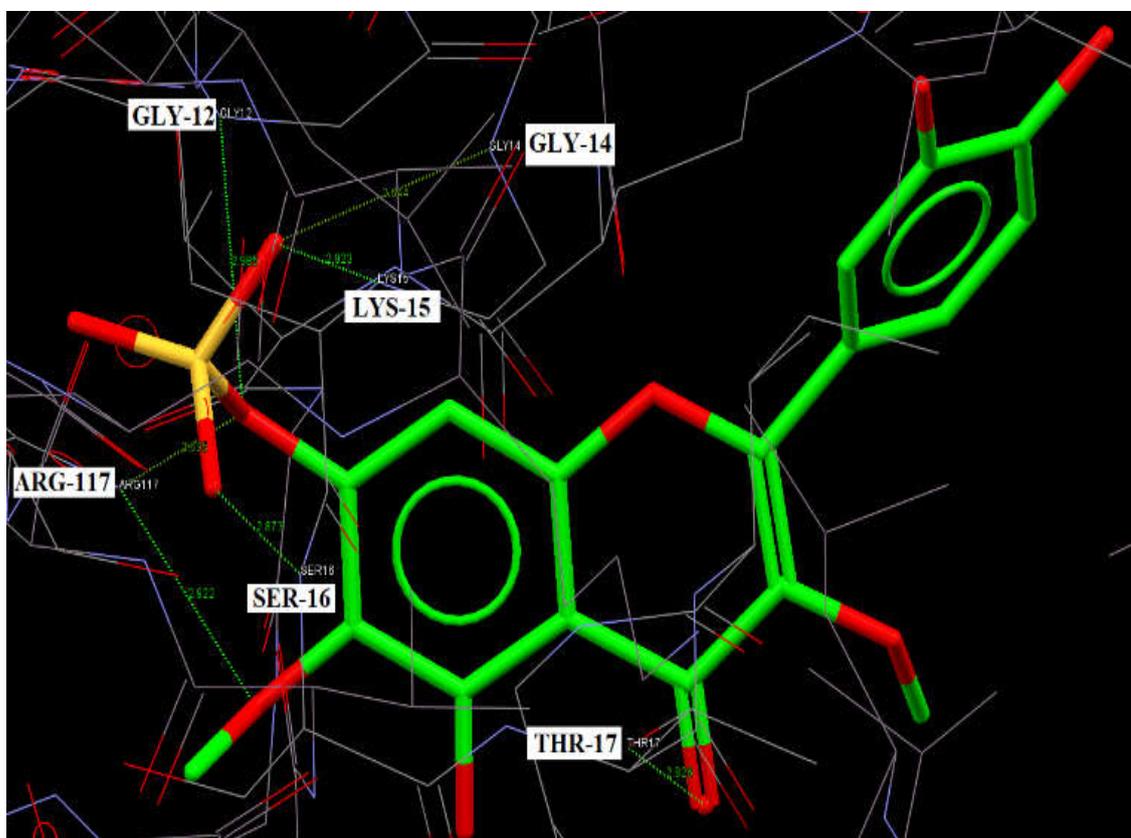
### 3.2.1. Etude des interactions du l'Axillarine 7-sulfate avec la Shikimate kinase

Le mode d'interaction de ce composé avec le Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis* a été étudié avec GOLD.

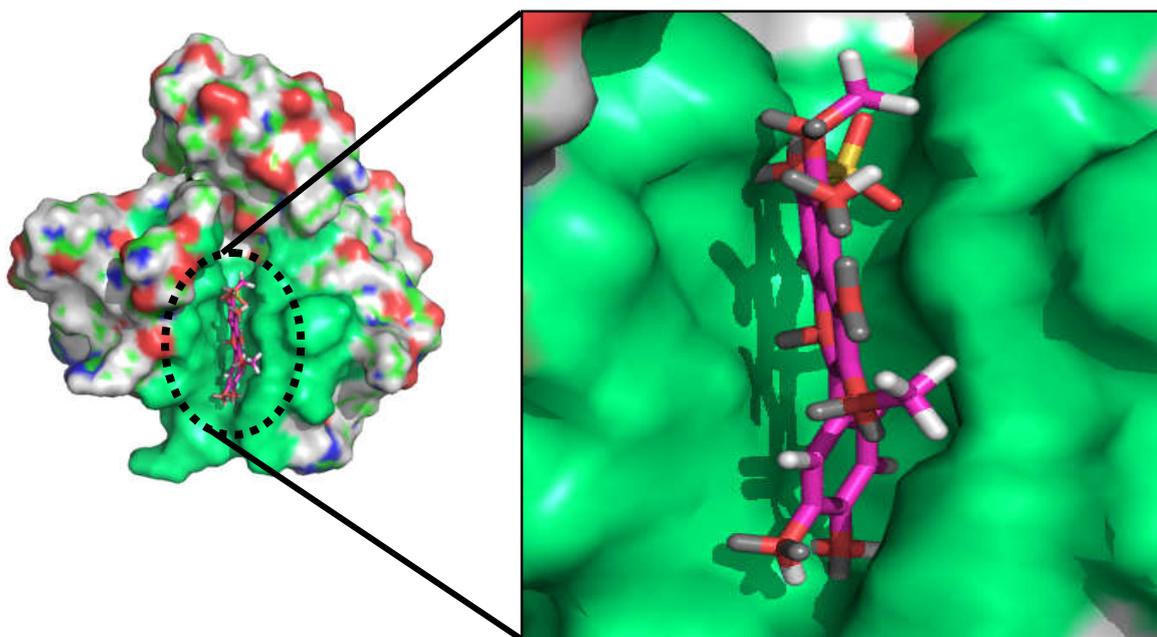
L'analyse visuelle (figure 14) montre que L'Axillarine 7-sulfate forme sept liaisons hydrogène avec le site actif de Shikimate kinase. (Tableau 7 et figure 14).

**Tableau 7.** Les ponts hydrogènes entre le Shikimate kinase et la Axillarin 7-sulfate.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
GLY 12 (N)	O	2.985
GLY 14 (N)	O	2.644
LYS 15 (N)	O	2.923
SER 16 (N)	O	2.873
THR 17 (O)	O	2.826
ARG 117 (N)	O	2.635
	O	2.922



**Figure 14.** Représentation de liaison hydrogène formée par l'Axillarin 7-sulfate. Image générée par GOLD.



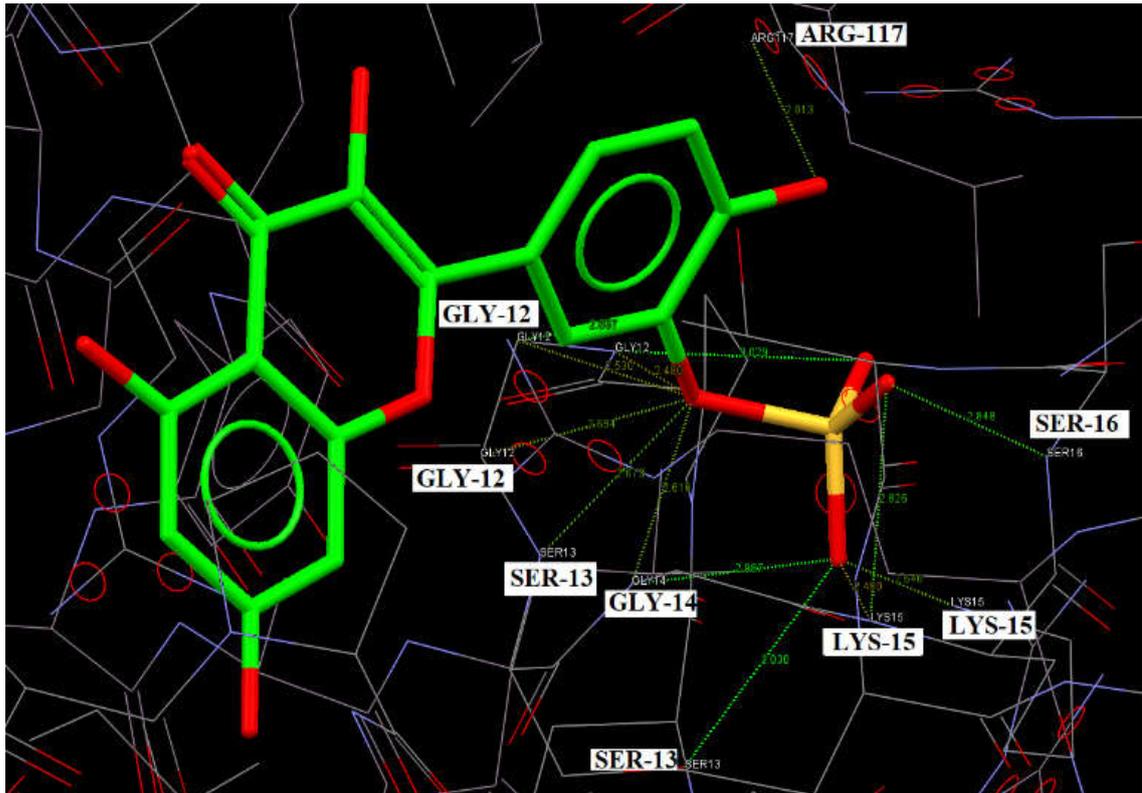
**Figure 15.** Emplacement de l’Axillarin 7-sulfate dans le site actif de Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis*. Image générée par PyMOL.

### 3.2.2. Etude des interactions du Quercetin 3-sulfate avec la Shikimate kinase

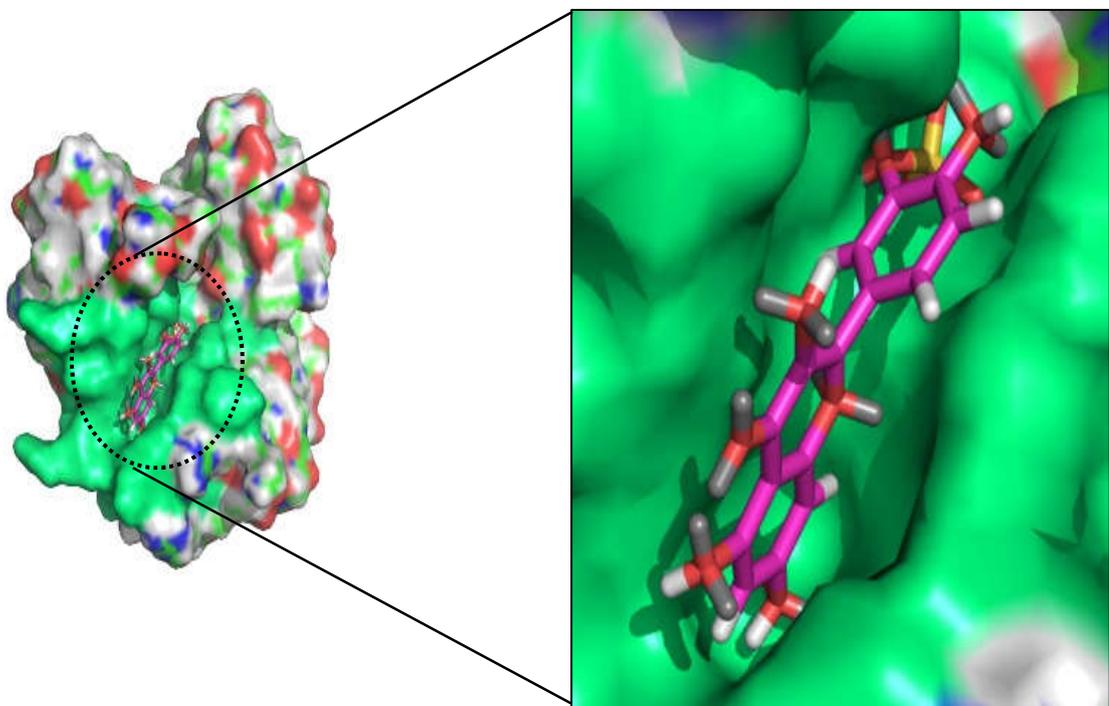
Le mode d’interaction de ce composé avec le Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis* a été étudié avec GOLD. L’analyse visuelle (figure 16) montre que la **Quercetin 3-sulfate** forme onze liaisons hydrogène avec le site actif de Shikimate kinase. (Tableau 8).

**Tableau 8.** Les ponts hydrogènes entre le Shikimate kinase et la **Quercetin 3-sulfate**

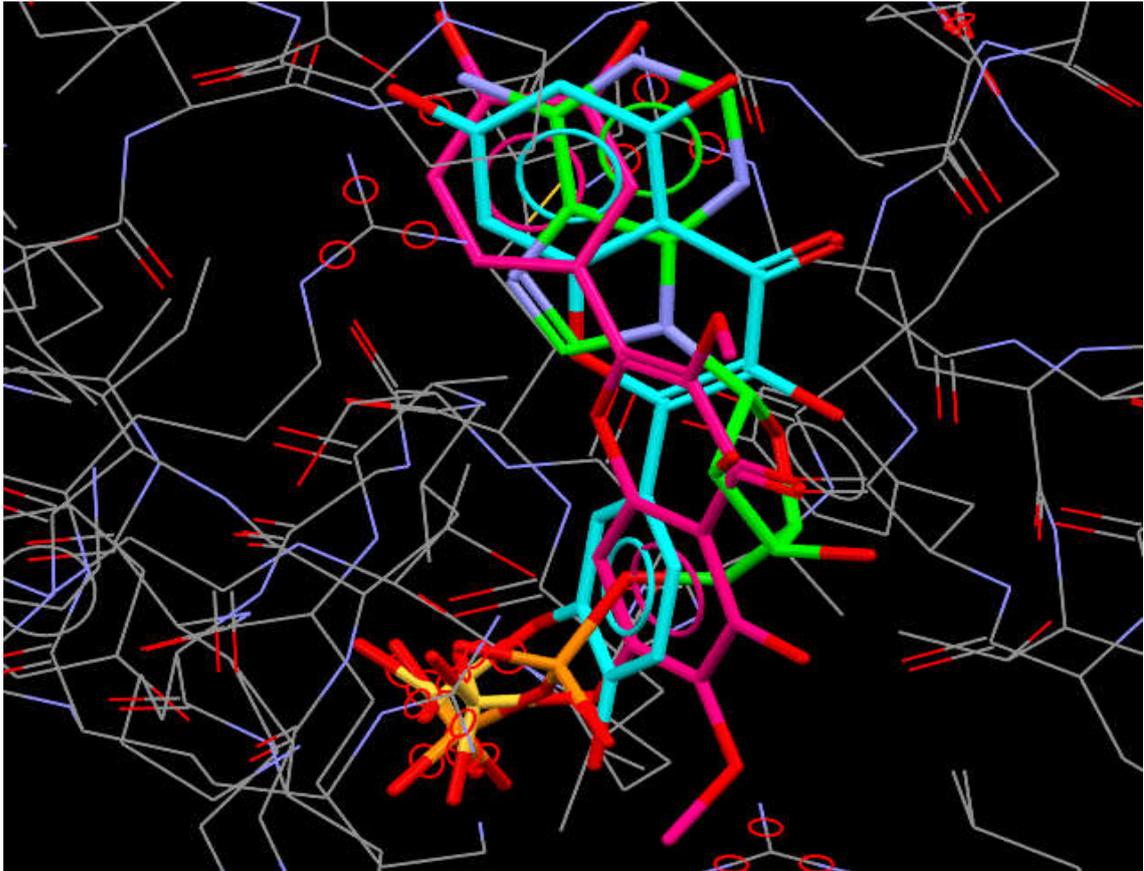
Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
GLY12 (N)	O	2.687
	O	2.634
	O	3.029
SER 13 (N)	O	2.673
	O	3.030
GLY14 (N)	O	2.987
LYS 15 (N)	O	2.826
	O	2.646
	O	2.480
SER 16 (N)	O	2.848
ARG 117 (N)	O	2.613



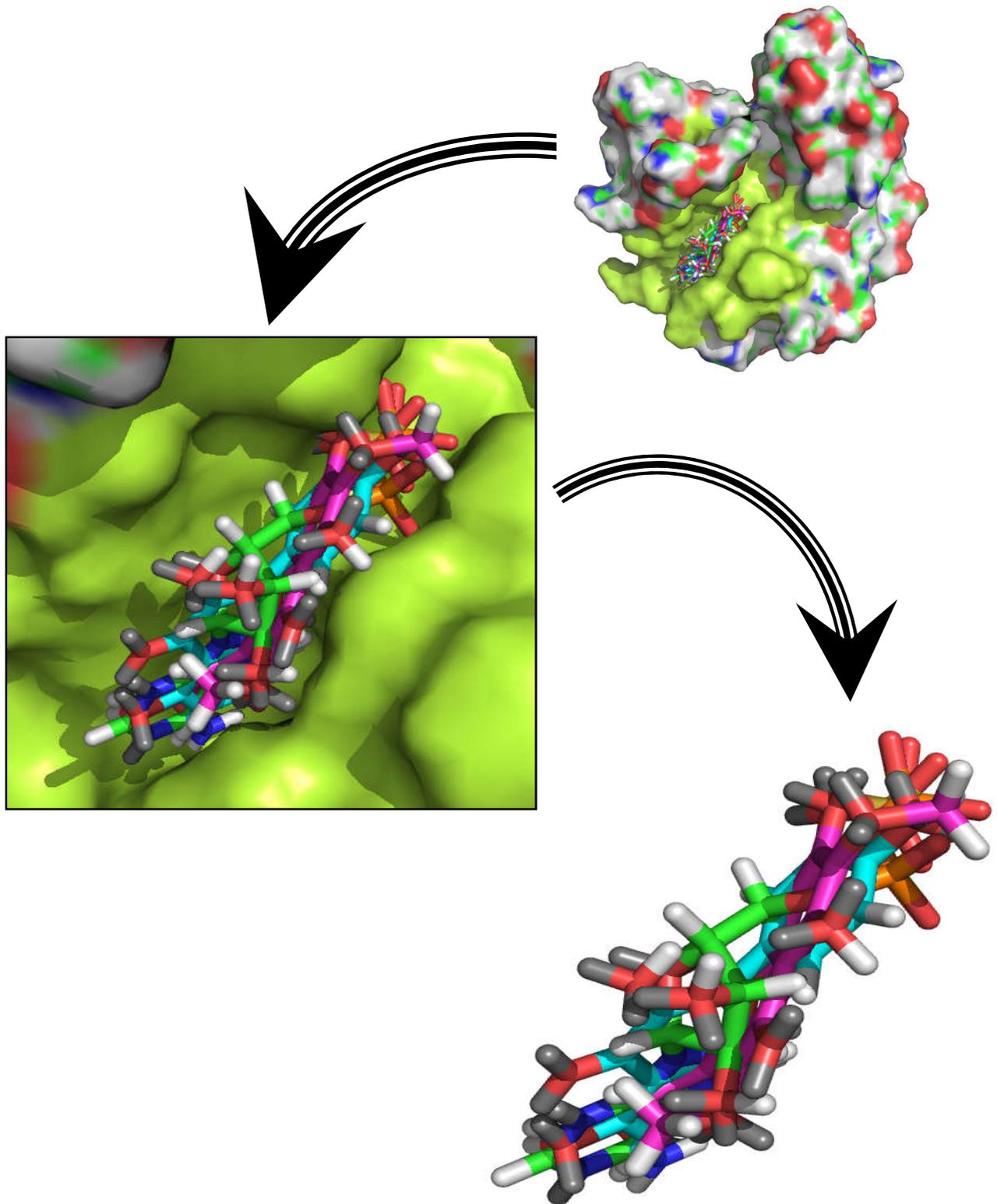
**Figure 16.** Représentation de liaison hydrogène formée par la Quercetin 3-sulfate. Image générée par GOLD.



**Figure 17.** Emplacement de la Quercetin 3-sulfate dans le site actif de Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis*. Image générée par PyMOL.



**Figure 18.** Superposition entre le substrat **ADP** (les atomes de carbones colorés en vert) et **Axillarin 7-sulfate** (Les atomes de carbones colorés en rose) et la **Quercetin 3-sulfate** (les atomes de carbones colorés en bleu ciel) dans le site actif de Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis* (code PDB : 1L4U) Image générée par **GOLD**.



**Figure 19.** Superposition entre le substrat **ADP** (les atomes de carbones colorés en vert) et les composés **Axillarín 7-sulfate** (Les atomes de carbones colorés en rose) et la **Quercétin 3-sulfate** (les atomes de carbones colorés en bleu ciel) dans le site actif de Shikimate kinase chez *Mycobacterium tuberculosis* (code PDB: 1L4U) Image générée par *PyMOL*.

#### 4. Application de la règle 5 du Lipinski :

Dans notre travail, il était très important de compléter cette étude par l'application de la méthode de filtre ADME qui est basée sur la règle de cinq de Lipinski afin de nous renseigner sur les propriétés pharmacocinétiques (ADME) des deux alcaloïdes étudiés précédemment. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

**Tableau 9** : Propriété pharmacocinétique des flavonoïdes (l'Axillarin 7-sulfate et la Quercetin3-sulfate).

	Poids moléculaire	Donneur de H	Accepteur de H	Liaisons routable	Log p
Axillarin 7-sulfate	426.36	4	11 (Violation)	5	0.19
Quercetin3-sulfate	382.30	5	10	3	0.46

À l'issue de ce test, les deux flavonoïdes (l'Axillarin 7-sulfate et la Quercetin3-sulfate) peuvent être proposés comme étant de nouveaux inhibiteurs théoriques de Shikimate kinase bactérienne, pouvant être administrés par voie orale, ce conformément à la règle de Lipinski.

## 5. La discussion

Au vu de la propagation du phénomène de résistance et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles "cibles" d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives. (Pereira *et al.*, 2004).

La réémergence de la tuberculose constitue une menace pour la santé publique, et la forte sensibilité des personnes infectées par le VIH et la propagation de souches multirésistantes conduisent à la nécessité de développer de nouveaux médicaments. La Shikimate kinase et d'autres enzymes de la voie Shikimate sont des cibles intéressantes pour le développement de médicaments antibactériens, car la voie est essentielle chez ces espèces mais absente chez les mammifères. (Pereira *et al.*, 2004).

Dans cette étude, nous avons évalué l'affinité de 50 flavonoïdes pour la Shikimate kinase de *Mycobacterium tuberculosis* en fonction de l'énergie de liaison.

D'après les résultats de docking, nous avons constaté que les meilleures conformations pour la l'**Axillarin 7-sulfate** et la **Quercetin 3-sulfate** dans le site actif de la Shikimate kinase simule parfaitement celle observée par le substrat (ADP)

Nous avons observé la formation de **onze** liaisons hydrogènes entre le substrat (ADP) et les acides aminés : **GLY12, GLY14, LYS15, SER16, THR17, ARG110, ARG117** et **ARG153** de la Shikimate kinase. En revanche Nous avons observé la formation de **sept** liaisons hydrogène entre l'**Axillarin 7-sulfate** et les résidus **GLY12, GLY14, LYS15, SER16, THR17** et **ARG117** de la Shikimate kinase et **onze** liaisons hydrogène entre la **Quercetin 3-sulfate** et les résidus **GLY12, SER13, GLY14, LYS15, SER16** et **ARG117**

Nous avons remarqué que les résidus **GLY12, GLY 14, LYS 15, SER 16** et **ARG117** de la Shikimate kinase forment des liaisons hydrogènes aussi bien avec l'ADP qu'avec l'**Axillarin 7-sulfate** et la **Quercetin 3-sulfate**, sachant que les liaisons hydrogènes

jouent un rôle très important dans la stabilité de l'interaction entre l'enzyme et son ligand.

Les résultats montrent que **l'Axillarin 7-sulfate et la Quercetin 3-sulfate** présentent les meilleures affinités (**87.27 Kcal/mol** et **84.75 Kcal/mol** respectivement) vis à vis la Shikimate kinase. D'autre part, les résultats de superposition entre l'ADP et les composés **l'Axillarin 7-sulfate et la Quercetin 3-sulfate** ont montrés les mêmes orientations au niveau du site actif, chose qui peut expliquer les valeurs proches du Goldscore.

Nos résultats corroborent des études expérimentales montrant que les flavonoïdes sont de puissantes molécules antimicrobiennes (Boniface & Ferreira, 2020 ; Shamsudin *et al.*, 2022), et il a été rapporté par Cao *et al.* (2019) qu'un mélange de flavonoïdes présentait un puissant effet anti-mycobactérienne. (Cao *et al.*, 2019). En effet, les polyphénols sont reconnus comme des molécules antibactériennes et antifongiques.(Kumar *et al.*, 2021)

Conclusion

et

perspectives

## **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 tuberculose.

Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé deux étapes :

- **Étape 1:** La fiabilité du programme GOLD peut être testée en appliquant le test pour calculer la valeur RMSD de complexe enzyme-ligand téléchargé à partir de la PDB le résultat était satisfaisante. Ce test nous a fourni des preuves de la grande efficacité de la procédure GOLD et a conclu qu'elle peut être utilisée de manière fiable pour modéliser les interactions des inhibiteurs de la shikimate kinase.
- **Étape 2:** consiste à comprendre le mécanisme de l'interaction entre le ligand et son récepteur, en l'occurrence la shikimate kinase et son substrat (ADP). L'amarrage moléculaire à GOLD nous a permis d'observer que, parmi les 42 flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation étudiée, **l'Axillarin 7-sulfate et la Quercetin 3-sulfate** étaient les meilleurs inhibiteurs de la shikimate kinase avec des scores de 87,27 Kcal/mol et 84,75 Kcal/mol respectivement.

Nous avons complété notre travail par l'étude des interactions des molécules retenues (**l'Axillarin 7-sulfate et la Quercetin 3-sulfate**) 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 (**l'Axillarin 7-sulfate et la Quercetin 3-sulfate**) 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.

De tous ces résultats, nous pouvons conclure que ces (**l’Axillarin 7-sulfate et la Quercétin 3-sulfate**) peuvent agir comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de la shikimate kinase.

De plus, nous prévoyons de poursuivre ce travail en utilisant d'autres programmes de docking (amarrage) et de simulation informatique pour approfondir les effets de ces composés sur l'inhibition de la shikimate kinase. Comme notre étude est préliminaire, des expériences in vitro supplémentaires sont nécessaires pour vérifier ces résultats théoriques.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- ☞ Blanco, B., Prado, V., Lence, E., Otero, J. M., Garcia-Doval, C., Van Raaij, M. J., Llamas-Saiz, A. L., Lamb, H., Hawkins, A. R., & González-Bello, C. (2013). Mycobacterium tuberculosis shikimate kinase inhibitors: Design and simulation studies of the catalytic turnover. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(33), 12366–12376. <https://doi.org/10.1021/ja405853p>
- ☞ Boniface, P. K., & Ferreira, E. I. (2020). Opportunities and challenges for flavonoids as potential leads for the treatment of tuberculosis. In *Studies in Natural Products Chemistry* (1st ed., Vol. 65). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817905-5.00003-2>
- ☞ Cao, R., Teskey, G., Islamoglu, H., Gutierrez, M., Salaiz, O., Munjal, S., Fraix, M. P., Sathanathan, A., Nieman, D. C., & Venketaraman, V. (2019). Flavonoid Mixture Inhibits Mycobacterium tuberculosis Survival and Infectivity. *Molecules*, *24*(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050851>
- ☞ Castro-Alvarez, A., Costa, A. M., & Vilarrasa, J. (2017). The Performance of several docking programs at reproducing protein-macrolide-like crystal structures. *Molecules*, *22*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010136>
- ☞ D'Ambrosio, L., Centis, R., Sotgiu, G., Pontali, E., Spanevello, A., & Migliori, G. B. (2015). New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. *ERJ Open Research*, *1*(1). <https://doi.org/10.1183/23120541.00010-2015>
- ☞ de Prince, K. A., Sordi, R., Pavan, F. R., Santos, A. C. B., Araujo, A. R., Leite, S. R. A., & Leite, C. Q. F. (2012). Anti-mycobacterium tuberculosis activity of fungus *Phomopsis stipata*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(1), 224–229. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100024>
- ☞ 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 Letters*, *574*(1–3), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.005>
- ☞ Dias, M. V. B., Faím, L. M., Vasconcelos, I. B., De Oliveira, J. S., Basso, L. A., Santos, D. S., & De Azevedo, W. F. (2007). Effects of the magnesium and chloride ions and shikimate on the structure of shikimate kinase from Mycobacterium tuberculosis. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, *63*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1107/S1744309106046823>
- ☞ Docking, A. J. A., Autodock, A. J., Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy

- function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639–1662. %5C
- ☞ Férey, N., Bouyer, G., Martin, C., Drif, A., Bourdot, P., Ammi, M., Nelson, J., Burkhart, J.-M., & Autin, L. (2009). Docking de protéines en réalité virtuelle. Une approche hybride et multimodale. *Techniques et Sciences Informatiques*, 28(8), 983–1015. <https://doi.org/10.3166/tsi.28.983-1015>
- ☞ Fischer, E. (1894). 5.70, N 4.20 Gef. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 27, 2985–2993.
- ☞ 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(28), 8539–8545. <https://doi.org/10.1021/bi0606290>
- ☞ General, S., Officer, M., Bar-council, S. L., Resistance, A., Guru, S., & Singh, G. (2022). *rin Pr ep t n ot pe er r Pr ep rin t n ot er ed*.
- ☞ Golden, M. P., & Vikram, H. R. (2005). Extrapulmonary tuberculosis: An overview. *American Family Physician*, 72(9), 1761–1768. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81322>
- ☞ Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., Von Reyn, C. F., Wallace, R. J., & Winthrop, K. (2007). An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(4), 367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
- ☞ Gu, Y., Reshetnikova, L., Li, Y., Wu, Y., Yan, H., Singh, S., & Ji, X. (2002). Crystal structure of shikimate kinase from Mycobacterium tuberculosis reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 319(3), 779–789. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00339-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00339-X)
- ☞ 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. *Journal of Molecular Biology*, 364(3), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.001>
- ☞ Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- ☞ Komrower, D., & Thillai, M. (2015). Tuberculosis and HIV co-infection. *Clinical*

- Tuberculosis: A Practical Handbook*, 157–170. <https://doi.org/10.1201/b20755-13>
- ☞ Kumar, M., Singh, S. K., Singh, P. P., Singh, V. K., Rai, A. C., Srivastava, A. K., Shukla, L., Kesawat, M. S., Kumar Jaiswal, A., Chung, S. M., & Kumar, A. (2021). Potential anti-mycobacterium tuberculosis activity of plant secondary metabolites: Insight with molecular docking interactions. *Antioxidants*, *10*(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/antiox10121990>
- ☞ Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*, *443*, 365–382. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19)
- ☞ Newton, S. M., Lau, C., & Wright, C. W. (2000). A review of antimycobacterial natural products. *Phytotherapy Research*, *14*(5), 303–322. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<303::AID-PTR712>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<303::AID-PTR712>3.0.CO;2-N)
- ☞ Ntie-Kang, F. (2013). (*No Title*). <http://www.springerplus.com/content/2/1/353>
- ☞ Ojeda-May, P. (2022). Exploring the Dynamics of Shikimate Kinase through Molecular Mechanics. *Biophysica*, *2*(3), 194–202. <https://doi.org/10.3390/biophysica2030020>
- ☞ Pereira, J. H., De Oliveira, J. S., Canduri, F., Dias, M. V. B., Palma, M. S., Basso, L. A., Santos, D. S., & De Azevedo, W. F. (2004). Structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the binding of shikimic acid. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *60*(12 II), 2310–2319. <https://doi.org/10.1107/S090744490402517X>
- ☞ Pymol, L. (2015). *Le logiciel PyMOL*. 1–23.
- ☞ Rashighi, M., & Harris, J. E. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *1*
- ☞ Sid, K., & Batouche, M. (2021). Distributed heterogeneous ensemble learning on Apache Spark for ligand-based virtual screening. *International Journal of Data Mining, Modelling and Management*, *13*(1/2), 160. <https://doi.org/10.1504/ijdm.2021.10035119>
- ☞ Singh, N., & Villoutreix, B. O. (2022). A Hybrid Docking and Machine Learning Approach to Enhance the Performance of Virtual Screening Carried out on Protein–Protein Interfaces. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232214364>
- ☞ Site, B., Study, C., Introduction, C. S. D. R., Files, P. I., Protein, P., Experiment, D., Ligand, E., Experiment, D., Site, B., Ligand, S., Water, S., Site, B., Docking, R. G., & Docking, R. G. (2021). *Docking with Water in the Binding Site using GOLD*.

- ☞ Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. In *Progress in Medicinal Chemistry* (1st ed., Vol. 60). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
  
- ☞ Study, C., Files, P. I., Release, C. S. D., Protein, P., Experiment, D., Ligand, E., Experiment, D., Site, B., Ligand, S., Gold, R., & Visualisation, H. (2022). *Protein-ligand docking 101 - running a simulation in GOLD Try*.
  
- ☞ Taylor, R. D., Jewsbury, P. J., & Essex, J. W. (2003). FDS: Flexible ligand and receptor docking with a continuum solvent model and soft-core energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 24(13), 1637–1656. <https://doi.org/10.1002/jcc.10295>
  
- ☞ Timo, G. O., Reis, R. S. S. V. dos, Melo, A. F. de, Costa, T. V. L., Magalhães, P. de O., & Homem-de-Mello, M. (2019). Predictive power of in silico approach to evaluate chemicals against m. tuberculosis: A systematic review. *Pharmaceuticals*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ph12030135>
  
- ☞ Yombi, J. C., & Olinga, U. N. (2015). La tuberculose: Épidémiologie, aspect clinique et traitement. *Louvain Medical*, 134(10), 549–559.
  
- ☞ Zahir, I., Zahir, A., & Taghiam, I. (2018). Effet Antimycobactérien Des Plantes Marocaines: Revue Générale. *European Scientific Journal ESJ*, 14(36), 518–549. <https://doi.org/10.19044/esj.2018.v14n36p518>