



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI - CONSTANTINE 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

N° d'ordre : 34/DS/2018

N° de Série : 02/Bch/2018

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Biochimie

Présentée par : Amina MERZOUG

Thème

Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase

Soutenue le : 14/03/2018

Devant le jury :

Président : Mr. KHELIFI Douadi

Prof ENSB - Constantine 3

Directeur de thèse : Mr. CHIKHI Abdelouahab

Prof Univ. Frères Mentouri - Constantine 1

Examineurs : Mr. BENSEGUENI Abderrahmane

Prof Univ. Frères Mentouri - Constantine 1

Mr. LAHOUAL Mesbah

Prof Univ. M.S. Benyahia. Jijel

Mr. BOUBENDIR Abdelhafid

M.C.A au Centre Univ. A. Boussof – Mila

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Le grand merci revient toujours à notre DIEU le tout puissant qui m'a donné le courage et la patience et qui a éclairé mon chemin pour achever ce travail.

Je tiens à remercier :

- Monsieur CHIKHI Abdelouahab, Professeur à Université des Frères Mentouri - Constantine 1, de m'avoir suivi et dirigé tout au long de la réalisation de cette thèse et pour toute l'aide, la disponibilité, les conseils précieux et les critiques constructives dans le développement de cette thèse.

-Les membres de mon Jury :

Monsieur KHELIFI Douadi , Professeur à Université des Frères Mentouri - Constantine 1, qui a bien voulu présider ce jury.

Monsieur BENSEGUENI Abderrahmane, Professeur à Université des Frères Mentouri - Constantine 1,

Monsieur LAHOUAL Mesbah, Professeur à Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel,

et Monsieur BOUBENDIR Abdelhafid, M.C.A au Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf - Mila,

auxquels je suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je dédie ce modeste travail à,

*À mes très chers parents qui m'ont soutenu et encouragé durant
toute la période de mes études,*

À mon cher mari Farid qui m'a tant soutenu

À mon raison de vivre, à mon fils Akram,

*À mes sœurs : Meriem, Khadidja et mes frères Mehdi et
Adbelraouf,*

À mes neveux : Abdesalam, Haitèm et Amine,

À mes beaux-parents, mes belles-sœurs et mon beau-frère,

*À la mémoire de mon amie Hioual Khadidja Soulef, qu'Allah
l'accueille en son vaste paradis,*

À mon amie Hanane et tous mes collègues.

Amina MERZOUG

TABLE DES MATIERES

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. LES INFECTIONS BACTERIENNES.....	3
I. Généralité.....	3
II. Les différentes classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action.....	4
III. La résistance aux antibiotiques.....	5
IV. Liste OMS des bactéries prioritaires pour le développement de nouveaux traitements.....	7
V. La découverte des nouveaux agents antimicrobiens.....	9
CHAPITRE II. LE CRIBLAGE VIRTUEL.....	10
I. Développement de nouveaux médicaments.....	10
I.1. Identification d'une cible thérapeutique.....	10
I.2. Mise au point des molécules bioactives.....	11
II. L'importance des chimiothèques dans la recherche de nouvelles substances thérapeutiques.....	12
III. Le processus de criblage virtuel.....	13
III.1. Utilisation dans le processus de développement des nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique.....	13
III.2. Les stratégies du criblage virtuel.....	13
III.2.1. Criblage virtuel basé sur la structure de la cible: le docking.....	14
III.2.2. Les interactions protéine-ligand.....	16
III.2.3. Criblage virtuel basé sur les structures des ligands : le pharmacophore...	16
IV. Le processus de docking moléculaire.....	17
IV.1. Principe.....	17
IV.2. Les étapes de docking moléculaire.....	18

IV.2.1. La recherche conformationnelle.....	18
IV.2.2. L'évaluation des conformations.....	19
IV.3. Principaux programmes d'amarrage moléculaire.....	20
IV.4. Applications du docking moléculaire.....	21
V. Quelques succès du criblage virtuel par docking moléculaire.....	21
VI. Le programme FlexX.....	22
VI.1. la flexibilité conformationnelle du ligand.....	22
VI.2. Les types d'interactions ligand-récepteur.....	24
VI.3. La fonction de score.....	24
CHAPITRE III.LA PEPTIDE DEFORMYLASE.....	25
I. Présentation de la peptide déformylase.....	25
II. Classification des PDFs.....	26
III. Structure tridimensionnelle.....	27
IV. Site actif et poches d'interaction avec le substrat.....	30
V. Inhibiteurs de la PDF.....	31
VI. Inhibiteurs de la PDF comme agents antibactériennes.....	32
VI.1. Les inhibiteurs naturels.....	33
VI.1.1. L'actinonin.....	33
VI.1.2. Le Macrolactin N.....	33
VI.1.3. Le fumimycin, le FR198248 et le FR202306.....	34
VI.1.4. Le CAPE.....	35
VI.2. Les inhibiteurs synthétiques.....	35
VI.2.1. Les inhibiteurs peptidiques (Inhibiteurs à base de substrat).....	36
VI.2.2. Les inhibiteurs pseudo-peptidiques (les dérivés d'hydroxamate et de N-formyl-N-hydroxylamine.....	37
VI.2.3. Les inhibiteurs non peptidiques.....	38
VI.3. Les candidats cliniques.....	40
VI.3.1. LBM415.....	41
VI.3.2. BB-83698.....	41
VI.3.3. GSK1322322.....	42
CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES.....	43
I. Tests de fiabilité de programme FlexX.....	43

I.1. Test du RMSD.....	43
I.2. Analyse visuelle.....	44
I.3. Coefficient de corrélation.....	44
II. Criblage virtuel de la banque de données ZINC.....	44
II.1. Préparation de la chimiothèque à cribler.....	46
II.1.1. Choix de la chimiothèque.....	46
II.1.2. Filtrage et préparation de la chimiothèque.....	46
II.2. préparation de récepteur.....	49
II.3. Criblage virtuel par docking moléculaire.....	51
II.4. Protocole de docking par FlexX.....	51
III. La règle de Lipinski.....	54
IV. Commande de meilleures molécules.....	55
V. Test <i>in vitro</i>	55
V.1. Souches bactériennes.....	55
V.2. Description des bactéries étudiées.....	56
V.2.1. <i>Escherichia coli</i>	56
V.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	56
V.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
V.2.4. <i>Klebsiellapneumoniae</i>	57
V.2.5. <i>Enterococcusfaecalis</i>	57
V.3. Molécule de référence : antibiotique.....	57
V.4. Antibiogramme par la diffusion sur milieu solide.....	58
V.5. Détermination des CMI en milieu liquide.....	58
CHAPITRE 5. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	60
I. Tests de fiabilité.....	60
I.1. Prédiction d'affinité.....	60
I.2. Reproduction de poses expérimentales.....	64
I.3. Analyse visuelle.....	67
II. Résultats de criblage.....	69
II.1. Criblage basé sur la structure de ligands connus.....	70
II.2. Criblage virtuel basé sur la structure de la cible protéique.....	71
III. Prédiction du mode d'interaction des meilleurs composés.....	77
III.1. Complexe <i>P. aeruginosa</i> PDF- composé ZINC03872971.....	77

III.2. Complexe <i>E. coli</i> PDF-composé ZINC00500969.....	79
III.3. Complexe <i>S. aureus</i> PDF-ZINC01393372	81
III.4. Complexe <i>S. aureus</i> PDF-ZINC01187537.....	82
III.5. Complexe <i>S. pneumoniae</i> PDF-composé ZINC00344344.....	84
III.6. Complexe <i>S. pneumoniae</i> PDF-ZINC00039650.....	85
III.7. Complexe <i>E. coli</i> PDF-composé ZINC01428769.....	87
III.8. Complexe <i>E. faecalis</i> PDF-composé ZINC01403330.....	89
III.9. Complexe <i>E. faecalis</i> PDF-composé ZINC0003965.....	90
IV. Prédiction de la similarité médicamenteuse.....	92
V. Criblage antibactérien.....	94
V.1. Activité antibactérienne <i>in vitro</i>	94
V.2. Détermination de la CMI.....	100
CONCLUSION.....	103
BIBLIOGRAPHIE.....	105
ANNEXE	
Résumés	

LISTE DES FIGURES

I.1 Mécanismes d'action des antibiotiques.....	4
II.1 Criblage haut-débit robotisé.....	11
II.2 Les stratégies du criblage virtuel.....	14
II.3 Criblage virtuel par docking moléculaire.....	15
II.4 Le concept clé-Serrure.....	17
II.5 Représentation schématique des étapes du docking moléculaire.....	18
II.6 Construction incrémentale d'une molécule.....	19
II.7 Superposition des différents points du site d'interaction avec le ligand.....	23
II.8 Construction incrémentale d'un ligand au sein d'un récepteur.....	23
III.1 Initiation de la synthèse des protéines par la méthionine et rôle du PDF.....	25
III.2 Figure en ruban de la structure de la peptide déformylase d' <i>E. coli</i>	28
III.3 Alignement des séquences desPDFs bactériennes provenant d' <i>H. influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> et <i>Staphylococcus pyogenes</i>	29
III.4 Mécanisme catalytique moléculaire de la PDF.....	30
III.5 Représentation schématique du site actif de la PDF.....	31
III.6 Classification des inhibiteurs de la PDF.....	32
III.7 Structure chimique de l'actinonin.....	33
III.8 Structure chimique de macrolactine N.....	34
III.9 Structures chimiques de certains inhibiteurs naturels.....	34
III.10 Structure chimique de CAPE.....	35
III.11 Structure générique d'un inhibiteur de la PDF.....	35
III.12 Structure chimique des inhibiteurs peptidiques.....	37
III.13 Structure chimique des trois inhibiteurs pseudo-peptidiques.....	38

III.14	Structure chimique des inhibiteurs non peptidiques.....	40
III.15	Structure chimique de LBM415.....	41
III.16	Structure chimique de BB-83698.....	42
III.17	Structure chimique de GSK1322322.....	42
IV.1	Différentes phases de la criblage de la chimiothèque.....	45
IV.2	Recherche par sous structure dans ZINC database.....	48
IV.3	Résultats de la recherche par sous structure.....	49
IV.4	Prédictions et visualisation réalisées par FlexX.....	53
V.1	Comparaison de la conformation expérimentale de l'inhibiteur 5T8 du complexe 5F00 (colorée par type d'atome) et sa conformation prédite par FlexX (colorée en vert).....	68
V.2	Superposition du ligand 5MF du complexe 5EDH simulé par FlexX (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré par type d'atome).....	68
V.3	Exemples de résultats obtenus par recherche par sous structure.....	71
V.4	Mode de liaison du composé ZINC03872971 avec le site actif de la PDF de <i>P. aeruginosa</i>	78
V.5	La structure arrimée de ZINC00500969 à l'intérieur de la poche de liaison d' <i>E. coli</i> PDF montrant leurs différentes interactions.....	80
V.6	Résultat de docking de composé ZINC01393372 avec <i>S. aureus</i> PDF.....	81
V.7	Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé ZINC01393372 avec la PDF de <i>S. aureus</i>	82
V.8	La pose amarrée de ZINC01187537 dans la poche de liaison de <i>S. aureus</i> PDF.....	83
V.9	Mode d'interaction du ZINC00344344 dans le site actif de la PDF de <i>S. pneumoniae</i> ...85	
V.10	Illustration du positionnement de l'inhibiteur ZINC00039650 dans le site actif de la PDF de <i>S. pneumoniae</i>	86

V.11	Le mode d'interaction de composé ZINC00039650 avec le site actif de la PDF de <i>S. pneumoniae</i>	86
V.12	Représentation des résidus clés du PDF d' <i>E.coli</i> en interaction avec ZINC01428769..	88
V.13	Docking de composé ZINC01403330 dans le site actif d' <i>E. faecalis</i> PDF.....	89
V.14	Mode de liaison de l'inhibiteur ZINC00039650 au site actif d' <i>E. faecalis</i> PDF.....	91
V.15	Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé Zinc00039650 avec la PDF d' <i>E. faecalis</i>	92
V.16a	Photographies de des zones inhibitrices des composés ZINC03872971 (C8), ZINC00039650 (C9) et ZINC00126407 (C10) sur les souches <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> et <i>S. aureus</i>	96
V.16b	Photographies de la zone inhibitrice des composés ZINC03872971 (C8), ZINC00039650 (C9) et ZINC00126407 (C10) sur les souches bactériennes <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. faecalis</i>	97
V.17	Photographies des zones inhibitrices des souches bactériennes <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> à la concentration 300µg/disque.....	99

LISTE DES TABLEAUX

II.1 Principaux programmes d'amarrage moléculaire.....	20
II.2 Exemples de réussites de criblage virtuel de chimiothèques.....	21
IV.1 Principales caractéristiques des complexes utilisés.....	50
IV.2 Liste des souches bactériennes étudiées.....	56
IV.3 Schéma du mode opératoire (CMI par technique de dilution en milieu liquide).....	59
V.1 Les inhibiteurs de la PDF avec leurs activités biologiques reportées et leurs énergies d'interaction.....	61
V.2 Liste des 107 complexes protéine-ligand utilisés pour tester la fiabilité de programme FlexX par le RMSD.....	64
V.3 Structures moléculaires, nomenclateurs, énergies prédites (kj/mol) de 15 meilleurs composés avec différents PDF bactériens.....	73
V.4 Les liaisons hydrogènes formées par le ligand ZINC03872971.....	79
V.5 Les six ponts hydrogène formés par le composé ZIN00500969 et les résidus du site actif d' <i>E. coli</i> PDF.....	80
V.6 Les liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur ZINC01393372.....	81
V.7 Les dix ponts hydrogène formés par le ligand ZINC01187537.....	82
V.8 Représentation des liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur ZINC00344344.....	84
V.9 Les liaisons hydrogènes formées par les différents atomes du ligand ZINC00039650...	87
V.10 Les ponts d'hydrogène formés par le composé ZINC01428769.....	88
V.11 les neufs liaisons hydrogène formées par le ligand ZINC01403330.....	90
V.12 Les ponts d'hydrogène observés.....	91
V.13 Critères de la règle de Lipinski pour les molécules étudiées.....	93

V.14	Antibiogramme des souches étudiées en présence de différentes molécules testées....	94
V.15a	Diamètres des zones d'inhibition des bactéries <i>E. coli</i> et <i>K. pneumoniae</i> obtenus par la méthode de diffusion en utilisant différentes concentrations.....	97
V.15b	Diamètres des zones d'inhibition des bactéries <i>S. aureus</i> et <i>E. faecalis</i> obtenus par la méthode de diffusion en utilisant différentes concentrations.....	98
V.15c	Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion en utilisant la concentration de 300µg/disque.....	98
V.16	CMI des meilleurs produits.....	100

LISTE DES ABREVIATIONS

ADME/Tox	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CI50	Concentration Inhibitrice 50%
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO	Dimethylsulfoxyde
GUI	<i>Graphical User Interface</i>
HsPDF	PDF humaine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDF	Peptide Déformylase
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>

INTRODUCTION

L'émergence de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, pose actuellement un problème de santé publique. Des bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Mycobacterium tuberculosis*, posent les problèmes de traitement les plus graves avec l'augmentation de l'incidence des isolats résistants aux médicaments (Rice, 2006 ; Jaiprakash *et al*, 2015). Parmi les bactéries à Gram négatif, les agents pathogènes pharmacorésistants les plus préoccupants sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (Jaiprakash et Edmond, 2000 ; D'Agata, 2004 ; Gaynes et Edwards, 2005). Par conséquent, l'identification d'une nouvelle cible non encore exploitée en antibiothérapie jouera un rôle crucial dans le développement de nouveaux composés antibactériens actifs contre les pathogènes résistants. Une cible qui n'a pas reçue beaucoup d'attention durant quelques années auparavant est la peptide déformylase. Elle constitue ainsi une cible intéressante pour la découverte de nouveaux antibiotiques avec un nouveau mécanisme d'action. C'est une métalloenzyme qui élimine catalytiquement le groupe N-formyle de la méthionine N-terminale des polypeptides nouvellement synthétisés, ce qui est une étape essentielle dans la maturation des protéines bactériennes (Solbiati *et al*, 1999).

De nombreux composés peptidiques et non peptidiques ont été développés comme inhibiteurs de la PDF avec un thiol, un carboxylate, un hydroxamate, un phosphonate ou une N-formyl-hydroxylamine comme groupement chélateur (Wei *et al*, 2000). Seuls les composés contenant l'hydroxamate ou la N-formyl-hydroxylamine ont présenté une activité antibactérienne appréciable (Clements *et al*, 2001 ; Hackbarth *et al*, 2002 ; Wise *et al*, 2002 ; Chen *et al*, 2004 ; Lofland *et al*, 2004). Cependant, le GSK1322322 est le seul inhibiteur à détenir de bonnes propriétés pharmacocinétiques en phase I clinique et des résultats prometteurs en phase II.

La recherche de nouveaux agents antibactériens est un processus long et coûteux (DiMasi *et al*, 2003), Récemment, les techniques de criblage virtuel ont gagné beaucoup d'intérêt dans de nombreuses stratégies de développement de médicaments (Stahura et Bajorath, 2004). Elles utilisent des méthodes bioinformatiques pour identifier de nouvelles substances thérapeutiques sur la base des structures de la cible ou du ligand.

Le criblage virtuel est une méthode rapide et peu coûteuse. De même, un pré filtrage préalable est recommandé afin de réduire la taille d'une banque de données chimiques et de ne retenir que des composés d'intérêt. Le docking moléculaire est une méthode computationnelle de développement de médicaments sur la base de structure du récepteur, elle permet de prédire l'effet biologique d'un grand nombre de molécules dans un temps raisonnable et de proposer à la fin une série réduite de molécules à synthétiser ou acheter et à tester expérimentalement sur une cible donnée (Gohlk et Klebe, 2002).

L'objectif de cette présente étude était de rechercher des inhibiteurs potentiels ciblant les sites actifs de cinq peptides déformylase bactériens en appliquant une stratégie qui combine la méthode d'amarrage computationnelle aux tests microbiologiques.

Cette thèse présente les principaux résultats issus d'une étude rassemble deux approches complémentaires, *in silico* et *in vitro*, et nous a permis d'identifier de nouveaux antibiotiques par l'inhibition de la peptide déformylase bactérienne.

Le premier chapitre de cette thèse concerne les infections bactériennes et les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.

Le second chapitre présente les principales stratégies de criblage virtuel qui sont les méthodes prédictives les plus utilisées dans la conception des nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique: aussi bien la stratégie basée sur la structure de la cible que celle basée sur la structure et les propriétés des ligands. Il présente aussi des exemples de réussites de criblage virtuel.

Le chapitre suivant présente notre cible pharmacologique qui est la peptide déformylase bactérienne, sa structure, son mécanisme d'action, son site actif et ses poches d'interaction avec le substrat ainsi qu'à ses principaux inhibiteurs connus.

Le quatrième chapitre détaille la stratégie utilisée afin de cribler virtuellement la chimiothèque ZINC et d'isoler des molécules affines pour la cible peptide déformylase, ainsi que la méthode microbiologique utilisée pour confirmer les résultats *in silico* obtenus.

Le dernier chapitre expose l'essentiel de nos résultats et une discussion.

Enfin, une conclusion et les perspectives dégagées de cette étude sont présentées.

CHAPITRE I

LES INFECTIONS BACTÉRIENNES

CHAPITRE I

LES INFECTIONS BACTÉRIENNES

I. Généralité

Les maladies infectieuses sont des maladies provoquées par la transmission d'un agent infectieux. Elles sont une des premières causes de mortalité dans le monde. Les pathologies infectieuses sont responsables de 17 millions de décès chaque année, dont 90% surviennent dans les pays en développement (Manuel *et al*, 2007). Elles représentent une réelle menace pour la santé mondiale.

La majorité des bactéries présentes dans l'organisme humain sont inoffensives voire même bénéfiques. C'est le cas par exemple des bactéries que l'on peut trouver dans le tube digestif, qui permettent la digestion des nutriments. Certaines bactéries peuvent être pathogènes lorsqu'elles se développent à l'intérieur d'un tissu ou libèrent des toxines nocives. Les pathologies bactériennes les plus courantes sont les intoxications alimentaires, les infections conjonctivites, les infections respiratoires et les infections urinaires.

On distingue deux catégories de bactéries pathogènes (Archambaud, 2010):

- **Bactéries strictes**

Ces bactéries provoquent des pathologies quel que soit l'hôte comme par exemple *Mycobacterium tuberculosis* et *Streptococcus pneumoniae*.

- **Bactéries opportunistes**

Ces bactéries provoquent des infections lorsque les défenses immunitaires de le patient sont affaiblies c'est le cas par exemple de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Le traitement des infections bactériennes dans l'organisme hôte nécessite des moyens efficaces pour tuer la bactérie en nuisant le moins possible au patient. Par conséquent, des agents thérapeutiques qui ciblent des caractéristiques spécifiques à la bactérie provoquant une infection sont souhaitables pour le traitement. Ces pathologies deviennent de plus en plus

difficiles à traiter à cause de l'émergence et de la propagation des résistances aux agents antimicrobiens (OMS, 2015).

II. Les différentes classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'action

Les antibactériens sont des agents thérapeutiques qui servent à lutter contre les infections d'origine bactérienne. C'est une des découvertes les plus importantes de la médecine qui sauve des millions de personnes chaque année, mais leur efficacité est menacée car les bactéries peuvent s'adapter et résister au traitement. Les antibactériens sont des molécules élaborées par des microorganismes, ou des molécules synthétiques, qui à faible dose possèdent des activités bactériostatiques ou bactéricides. Leurs cibles d'action sont des structures moléculaires spécifiquement bactériennes. Elles ont donc une toxicité sélective vis-à-vis les cellules bactériennes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes.

Les molécules antibactériennes sont catégorisées comme bactéricides si elles tuent les bactéries sensibles ou bactériostatiques si elles inhibent la croissance bactérienne, elles inhibent une de leurs fonctions vitales. Les mécanismes d'action des antibiotiques sont très variables, ils sont résumés dans la figure suivante :

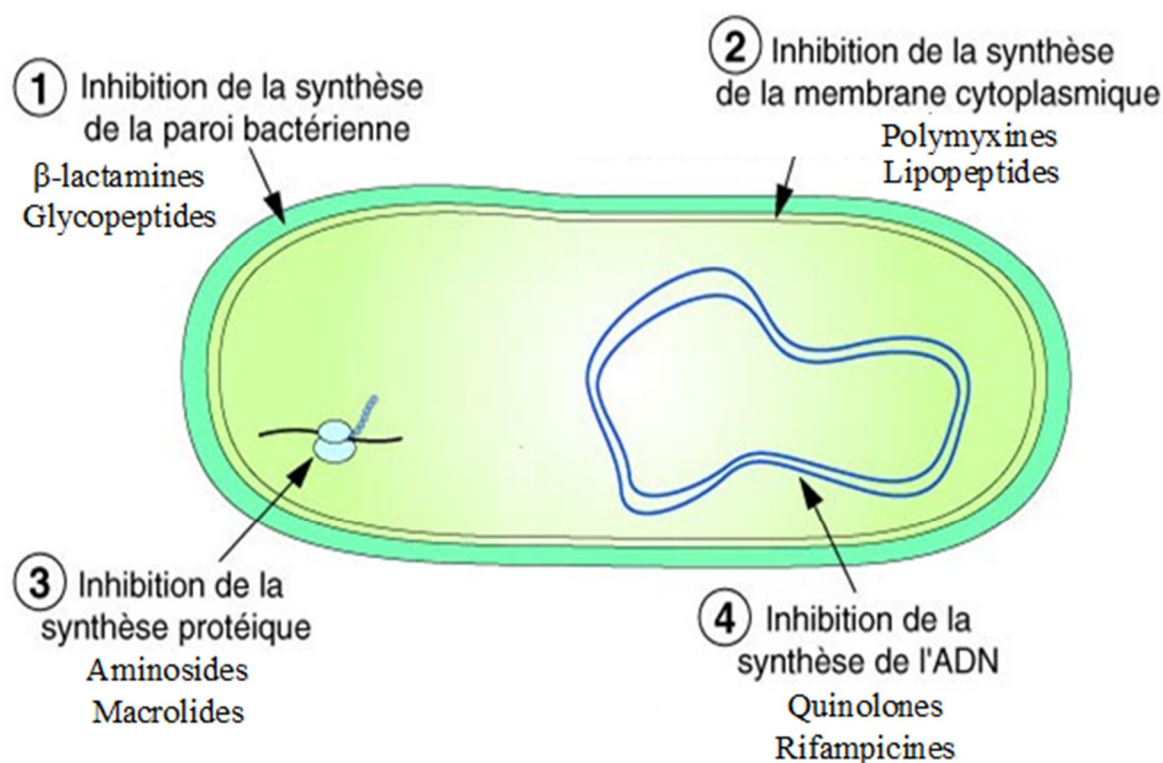


Figure I.1 Mécanismes d'action des antibiotiques, d'après

<http://www.123bio.net/cours/antibio/modedaction.html>

- **Les antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne**

La plupart de ces antibiotiques sont des inhibiteurs de la synthèse du polymère formant la paroi bactérienne qui est la peptidoglycan, Parmi ces antibiotiques, on trouve les β -lactamines, les glycopeptides et les fosfomycines.

- **Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines**

Ils empêchent la traduction des acides ribonucléiques messagers destinée à être lue par le ribosome pour permettre la synthèse des nouvelles protéines. Ils ont pour cible les ribosomes bactériens, les organites cellulaires qui sont responsables de la synthèse protéiques. C'est le cas par exemple des tétracyclines, aminosides, chloramphénicol, macrolides, acide fucidique et linézolide.

- **Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques**

Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques de différentes façons ; par l'inhibition de la réplication de l'acide désoxyribonucléique, l'inhibition de la transcription ou par la diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques. Parmi ces antibiotiques, on trouve les rifampicines, les sulfamides, les quinolones, les fluoroquinolones et les triméthoprimes.

- **Antibiotiques altérant la membrane cytoplasmique**

Les polymyxines sont des antibiotiques qui agissent sur la membrane plasmique des cellules bactériennes, en désorganisant la bicouche phospholipidique membranaire et perturbant ainsi la perméabilité de celle-ci.

III. La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques survient lorsqu'une bactérie subit des modifications de telle sorte que le traitement utilisé pour soigner la pathologie qu'elle provoque devient inefficace. Cette résistance aux substances antibactériennes entraîne une augmentation des dépenses médicales, une prolongation d'hospitalisation et une hausse de la mortalité, elle constitue un défi complexe pour la santé mondiale. La résistance aux agents anti-infectieux a été placée au premier rang des préoccupations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Pour se défendre contre l'action des médicaments antibactériens, les bactéries ont développé plusieurs mécanismes biochimiques de résistance, elles peuvent être résistantes à un ou à plusieurs antibiotiques on parle alors de bactéries multirésistantes. Les bactéries multirésistantes les plus inquiétantes sont les entérobactéries multirésistantes comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* qui sont des bactéries du tube digestif responsables d'un très grand nombre d'infections; les *S. aureus* résistants à la méthicilline, les *M. tuberculosis* multirésistants, ou encore les *P. aeruginosa* et les *Acinetobacter baumannii* qui sont responsables d'infections nosocomiales.

Ces résistances aux agents antimicrobiens peuvent être naturelles ou acquises. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. On peut citer, à titre d'exemple, les résistances naturelles des entérobactéries et de *Pseudomonas* aux macrolides, des bactéries à Gram négatif à la pénicilline et à la vancomycine, des bactéries à Gram positif à la colimycine, et des streptocoques aux aminosides (Aminov, 2009). Cette résistance est détectée dès les premiers tests réalisés afin de déterminer l'activité antibactérienne d'une substance chimique antibiotique et contribue à définir son spectre d'action.

La résistance bactérienne acquise n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce donnée normalement sensible. Ce type de résistance résulte de l'emploi thérapeutique d'antibiotique et il est dû soit à une mutation chromosomique, soit à l'acquisition d'un gène de résistance sur des éléments extra-chromosomiques qui rend la bactérie insensible à l'antibiotique. En effet, les bactéries ont en effet la capacité à s'échanger des gènes.

Les bactéries échappent à l'action des antibiotiques en utilisant différents mécanismes biochimiques (Rowe-Magnus et Mazel, 2006 ; Acaret Moulin, 2012):

- **Diminution d'accumulation de l'antibiotique**

Elle peut être due à l'incapacité de l'antibiotique à entrer dans la cellule bactérienne à cause de la diminution de la perméabilité membranaire des cellules bactériennes à l'antibiotique ou alternativement à un export actif de l'agent antibactérien hors de la cellule.

- **Inactivation de l'antibiotique**

La résistance est souvent le résultat de la production des enzymes qui sont capables d'inactiver ou de détruire l'antibiotique.

- **Altération de la cible**

Une résistance peut apparaître suite à la modification de la cible de l'antibiotique, ce changement de la structure va diminuer son affinité vis-à-vis cet agent antibactérien.

Le 30 avril 2014, l'OMS a publié son rapport mondial sur la résistance aux anti-infectieux (le premier portant sur la résistance aux antimicrobiens, dont la résistance aux antibiotiques, à l'échelle mondiale), qui montre que cette menace pour la santé humaine touche toutes les régions du monde, et que, si rien n'est fait, le monde s'achemine vers une ère post antibiotiques, où des infections courantes et des blessures mineures pourraient à nouveau provoquer la mort des infectés. Ce problème de résistance est considéré comme une urgence pour cette organisation internationale qui a publié le 27 février 2017 dans son rapport *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotic* une liste de 12 des agents pathogènes prioritaires pour le développement de nouveaux agents antibactériens.

Cette liste des bactéries a été établie pour essayer d'orienter et de promouvoir la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes, dans le cadre des efforts de l'OMS pour lutter contre la résistance croissante aux antibiotiques dans le monde.

IV. Liste OMS des bactéries prioritaires pour le développement de nouveaux traitements

L'OMS recense 12 bactéries pathogènes prioritaires dont certains causent des infections courantes comme la pneumonie ou les infections urinaires qui montrent des résistances croissantes aux antibiotiques utilisés et pour lesquels il faut rapidement trouver de nouveaux agents thérapeutiques.

Cette organisation observe un manque criant d'agents thérapeutiques contre *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, et *M. tuberculosis* multirésistants et contre les bactéries Gram négatif opportunistes, y compris *Acinetobacter*, *Klebsiella* et *Escherichia coli*, lesquels peuvent causer des infections nosocomiales sévères et souvent mortelles.

Priorité 1: Critique

Le premier groupe de la liste est la catégorie de priorité critique, il comporte des bactéries multirésistantes comme *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et diverses entérobactéries, dont *Klebsiella* et *E. coli*, qui provoquent des maladies graves, souvent mortelles, telles que des infections sanguines et des pneumonies.

- *A. baumannii*, résistance aux carbapénèmes
- *P. aeruginosa*, résistance aux carbapénèmes
- Enterobacteriaceae, résistance aux carbapénèmes

Priorité 2: Élevée

Les catégories de priorité élevée et moyenne regroupent des bactéries de plus en plus résistantes provoquant des pathologies plus courantes telles que la gonorrhée ou les intoxications alimentaires.

- *E. faecium*, résistance à la vancomycine
- *S. aureus*, résistance à la méthicilline, résistance à la vancomycine
- *Helicobacter pylori*, résistance à la clarithromycine
- *Campylobacter* spp, résistance aux fluoroquinolones
- *Salmonellae*, résistance aux fluoroquinolones
- *Neisseria gonorrhoeae*, résistance aux céphalosporines, résistance aux fluoroquinolones

Priorité 3: Moyenne

- *S. pneumoniae*, insensible à la pénicilline
- *Haemophilus influenzae*, résistance à l'ampicilline
- *Shigella* spp, résistance aux fluoroquinolones

De nouveaux agents antibactériens ciblant les bactéries de la catégorie prioritaire de cette liste aideront à faire diminuer le taux des décès dus aux infections par des bactéries résistantes dans le monde.

V. La découverte des nouveaux agents antimicrobiens

La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques est une menace mondiale qui a orienté la recherche pour le développement de nouveaux composés antibactériens avec un large spectre d'activité.

D'après un nouveau rapport présenté par l'OMS en 2017 (*Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*), le nombre de nouveaux antibiotiques en cours de mise au point est très insuffisant pour combattre le problème de la résistance aux antibactériens, et la plupart des agents thérapeutiques en développement clinique sont des modifications de classes actuelles d'antibiotiques et ne sont que des solutions à court terme.

La meilleure démarche pour pallier ce problème de résistance est de développer de nouveaux antibactériens avec de nouvelles formulations et de nouveaux mécanismes d'action. De nouvelles familles d'antibiotiques avec des mécanismes d'action originaux sont en cours d'étude, comme les inhibiteurs de la peptidase déformylase (objet de notre étude) et de la méthionine aminopeptidase bactériennes (Butler *et al*, 2014 ; Helgren *et al*, 2017).

CHAPITRE II

LE CRIBLAGE VIRTUEL

CHAPITRE II

LE CRIBLAGE VIRTUEL

I. Développement de nouveaux médicaments

Le processus de découverte et de mise sur le marché d'un nouveau médicament s'organise en plusieurs étapes : l'identification d'une cible biologique, développements précliniques, essais cliniques, puis surveillance post commercialisation.

L'activité biologique d'un médicament peut se simplifier à l'échelle moléculaire en ne considérant que l'interaction entre le principe actif du médicament et le site actif d'une cible pharmacologique bien définie. La liaison correspondante implique une complémentarité structurelle et une affinité de l'un des deux partenaires pour l'autre, et modifie les propriétés de la cible pharmacologique pour répondre à la maladie qui doit être traitée.

I.1. Identification d'une cible thérapeutique

Le concept d'un médicament est indissociable de celui de la cible moléculaire sur laquelle il agit pour donner son effet thérapeutique. Le développement d'un nouveau médicament nécessite donc de bien connaître le fonctionnement et les caractéristiques de la cible pharmacologique correspondante (Dickson et Gagnon, 2004). Ce processus peut se faire grâce aux méthodes expérimentales classiques (Lindsay, 2005), mais aussi par des approches génomiques et informatisées (Butcher *et al*, 2004).

Une cible pharmaceutique peut être caractérisée de différentes manières : une structure, un mécanisme biologique, une séquence nucléique ou protéique, *etc.* Chacune de ces caractérisations ouvre des possibilités d'étude dans le but du développement de nouveaux principes actifs.

L'accessibilité expérimentale de la cible est un paramètre crucial pour pouvoir étudier l'effet biologique d'un composé donné sur la cible.

I.2. Mise au point des molécules bioactives

Une fois que la cible biologique est identifiée et validée, plusieurs approches peuvent être utilisées pour la recherche de nouvelles substances thérapeutiques dont celle du criblage haut-débit robotisé (Figure II.1), Cette technique permet l'évaluation de l'activité biologique d'un grand nombre de molécules vis-à-vis une cible d'intérêt pharmacologique, dans un temps très court mais avec un coût très important ce qui limitera beaucoup le nombre de composés que l'on pourra tester grâce à cette approche expérimentale.

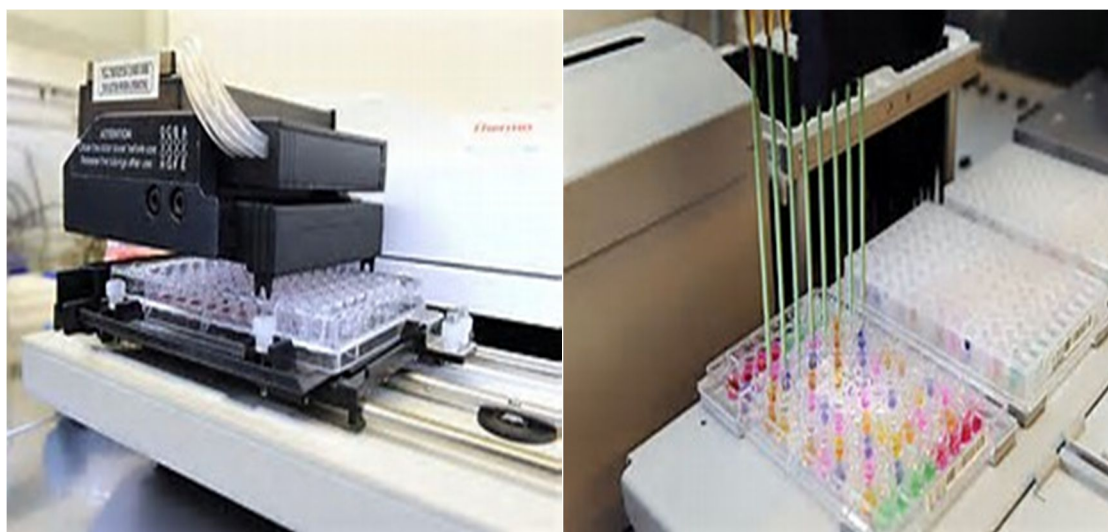


Figure II.1 Criblage haut-débit robotisé

Le criblage virtuel (Walters *et al*, 1998 ; Shoich *et*, 2004) en complément des tests expérimentaux répond à ce besoin. C'est la méthode prédictive la plus utilisée dans la conception des nouveaux médicaments grâce aux outils informatiques. La technique de criblage virtuel peut être divisée en deux stratégies : criblage virtuel basé sur la structure de la cible (Anderson, 2003) et criblage virtuel basée sur la structure des ligands de références (Bajorath, 2002). Ces approches sont capables de prédire l'effet biologique d'un grand nombre de molécules dans un temps raisonnable et de proposer à la fin une série réduite de molécules à synthétiser ou acheter et à tester expérimentalement sur une cible donnée (Dobson, 2004; Lipinski *et* Hopkins, 2004).

II. L'importance des chimiothèques dans la recherche de nouvelles substances thérapeutiques

Les approches de criblages, virtuels et expérimentaux, jouent un rôle primordial dans le développement de nouvelles molécules bioactives. La sélection des molécules à cribler est une étape essentielle qui diminue le nombre des composés à tester, plusieurs filtres préliminaires peuvent être utilisés pour que les composés choisis valident certains critères, ces filtres peuvent être classés en deux grandes catégories, les premiers consistent à réduire l'espace chimique étudié, en se basant sur l'exclusion des composés avec de mauvaises propriétés physico-chimiques et des caractéristiques incompatibles avec celles de molécules d'intérêt pharmaceutique, les deuxièmes permettent de choisir les composés à cribler selon la structure et les propriétés des ligands de références.

Les fournisseurs de produits chimiques disposent des chimiothèques, des banques de données de molécules, contenant toutes les informations concernant les molécules qu'ils vendent. Certains fournisseurs proposent des bibliothèques prétraitées pour le criblage, par exemple des ensembles de molécules possédant les caractéristiques physico-chimiques d'un médicament « *drug-like* » (Lipinski *et al*, 2001), des molécules choisies par diversité, des produits naturels et leurs dérivés ou des bases focalisées sur certaines cibles thérapeutiques comme la bêta-lactamase, la neuraminidase et l'acétylcholinestérase.

L'utilisation de ce type de bases présente plusieurs inconvénients car le choix des molécules à cribler virtuellement ou expérimentalement dépend du projet de recherche, et avec des produits déjà sélectionnés et peuvent être utilisés par d'autres chercheurs la chance de trouver des touches originales est faible. Il est donc préférable pour chaque projet de conception de nouveaux médicaments de faire ses propres sélections.

Il existe des bases de données des composés chimiques regroupant les molécules de plusieurs fournisseurs, la plus grande est le *Chemical Abstracts Service*, avec 121 millions de structures (<http://www.cas.org/>), Cependant, il n'est pas possible de faire du criblage virtuel sur cette base, ni d'acheter directement des composés. La plus grande base de produits commerciaux est iResearch de ChemNavigator, qui contient 102 millions de composés provenant de 200 fournisseurs différents (<http://www.chemnavigator.com/>). Il y a aussi des bases comme ZINC (<http://zinc.docking.org/>), ChemDB (<http://cdb.ics.uci.edu/CHEM/Web/>), ChemBank (<http://chembank.broad.harvard.edu/>) et PubMed (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

nih.gov/) qui présentent leurs produits gratuitement au format SDF avec toutes les informations concernant les vendeurs de chacun.

III. Le processus de criblage virtuel

III.1. Utilisation dans le processus de développement des nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique

Le criblage virtuel est une méthode *in silico* très utile dans les premières phases du processus de développement de nouvelles molécules bioactives (Waszkowycz *et al*, 2001 ; Oprea et Matter, 2004 ; Shoichet, 2004), afin de gagner le temps et l'argent.

Il permet d'exploiter de larges librairies de composés chimiques pour chercher ceux qui sont plus actifs vis-à-vis d'une cible biologique donnée (Davies *et al*, 2006). Ce processus vise à restreindre l'espace chimique des composés de départ à une liste de composés ayant le plus de chances d'avoir de bons résultats aux tests expérimentaux afin d'éviter de tester inutilement des molécules.

III.2. Les stratégies du criblage virtuel

Les techniques de criblage virtuel sont basées sur la nature des informations expérimentales disponibles concernant le système étudié (Figure II.2), qui peuvent être la structure tridimensionnelle de la cible biologique "*structure-based*" (Ghosh *et al*, 2006 ; Lyne, 2002) ou la structure et les propriétés d'un ou de plusieurs composés bioactifs de référence "*ligand-based*" (Bajorath, 2002 ; Lengauer *et al*, 2004). La combinaison de ces deux stratégies dans une même étude permet d'augmenter les chances d'identifier de nouvelles touches ou d'optimiser de molécules connues (Muegge et Oloff, 2006).

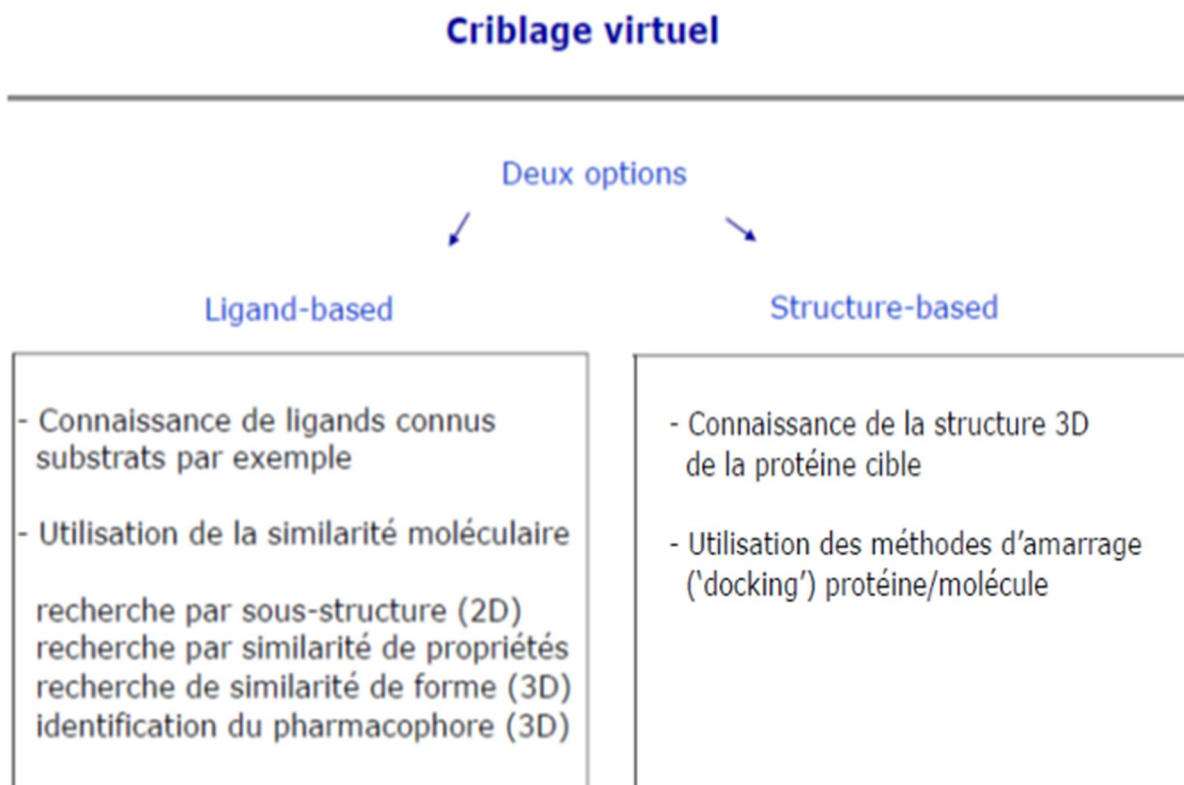


Figure II.2 Les stratégies du criblage virtuel, d'après Douguet, <http://bioinfo.ipmc.cnrs.fr>.

III.2.1. Criblage virtuel basé sur la structure de la cible: le docking

La méthode "*structure-based virtual screening*" se base sur la structure de la cible thérapeutique, elle consiste à prédire l'affinité et le mode d'interaction des molécules criblées vis-à-vis la cible considérée (Cummings *et al*, 2005 ; Ghosh *et al*, 2006). Elle correspond à un équivalent *in silico* d'un test de compétition ou de liaison expérimental. La figure suivante présente les étapes d'un criblage virtuel d'une chimiothèque par docking.

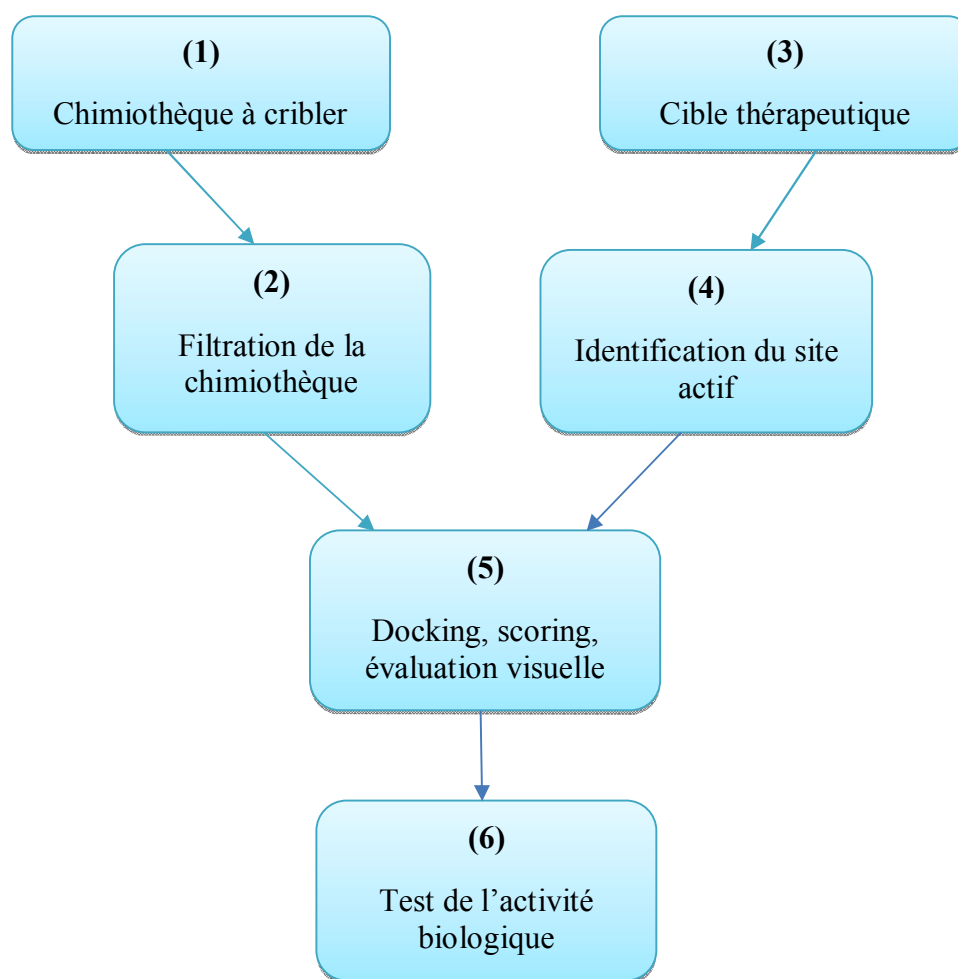


Figure II.3 Criblage virtuel par docking moléculaire, d'après Ghosh *et al*, 2006.

Il se décompose en plusieurs étapes : la première est le choix de la chimiothèque (1), la deuxième est sa filtration pour sélectionner selon le projet de recherche les composés à cribler (2). En ce qui concerne la protéine ciblée, il faut choisir une structure tridimensionnelle de haute qualité, avec une bonne résolution (3), qui peut être issue d'une des trois méthodes expérimentales suivantes : la résonance magnétique nucléaire, la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X.

La quatrième étape consiste à déterminer les résidus d'acides aminés du site actif (4), qui intervient dans le processus de reconnaissance de ligand. Un ligand cristallisé avec la cible est susceptible de renseigner sur l'emplacement du site actif.

La dernière étape est le docking moléculaire de composés sélectionnés avec le site actif de la protéine cible et le classement de ces composés en fonction de leurs affinités (5) pour prédire les molécules les plus actives pour la cible. Les résultats obtenus *in silico* doivent être confirmés grâce aux tests expérimentaux (6).

III.2.2. Les interactions protéine-ligand

La stabilité de ligand au sein du site actif de la protéine est gouvernée par des interactions de nature non covalente.

L'énergie libre se calcule selon l'équation suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq}$$

Équation II.1 Energie libre de Gibbs

R: constante des gaz (8,314 J. K⁻¹ mol⁻¹)

T: Température (K)

La constante d'équilibre K_{eq} est l'affinité de la liaison protéine-ligand. Elle caractérise la tendance de deux molécules à se lier entre eux pour donner un complexe. La complémentarité structurale du ligand avec son récepteur et les interactions présentes entre eux sont les composants de l'énergie libre.

Les molécules d'eau présentes dans le site actif jouent un rôle important, elles peuvent assurer le lien entre le ligand et le récepteur (Maréchal, 2007).

III.2.3. Criblage virtuel basé sur les structures des ligands : le pharmacophore

L'approche "*ligand-based virtual screening*" utilise des molécules connues pour être actives sur la protéine cible comme références pour déterminer les propriétés physico-chimiques et les fragments responsables de leur activité et affinité avec le récepteur (Lengauer *et al.*, 2004 ; Clark et Webster-Clark, 2008 ; Tuccinardi, 2009).

Un pharmacophore est l'ensemble de critères que doit posséder un composé pour être actif vis-à-vis la protéine cible étudiée. Un modèle pharmacophorique représente l'orientation relative des groupes fonctionnels d'une molécule dans un espace tridimensionnel, ce qui est nécessaire pour établir la liaison avec la cible et maintenir l'activité. Il constitue divers éléments pharmacophoriques tels que l'accepteur de liaisons hydrogène, le donneur de liaisons hydrogène, les groupements hydrophobiques, et le volume exclu. Les positions relatives des éléments pharmacophoriques dans le modèle sont définies par les distances et les angles entre eux.

IV. Le processus de docking moléculaire

IV.1. Principe

La méthode de docking moléculaire consiste à prédire l'affinité et le mode d'interaction d'un ligand pour son récepteur, elle peut être appliquée pour cribler virtuellement une base de centaines de milliers de composés sur une cible protéique donnée.

Les premiers programmes de docking ont été basés sur le concept de la clef –serrure (Figure II.4), introduit par Emile Fisher en 1894. Selon lequel le ligand et la protéine sont considérés comme des corps rigides capables d'interagir lorsqu'ils présentent une complémentarité structurale parfaite (Yuriev, 2011).

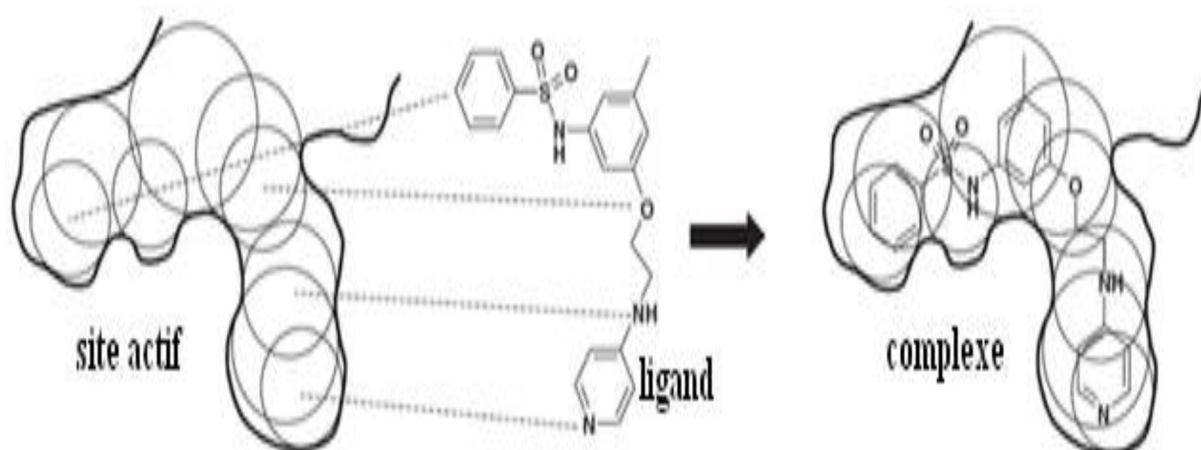


Figure II.4 Le concept clé-Serrure, d'après Leach et Gillet, 2007.

Cependant, le ligand et le récepteur ne sont pas figés, ils peuvent subir des réarrangements structuraux lors d'une liaison. Les tentatives de docking ont donc évolué vers une introduction de la flexibilité au moins sur le ligand pour explorer ses conformations aptes à établir des interactions avec les résidus de site actif du récepteur.

Concernant la protéine, le docking moléculaire ne permet toujours pas de rendre compte de son adaptation à cause de son degré de liberté élevé. De nouveaux programmes d'amarrage moléculaire qui traitent la flexibilité des résidus du site actif de la protéine sont actuellement en développement (Dias et de Azevedo, 2008 ; Yuriev, 2011).

IV.2. Les étapes de docking moléculaire

La méthode de docking s'accomplit en deux étapes complémentaires (Figure II.5). Tout d'abord, les orientations adoptées par le ligand lors de l'arrimage dans le récepteur sont explorées par un algorithme de recherche. L'étape suivante consiste à évaluer ces conformations par un calcul de l'énergie libre d'association ou de leur affinité vis-à-vis de son récepteur grâce à une fonction mathématique appelée fonction de score. Les résultats peuvent être interprétés qualitativement par observation des interactions établies par le ligand avec les résidus de site actif et quantitativement par traitement de valeurs numériques provenant de fonction de score.

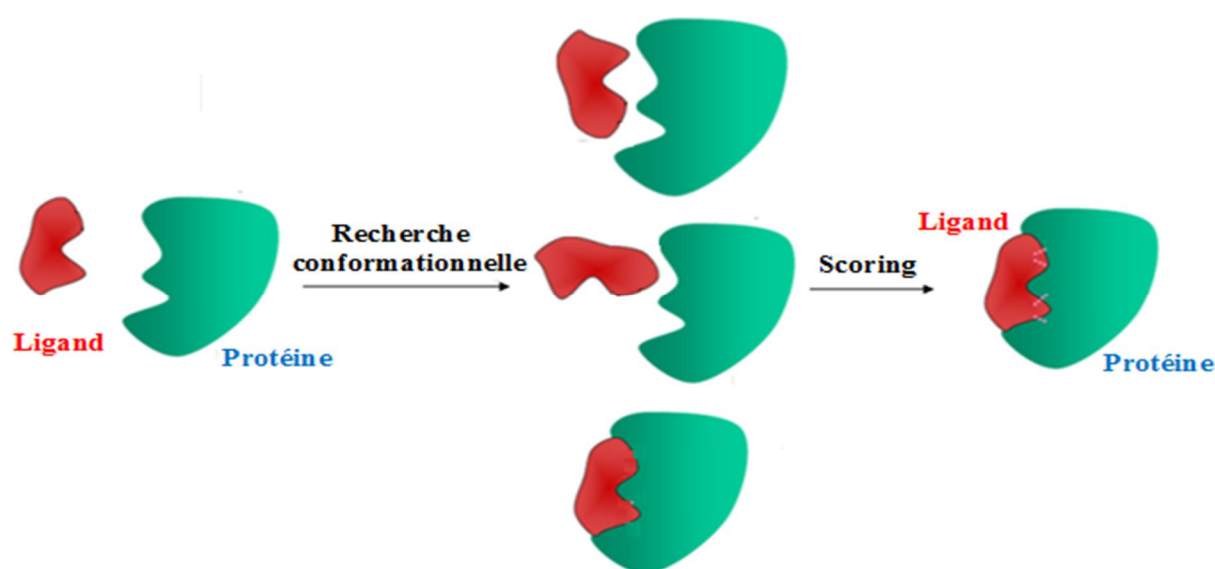


Figure II.5 Représentation schématique des étapes du docking moléculaire

IV.2.1. La recherche conformationnelle

Le principal problème de l'approche de docking est de prendre en compte la flexibilité des deux entités. Lors de l'interaction d'un ligand avec sa protéine cible, ils peuvent subir des translations et des rotations dans l'espace et par conséquent le déplacement d'un groupe d'atomes grâce à leurs liaisons flexibles, plus le nombre de ce type de liaisons augmente plus le degré de liberté et le nombre de conformations générées par les deux molécules augmentent.

Plusieurs approches ont été utilisées pour chercher les conformations les plus stables des deux composants d'un complexe. Nous avons adopté l'approche incrémentale qui est la stratégie utilisée par FlexX, le programme de docking moléculaire utilisé dans notre étude.

- **l'approche incrémentale**

Cette méthode exploite tous les degrés de liberté du ligand. Tout d'abord le ligand est fragmenté au niveau des liaisons simples. Parmi les fragments rigides, un ou plusieurs sont sélectionnés et vont servir comme fragments de base, ensuite un premier fragment est placé dans le site actif et l'interaction fragment-récepteur est évaluée puis le ligand est reconstruit par ajout d'un autre fragment aux meilleurs emplacements (Huang et Zou, 2010) (Figure II.6). Cette approche a été incorporée dans plusieurs programmes de docking moléculaire dont FlexX (Rarey *et al*, 1996) et Dock (Kuntz, 1992).

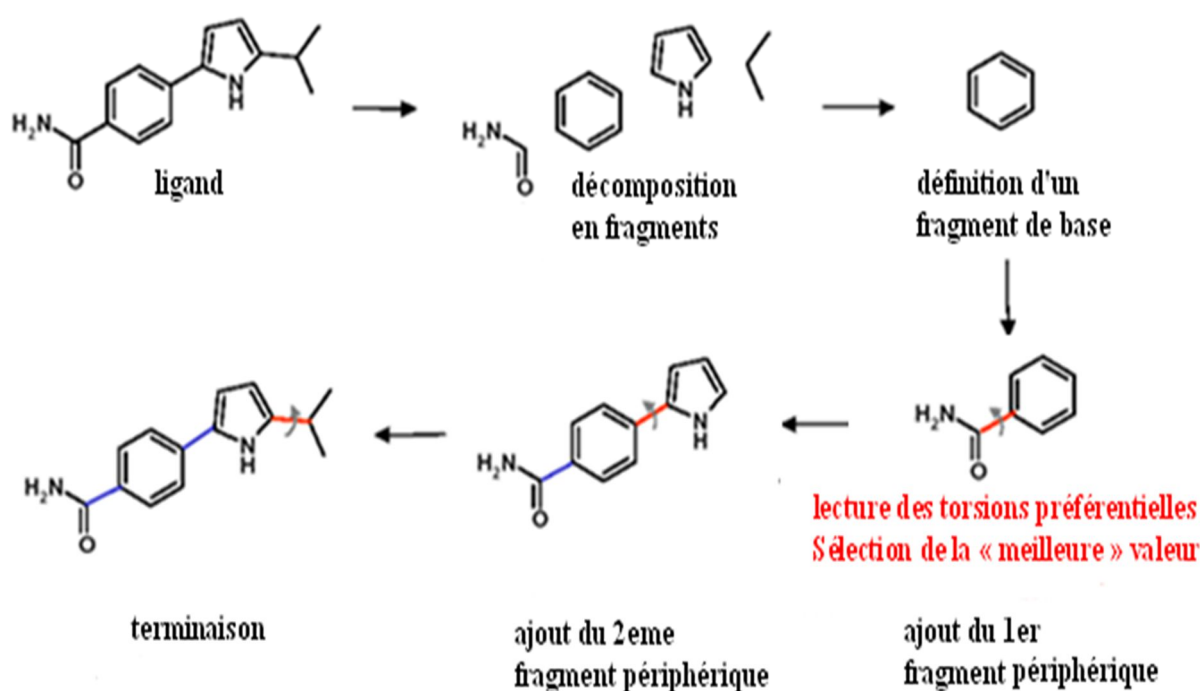


Figure II.6 Construction incrémentale d'une molécule, d'après Barbault.

<https://fr.slideshare.net/FlorentBarbault/molecular-docking-andvirtualsecreening>.

IV.2.2. L'évaluation des conformations

Les résultats du docking consistent le plus souvent en diverses orientations que le ligand peut adopter au sein du site actif. La fonction de score consiste à évaluer l'énergie d'interaction du complexe protéine-ligand formé et à classer les poses obtenues lors de l'étape de la recherche conformationnelle et proposer la pose optimale qui correspond au mode d'interaction le plus représentatif de la reconnaissance moléculaire (Thiriou, 2009). Elle permet aussi de classer les molécules selon leur affinité vis-à-vis la protéine ciblée.

Dans les programmes d'amarrage moléculaire, on trouve différentes catégories de fonction de score, elles peuvent être classées en trois : celles se basant sur des connaissances statistiques (DrugScore, LigScore, ...etc), celles utilisant un champ de force de mécanique moléculaire (CHARMM, GoldScore, ...etc.), et les fonctions de score empiriques (Bohm's Score, ChemScore, F-Score,...).

Les fonctions de score empiriques sont implémentées dans plusieurs logiciels de docking à cause de leur efficacité en termes de précision et de rapidité.

- **Fonction de score empirique**

La fonction de score empirique a été conçue pour reproduire des données d'affinité obtenues expérimentalement en se basant sur l'idée que l'énergie d'interaction peut être estimée. Elle se base sur un décompte du nombre de liaisons dans le complexe protéine-ligand comme par exemple le nombre de liaisons hydrogène, les interactions hydrophobiques, les contacts hydrophiles, la perte d'entropie lors de la formation du complexe, etc (Böhm, 1998 ; Thiriot, 2009).

Les fonctions de scores incorporées dans LUDI (Böhm, 1992) et FlexX (Rarey *et al*, 1996) sont des exemples de ce type de fonction de score.

IV.3. Principaux programmes d'amarrage moléculaire

Au fil des années, on note l'apparition d'un nombre important de programmes de docking moléculaire avec une grande diversité des algorithmes de recherche et des fonctions de score (Tableau II.1).

Tableau II.1 Principaux programmes d'amarrage moléculaire

Nom	Editeur	Site internet
AutoDock	Institut de recherche Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	Université de California-San Francisco	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrodinger	http://www.schrodinger.com/products/glide.html
Gold	Centre de données	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/

	cristallographiques Cambridge	
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html
FDS	Université de Southampton	http://www.southampton.ac.uk/
PLANTS	Université de Konstanz	http://www.uni-konstanz.de/
QXP	Novartis Pharmaceuticals Corporation	http://www.novartis.com/

IV.4. Applications du docking moléculaire

Il y a deux applications principales aux programmes de docking. La première est l'estimation du mode de liaison, qui consiste à prédire la meilleure conformation du ligand par rapport à sa protéine. La deuxième consiste à optimiser les structures des composés ayant déjà une activité avec la cible moléculaire.

L'optimisation d'une molécule déjà connue peut améliorer son affinité, sa spécificité, sa synthèse ou encore ses propriétés pharmacologiques.

V. Quelques succès du criblage virtuel par docking moléculaire

De nombreux exemples de criblage virtuel réussi ont été décrits ces dernières années (Tableau II.2). A partir de structures protéiques cristallographiques à haute résolution, et à partir de banques de données chimiques préalablement filtrées, de taille et diversité variables.

Tableau II.2 Exemples de réussites de criblage virtuel de chimiothèques

Cible biologique	Chimiothèque	Référence
Lymphome B	NCI	(Enyedy <i>et al</i> , 2001)
Carbonique anhydrase II	Maybridge/Leadquest	(Grüneberg <i>et al</i> , 2001)
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Comb.Lib	(Bressi <i>et al</i> , 2001)
protein tyrosine phosphatase-1B	Pharmacia	(Doman <i>et al</i> , 2002)
β -Lactamase	ACD	(Powers <i>et al</i> , 2002)

tyrosine kinase	Chemdiv	(Peng <i>et al</i> , 2003)
protéine de l'apoptose	Chinese Nat.Lib	(Nikolovska-Coleska <i>et al</i> , 2004)
Aldose reductase	ACD	(Kraemer <i>et al</i> , 2004)
Ribosomal A-site	Collection Vernalis	(Foloppe <i>et al</i> , 2004)
sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA)	Cactus compound collection	(Elam <i>et al</i> , 2011)
tyrosine kinase	PubChem and MDDR	(Han <i>et al</i> , 2012)
thymidine monophosphate kinase	ZINC	(Koseki <i>et al</i> , 2013)
HIV-protease	NCIn	(Islam et Pillay, 2014)
rhamnose-GlcNAc disaccharide	Diverses chimiothèques	(Renet <i>et al</i> , 2015)
Phosphodiesterase 4	NCI, Specs, et ChemDiv	(Gangwal <i>et al</i> , 2015)
penicillin binding protein	NCI, CAP et ZINC	(Sarangi <i>et al</i> , 2015)
Sirtuin humaine	ZINC	(Kokkonen <i>et al</i> , 2015)
protein kinase	Namiki shoji Co	(Nakanishi <i>et al</i> , 2015)
3-dehydroquinatase	Asinex	(Petersen <i>et al</i> , 2015)
Ligase	ZINC	(Samal <i>et al</i> , 2015)

VI. Le programme FlexX

FlexX est un programme bioinformatique pour prédire l'affinité et le mode d'interaction protéine-ligand. Pour une cible protéique donnée et un ligand, FlexX estime la géométrie du complexe formé ainsi que la force de l'interaction.

Lors de l'amarrage moléculaire, le programme FlexX tient compte de trois paramètres importants (Rarey *et al*, 1996 ; Kramer *et al*, 1999). La flexibilité conformationnelle du ligand, les types de liaisons ligand-récepteur et enfin la fonction de score.

VI.1. la flexibilité conformationnelle du ligand

La stratégie utilisée dans le programme FlexX pour le traitement de la flexibilité du ligand est la construction incrémentale, elle est divisée en trois étapes complémentaires : le choix du fragment de base, le placement du fragment de base, et enfin la reconstruction du ligand.

- **Choix du fragment de base**

La première étape, après coupure du ligand en fragments rigides et parties flexibles, est le choix d'un fragment rigide capable d'établir un nombre de liaisons suffisant avec la protéine.

- **Placement du fragment de base dans le site de liaison**

La deuxième étape est le positionnement du fragment de base dans le site actif, pour cela différents points susceptibles d'établir des liaisons avec le fragment sont générés. Puis, des jeux de deux ou trois points significatifs du site d'interaction sont extraits, formant des lignes ou des triangles. Enfin, le fragment est superposé à chaque ligne ou triangle (Figure II.7).

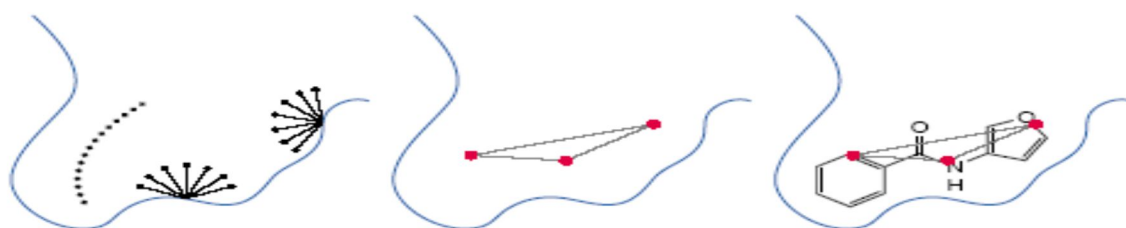


Figure II.7 Superposition des différents points du site d'interaction avec le ligand, d'après Arrault, 2007.

- **Reconstruction du ligand**

Cette dernière étape consiste à rajouter progressivement au fragment de base, toutes les parties flexibles préalablement découpées pour reconstruire le ligand (Figure II.8). La construction incrémentale peut se présenter comme un arbre où les points de premier niveau correspondent aux solutions obtenues lors de la recherche des positions pour le premier fragment.

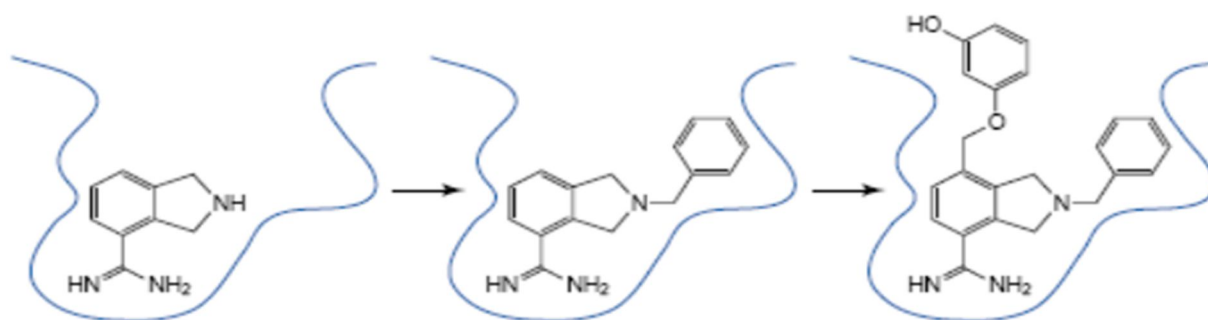


Figure II.8 Construction incrémentale d'un ligand au sein d'un récepteur, d'après Arrault, 2007.

VI.2. Les types d'interactions ligand-récepteur

Le programme FlexX repose sur la détection des interactions formées entre le ligand et le récepteur telles que les ponts d'hydrogène et salins, les contacts hydrophobiques spécifiques tels que les interactions entre le centre d'un cycle aromatique et les atomes d'un autre cycle, d'une amide ou des groupements méthyle et les interactions hydrophobiques non spécifiques entre les atomes de carbone aliphatique ou aromatique qui sont issues des distances favorisées de l'interaction.

VI.3. La fonction de score

La fonction de score utilisée dans FlexX (équation II.2) dérive de l'équation de Böhm (Böhm, 1992), c'est une estimation de l'énergie d'interaction protéine-ligand:

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} \times N_{\text{rot}} \\ & + \Delta G_{\text{hb}} \sum_{\text{ponts-H}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{\text{io}} \sum_{\text{int-ionic}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{\text{aro}} \sum_{\text{int-aro}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{\text{cont-lipo}} f^*(\Delta R) \end{aligned}$$

Équation II.2 Fonction de score utilisée par FlexX

ΔG est la variation d'énergie libre globale de complexation. ΔG_0 est l'entropie conformationnelle du ligand. ΔG_{rot} représente la perte d'entropie du ligand lors de la complexation au récepteur, il est basé sur le nombre des liaisons acycliques libres du ligand. ΔG_{hb} , ΔG_{io} et ΔG_{aro} représentent les contributions pour les groupes d'interaction appariés, comme les liaisons hydrogènes, ponts salins et les interactions aromatiques, $f(\Delta R, \Delta \alpha)$ est une fonction de pénalité qui sert à mesurer la déviation de la distance et de l'angle de liaison. ΔG_{lipo} représente les taux des contacts atome-atome entre la protéine et le ligand comme les contacts hydrophobes.

CHAPITRE III

LA PEPTIDE DÉFORMYLASE

CHAPITRE III

LA PEPTIDE DÉFORMYLASE

I. Présentation de la peptide déformylase

Leproprocessus de la biosynthèse des protéines impose que toutes les nouvelles chaînes polypeptidiques commencent par un résidu de méthionine. Pourtant ce premier acide aminé sera le plus souvent clivé par la suite pour générer une diversité de la nature d'extrémités N-terminales des protéines (Serero, 2004).

Dans le cytoplasme des eucaryotes le clivage de la méthionine N-terminal est assuré par une activité méthionine aminopeptidase. Chez les bactéries, où le résidu incorporé en position initiale est le N-formyl-méthionine, il existe une activité peptide déformylase (PDF, EC 3.5.1.88) supplémentaire (Figure III.1). La PDF est alors nécessaire à l'activité méthionine aminopeptidase et à la maturation des protéines bactériennes (Serero, 2004). La PDF est actuellement une des cibles majeures de plusieurs groupes pharmaceutiques comme les antibiotiques (Merzoug *et al*, 2015 ; Khan *et al*, 2016), les antipaludismes (Nguyen, 2005) et les anticancéreuses (Peng *et al*, 2014 ; Gao *et al*, 2016).

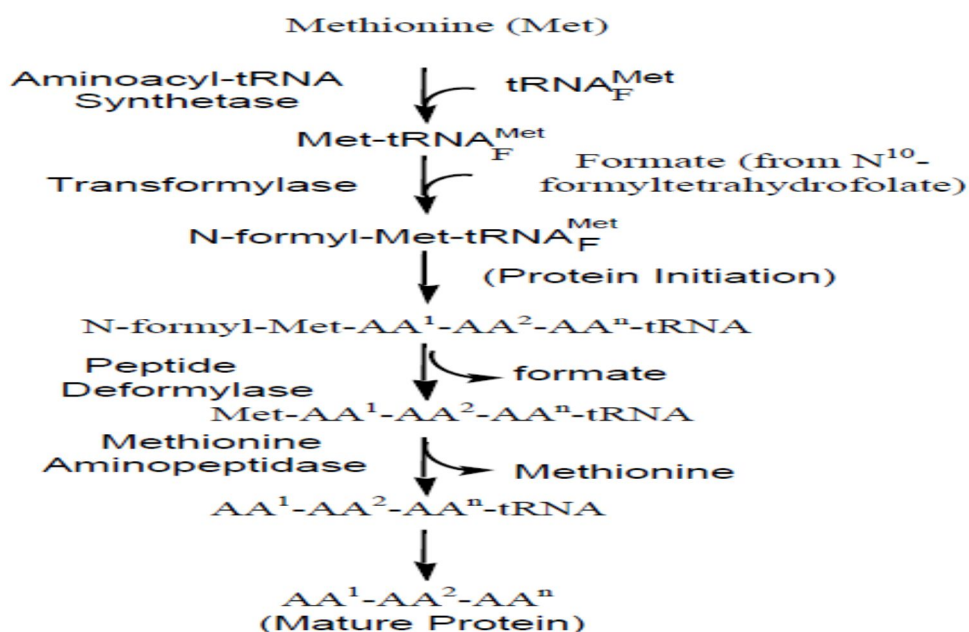


Figure III.1 Initiation de la synthèse des protéines par la méthionine et rôle du PDF, d'après Nguyen, 2005.

Comme la synthèse des protéines cytoplasmiques eucaryotes n'implique pas la N-formylation, il a été généralement admis que les eucaryotes ne nécessitaient pas d'activité PDF. Cependant, le séquençage des génomes eucaryotes a révélé l'existence de séquences codant des homologues de la PDF bactérienne chez les parasites, les plantes et les mammifères, y compris les êtres humains (Serero, 2004), ces homologues sont présentés dans les organites, chloroplastes et mitochondries, des cellules eucaryotes (Nguyen *et al*, 2003 ; Serero, 2004).

Bien que la mise en évidence de l'activité de la PDF chez les bactéries ait été décrite en premier par Adams en 1968, l'incapacité de purifier cette enzyme a empêché les tentatives de sa caractérisation jusqu'au clonage du gène codant la PDF par Meinnel *et al* en 1993. Depuis, les PDFs de nombreuses espèces bactériennes ont été purifiées et caractérisées. La première est la Fe²⁺-PDF d'*E. coli*, elle a été purifiée en 1997 par Rajagopalan *et al*.

Le Fe²⁺ est l'ion métallique catalytique qui occupe le site actif de la PDF *in vivo* (Rajagopalan et Pei, 1998 ; Saxena et Chakraborti, 2005). Les formes natives de la plupart des enzymes PDF sont très instables en raison de la propension à l'oxydation, ce qui les rend difficiles à purifier (Rajagopalan et Pei, 1998 ; Saxena et Chakraborti, 2005). Heureusement, le Fe²⁺ peut être remplacé *in vitro* par d'autres cations divalents comme le Ni²⁺ ou le Co²⁺, entraînant ainsi une très grande stabilité de l'enzyme et une activité catalytique presque identique à la forme Fe²⁺ native (Ragusa, 1998 ; Rajagopalan, 2000).

II. Classification des PDFs

Les analyses phylogénétiques et structurelles des PDFs de différentes espèces bactériennes et des PDFs homologues ont révélé que les PDFs peuvent être classées en trois formes distinctes: PDF1, PDF2 et PDF3. Les eucaryotes sont de type 1; les procaryotes sont soit de type 1 ou 2, tandis que les Archaea, les leishmanias et les Trypanosomatida sont de type 3 (Giglione, 2004; Guilloteau, 2002).

- **La classe I (PDF1)**

Elle peut répartie en deux sous-groupes :

- **PDF1A** : Cette sous classe est représentée par les PDFs trouvées spécifiquement dans les mitochondries des eucaryotes (Serero, 2004).

- **PDF1B** : Représente les PDFs mitochondriales et chloroplastiques des plantes (Serero, 2004) et les PDFs des bactéries à Gram négatif et certain bactéries à Gram positif (Giglione, 2000).

- **La classe II (PDF2)**

Elle appartient exclusivement à des bactéries à Gram positif et à des mycoplasmes (Meinzel et Blanquet, 1993). L'alignement des séquences d'acides aminés des PDFs de type 2 avec les séquences de type 1 montre que les PDFs1 ont une identité significative de 30 à 36 % aux PDFs2 (Escobar, 2009).

- **La classe III (PDF3)**

Elle représente des homologues nouvellement identifiés chez les Archaeas, Leishmanias et Trypanosomatida. Ces PDFs sont inactives à cause des substitutions cruciales au niveau des trois motifs conservés (Meinzel, 2000 ; Giglione *et al*, 2015).

Les PDFs humaines sont de type 1 (HsPDFs), elles sont spécifiquement exportées vers les mitochondries (Serero, 2004). Elles possèdent une activité déformylase faible (Serero, 2004 ; Nguyen *et al*, 2003). Les séquences de HsPDFs ont entre 30% et 40% de similitude avec les séquences des autres types de PDF (Giglione, 2004). La diminution de la croissance des cellules humaines par les inhibiteurs de la PDF, comme l'actinonin et ses analogues, suggèrent que la HsPDF est fonctionnelle dans les mitochondries humaines (Giglione, 2003).

III. Structure tridimensionnelle

Les structures cristallographiques de nombreuses PDFs bactériennes sont disponibles dans la Protéine Data Bank (PDB) dont la majorité sous forme de complexes PDF-ligand. Ces derniers se différencient par la source bactérienne de la PDF, l'ion métallique présent au niveau du site d'interaction, la nature du ligand intervenant dans le complexe et le degré de résolution de l'enzyme. Les PDFs sont de petits monomères composées d'environ 160 à 200 résidus.

Une vue générale de la structure tridimensionnelle de la PDF de *E. coli* est présentée dans la figure III.2. En résumé, la PDF d'*E. coli* contient 6 hélices α et 14 feuillets β .



Figure III.2 Figure en ruban de la structure de la peptide déformylase d'*E. coli*. Les régions de l'hélice α sont montrées en bleu, rouge et jaune, les feuillets- β en vert et l'ion métallique en gris, d'après Chan *et al.* (1997).

Les fonctions de la plupart des récepteurs résultent de leur capacité à reconnaître et à fixer d'autres molécules. Une telle reconnaissance dépend de sites d'interaction spécifiques susceptibles d'établir des liaisons multiples avec le ligand. L'alignement de séquences de la PDF de diverses espèces bactériennes révèle la présence de trois motifs conservés (Figure III.3), G Φ G Φ AAXQ, EGC Φ S, et HE Φ DH (Φ est un acide aminé hydrophobique et X un acide aminé quelconque), qui sont censés former le site actif de l'enzyme (Meinzel *et al.*, 1995 ; Chan *et al.*, 1997). L'ion métallique du site catalytique est coordonné à 2 histidines de la troisième région conservée, une cystéine de la deuxième région et une molécule d'eau (Meinzel *et al.*, 1997).

La glutamine et la glycine du motif G Φ G Φ AAXQ et le glutamate du motif HE Φ DH jouent des rôles importants dans la fonction catalytique de la PDF, car leurs chaînes latérales sont directement impliquées dans la reconnaissance du groupement formyle du substrat (Figure III.4) (Becker, 1998 ; Hao, 1999 ; Ragusa, 1999).


```

Haemophilus influenzae Rd      MIA LNVLIYPDDHLKVVCEPVTKV NDAIRKIVDDMFDT
Neisseria meningitidis MC58    MAL LNILQYPDERLHTVAKPVEQV DERIRKLIADMFET
Vibrio cholerae El tor N16961 MAV LEILTAPDPRLRVQSKQVTDV ASVQTLIDDLDDT
Escherichia coli H7           MSV LQVLHIPDERLRKVAKPVEEV NAEIQRIVDDMFET
Staphylococcus aureus N315     MLTMKDIIRDGHPTLRQKAAEELPLTKEEKETLIAMREF
Mycoplasma pneumoniae M129     MELLPTKAWLVLDVKEINEPTKPVQFPLDQASLDCIAKMMAY
Bacillus subtilis             MITMENIVRDGHPALRETAEPVELDPTDAEKQQLADMIEF
Enterococcus faecalis V583     MITMKDIIREGNPTLRVAEEVVPVITEEDRQLGEDMLTF
Lactococcus lactis subsp.lactis MISMDDDIIREGYPTLREVANDVTLPLSDEDIILGEKMLQF
S.pyogenes SF370             MSAQDKLIKPSHLITMDDIIREGNPTLRVAKEVSLPLCDEDILLGEKMMQF

```

```

Motif 1          GΦGΦAAxQ
H.i. MY          QEK GIGLAAPQVDILQRIITIDVEGD      KQNQF
N.m. MY          ESR GIGLAATQVDVHERVVVMDLTED      RSEPR
V.c. LY          ATDNGIGLAAPQVQREEAIVVIDLSDN      RDQPL
E.c. MY          AEE GIGLAATQVDIHQRIIIVDSEN       RDERL
S.a.            LVNSQDEEIAKRYGLRSGVGLAAPQINISKRMIAVLI PDDGSG      KSYDY
M.p.            VDASYNGD AEKYGIIPGIGIAANQIGYWKQMFYIHLMDGG      VEKHC
B.s.            VKNSQNPPELAEKYKLRPGVGLAAPQINIKKRMIAVHAEDASG      KLYSY
E.f.            LKNSQDPVKAEEQLRGGVGLAAPQLDISKRI IAVHVPSNDPENET    PSLST
L.l.            LHNSQDPVMAEKMGLRGGVGLAANQLGLLKKVIAVLI PWEPEVDEDGNEI  PPKEAYKMRE
S.p.            LKHSQDPVMAEKLG LRAQVGLAAPQIDVSKRI IAVLVPNLPDKEGN    PPKEAYSWQE

```

```

Motif 2          EGCΦS
H.i.            VLINPEILASE GETGI EEGCLSIPGFR ALVPRKEKVTVRALD RDGKEFTLDADGLLAIC
N.m.            VFINPVIVEKD GETTY EEGCLSPGIY DTVTRAERVKVEALN EKGEKFTLEADGLLAIC
V.c.            VLINPKVVS GS NKEMG QEGCLSPDYY ADVERYTSVVVEALD REGKPLRIETSDFLAIV
E.c.            VLINPELLEKS GETGI EEGCLSIPEQN ALVPRAEKVKIRALD RDGKPFLEADGLLAIC
S.a.            MLVNPKIVSHSVQEA YLPTGEGCLSDDNVAGLVHRHRNRITIKAD IEGNDIQLRLKGYPAIV
M.p.            LLINPKIINL SANKSPLKSGEGCLSVDPKMHQGYVIRHEWITITCFDWLQQKEITITATCLPCMC
B.s.            ALFNPKIVSHSV EKS YLTS GEGCLSVDEAIPGYVPRYARIRVKGTT LEGENIDIRLKGPPAIV
E.f.            VMYNPKILSHSV QDVCLGEGEGCLSVDRDVPGYVVRHNKITVSYFD MAGEKHVRLKNYEAVI
L.l.            IMYNPKIVSHSV QDAAVEGEGEGCLSVDRREVPGYVVRHARVTVEYYN KEGEKKIRLKGDFPAIC
S.p.            VLYNPKIVSHSV QDAALSDGEGCLSVDRVVEGYVVRHARVTVDYYD KEGQQHRIKLKGYN AIV

```

```

Motif 3          HEΦDH
H.i.            IQHEIDHLNGILFVDYL      SPLKRQRIKEKLIKYYKKQIAKS
N.m.            VQHELDHLMGIVFVERL      SQLKQGRIKTKLKKRQKHTI
V.c.            MQHEIDHLSGNLFIDYL      SPLKQQMAMKVKVKKHVKNRAR
E.c.            IQHEMDHLVGLFMDYL      SPLKQQRIRQKVEKLDRLKARA
S.a.            FQHEIDHLNGVMFYDHDIDKNHPLQPHTDAVEV
M.p.            LQHEFDHLQGRFY YHRINPLNPLFTINKENKVINPALPSDSE
B.s.            FQHEIDHLNGVMFYDHDIDKENPFKEPENAIAIER
E.f.            VQHEIDHINGIMFYDHDINKENPFALKEGVLVIE
L.l.            VQHEIDHTNGVMFYDHDINMNDPWEIKDGMIVK
S.p.            VQHEIDHINGVLFYDRINAKNPFETKEBELLILD

```

Figure III.3 Alignement des séquences des PDFs bactériennes provenant d'*H.influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *S. aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *E. faecalis*, *Lactococcus lactis* et *Staphylococcus pyogenes*, d'après Baldwin *et al*, 2002.

Les trois régions GΦGΦAAxQ, EGCΦS, et HEΦDH sont conservées dans toutes les PDFs bactériennes, mais la comparaison entre les séquences des HsPDF et des autres mammifères et celles retrouvées chez les procaryotes et les végétaux fait apparaître chez les formes animales des substitutions dans les motifs CΦGΦSAPQ et EGCES (Giglionne, 2004), qui sont impliqués dans le site actif et la fonction catalytique de l'enzyme (Meinzel, 1997). Ces différences structurales pourraient être utilisées comme base pour améliorer les inhibiteurs des PDFs pour les utiliser dans les traitements des infections d'origine bactériennes chez les êtres humains.

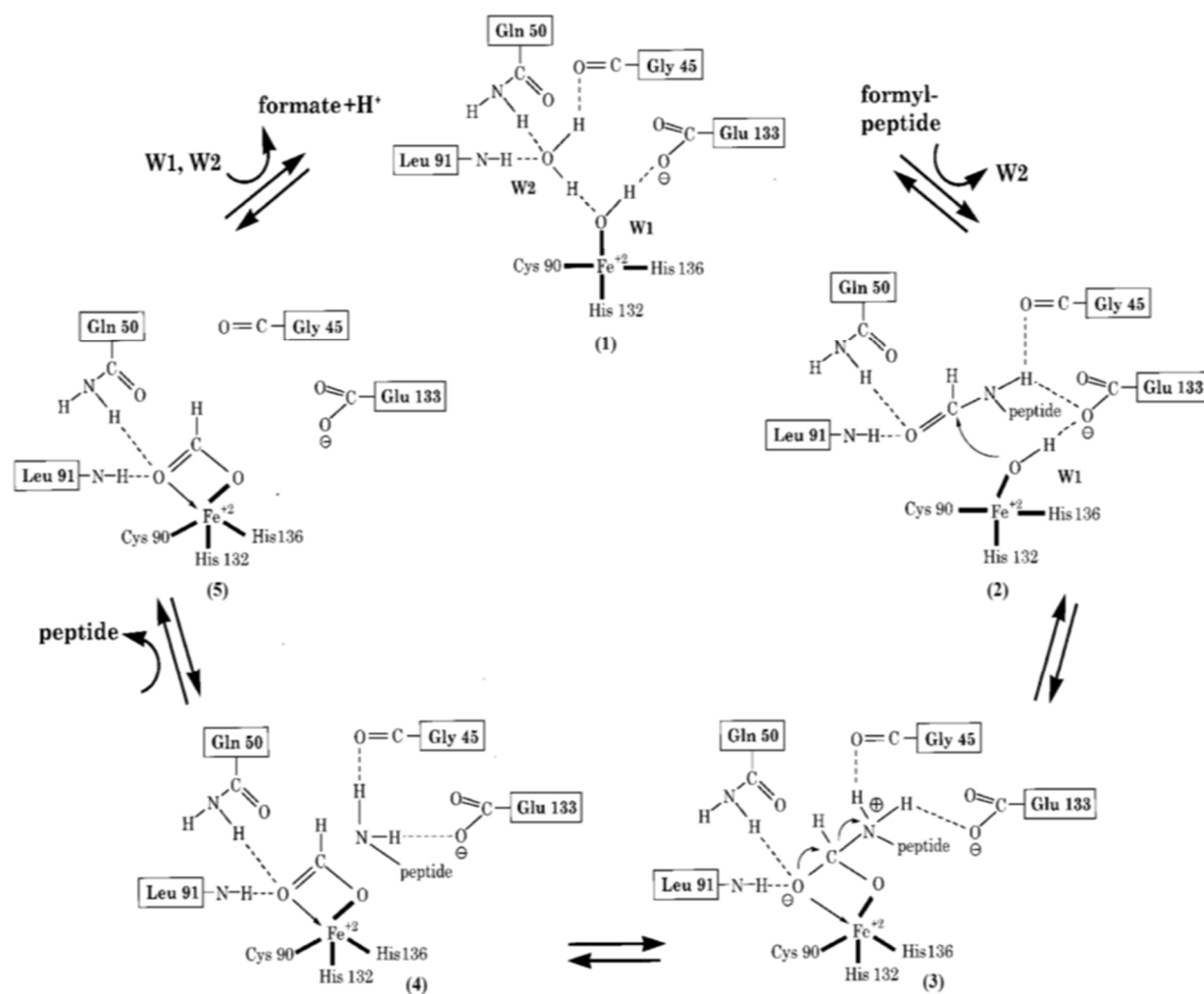


Figure III.4 Mécanisme catalytique moléculaire de la PDF. Jaiprakash *et al*, 2015.

IV. Site actif et poches d'interaction avec le substrat

Le site actif de la PDF peut être divisé en trois poches de liaison au substrat qui sont les poches S1', S2', S3' ainsi que le site de liaison de métal, les positions correspondantes sur le substrat ou les inhibiteurs sont référencées comme P1', P2', P3' (Figure III.5).

La poche S1' est le site de liaison de la chaîne latérale de méthionine du substrat (Figure III.5) et, par conséquent, elle se compose principalement de résidus hydrophobes (Smith, 2003). La comparaison des structures tridimensionnelles des PDFs de divers bactéries à Gram positif et à Gram négatif montre que la cavité S1' garde la même forme et la nature chimique dans toutes les enzymes, bien que divers acides aminés revêtissent la cavité dans chaque cas (Guilloteau, 2002). Toutes les PDFs bactériennes ayant besoin de cliver le groupement N-formyle des nouvelles chaînes polypeptidiques, il n'y a pas de surprise à ce que toutes les PDFs aient une cavité similaire pour recevoir la méthionine du substrat.

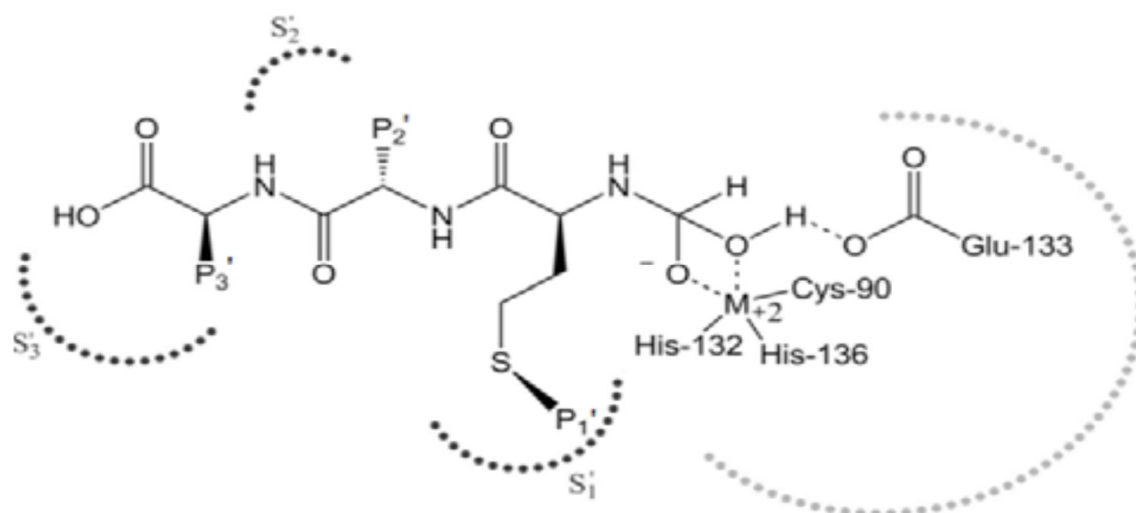


Figure III.5 Représentation schématique du site actif de la PDF, d'après Jaiprakash *et al*, 2015.

Les deux autres cavités ne sont pas bien définies, la cavité S2' des PDFs de classe I est légèrement plus grande que celle des PDFs de classe II (Guilloteau, 2002), ce qui suggère que les composés avec de grands substituants à P2' peuvent inhiber sélectivement cette classe d'enzymes (Smith, 2003). La poche S3' est la région la moins conservée du site actif entre les PDFs des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, les acides aminés formant la poche S3' diffèrent selon les espèces (Smith, 2003).

Le degré variable de similitude entre ces poches d'interaction permet de différencier les inhibiteurs spécifiques aux inhibiteurs à large spectre. Il est probable que les inhibiteurs à large spectre pourraient être désignés à condition que l'énergie d'interaction provienne principalement des liaisons avec des acides aminés conservés, tandis que les inhibiteurs spécifiques à certaines espèces pourraient résulter d'une focalisation sur les interactions avec des sites variables (Smith, 2003).

V. Inhibiteurs de la PDF

Les inhibiteurs de la PDF démontrent une activité puissante contre un large spectre de bactéries, y compris ; *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus viridans*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *M. pneumoniae*, *Chlamyphila pneumoniae*, *Bacteroides fragilis*, *M. tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *P. aerogenosa*, ainsi que les anaérobies (Jones *et al*, 2003 ; Azoulay-Dupuis *et al*, 2004 ; Cynamon *et al*, 2004 ; Lofland *et al*, 2004 ; Kwon *et al*, 2007 ; Robert, 2011 ; Ross *et al*, 2011 ; O'Dwyer *et al*, 2013 ; Zhi-wang *et al*, 2013).

Certains rapports suggèrent que la croissance *in vitro* de *Plasmodium falciparum* et même *in vivo* de tumeur peuvent être inhibées par les inhibiteurs de la PDF (Nguyen, 2005 ; Peng *et al*, 2014 ; Gao *et al*, 2016) ce qui suppose l'utilisation potentielle des inhibiteurs de la PDF comme des agents antiparasitaires et anticancéreux. La classification des inhibiteurs de la PDF est présentée dans la figure suivante (Figure III.6).

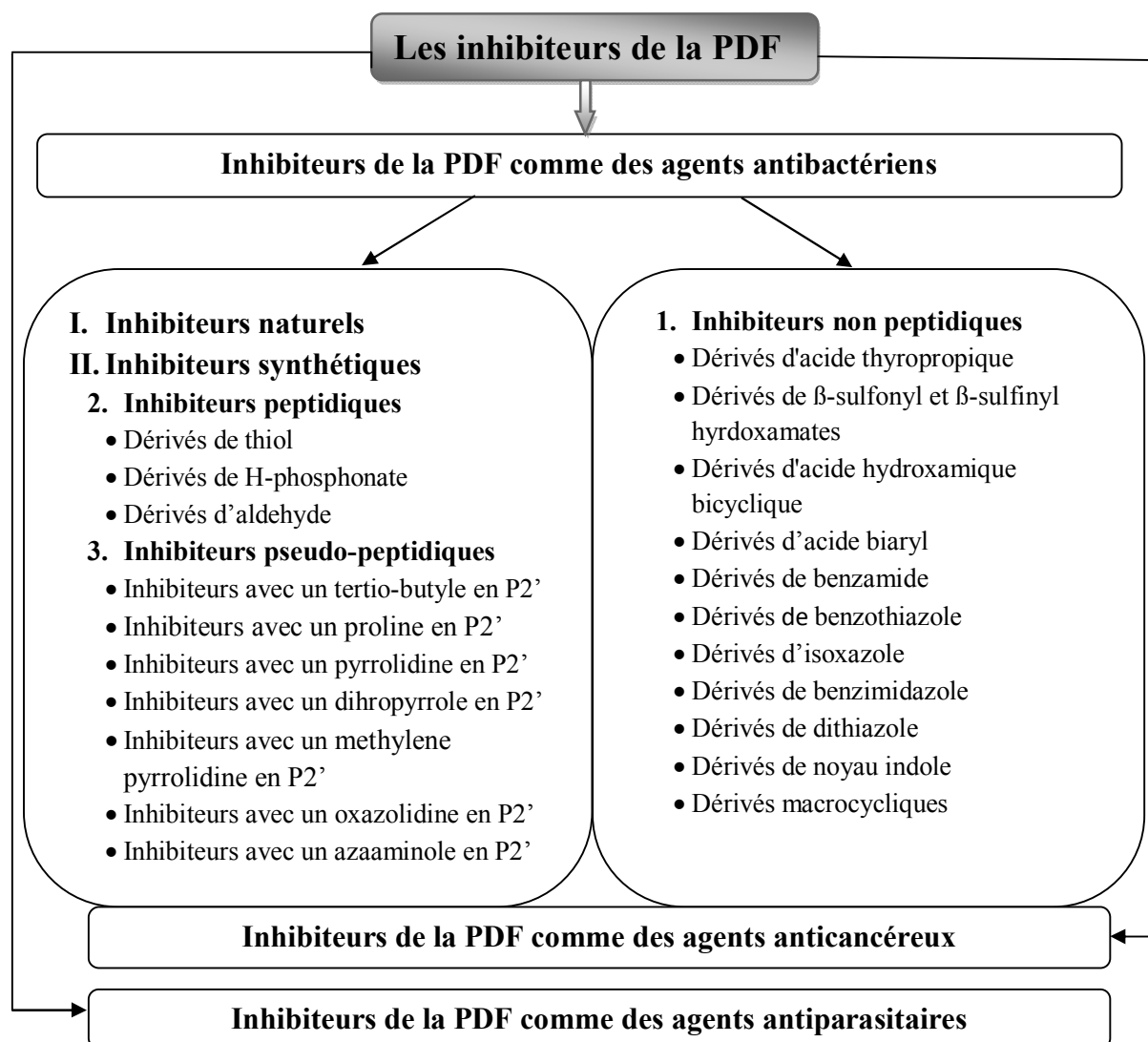


Figure III.6 Classification des inhibiteurs de la PDF, d'après Jaiprakash *et al*, 2015.

VI. Inhibiteurs de la PDF comme agents antibactériens

Tous les inhibiteurs de la PDF identifiés jusqu'ici contiennent un groupement qui se lie au métal du site catalytique. Les futurs inhibiteurs doivent garder le groupement hydrophobe en position P1', lequel limite la chaîne latérale de la méthionine du substrat, afin d'occuper la poche S1' de l'enzyme et contribuer à l'affinité de l'interaction. Au contraire, il y a plus d'opportunité à faire varier les groupements destinés à occuper les poches S2' et S3'. Les

inhibiteurs actuels de la PDF se distinguent, en effet, par des différences au niveau de ces groupements qui resteront les parties critiques dans la détermination de la sélectivité des futurs inhibiteurs.

VI.1. Les inhibiteurs naturels

VI.1.1. L'actinonin

De nombreux inhibiteurs naturels de la PDF ont été identifiés, le premier est l'actinonin (Figure III.7), il a été isolé pour la première fois en 1962 par Gordon *et al* à partir d'un actinomycète (Gordon *et al*, 1962). L'actinonin a exhibé une activité antibactérienne *in vitro* contre un large spectre des espèces à Gram positif et à Gram négatif (Chen *et al*, 2000), cette puissante activité antimicrobienne ne se traduit pas *in vivo* et cela est vraisemblablement dû à de mauvaises propriétés pharmacocinétiques (Chen *et al*, 2000).

L'identification de l'actinonin comme un inhibiteur de la PDF a été la clé dans la conception et le développement d'autres inhibiteurs plus puissants (Chikhi *et al*, 2006).

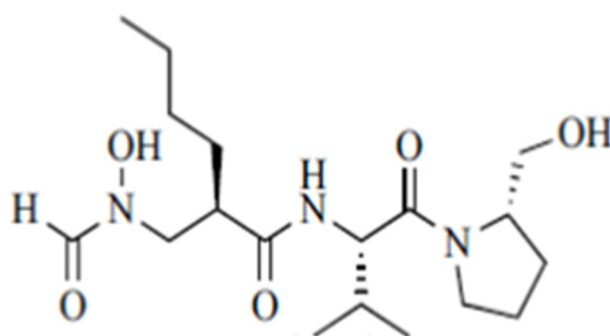


Figure III.7 Structure chimique de l'actinonin, d'après Gordon *et al*, 1962.

VI.1.2. Le Macrolactin N

Yoo *et al* ont rapporté un nouveau composé, avec un cycle lactone de 24 membres (Figure III.8), appelé Macrolactin N comme inhibiteur puissant de la PDF (Yoo *et al*, 2006), il a été isolé à partir de *B. subtilis*. Cet inhibiteur non peptidique est actif contre la PDF de *S. aureus* avec une concentration inhibitrice 50% (CI50) égale à 7.5 μM et la croissance d'*E. coli* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Yoo *et al*, 2006).

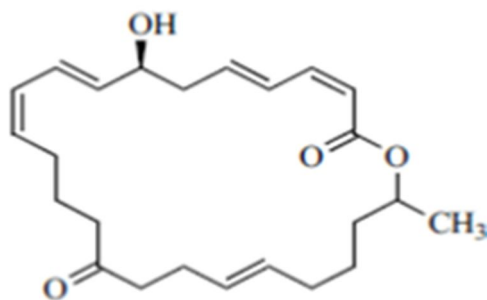


Figure III.8 Structure chimique de macrolactine N, d'après Yoo *et al*, 2006.

VI.1.3. Le fumimycin, le FR198248 et le FR202306

Le fumimycin (Figure III.9) a été isolé par *Kwon et al* en 2007 à partir d'*Aspergillus fumisynnematus*, il a exhibé une activité antibactérienne contre *S. aureus*, *S. aureus* résistant à la méthicilline et *S. aureus* résistant à la quinolone (*Kwon et al*, 2007 ; *Zhi-wang et al*, 2013), ce composé a une activité inhibitrice prometteuse sur la PDF de *S. aureus* avec une CI50 de 4.1 μM .

Le même groupe de chercheurs a isolé les dérivés de 1,3-dihydroisobenzofurane hydroxylé (Figure III.9), le FR198248 et le FR202306, à partir d'*Aspergillus flavipes* (*Know et al*, 2010), ces deux composés ont inhibé la PDF de *S. aureus* avec des valeurs de CI50 de 3,6 et 2,5 μM respectivement.

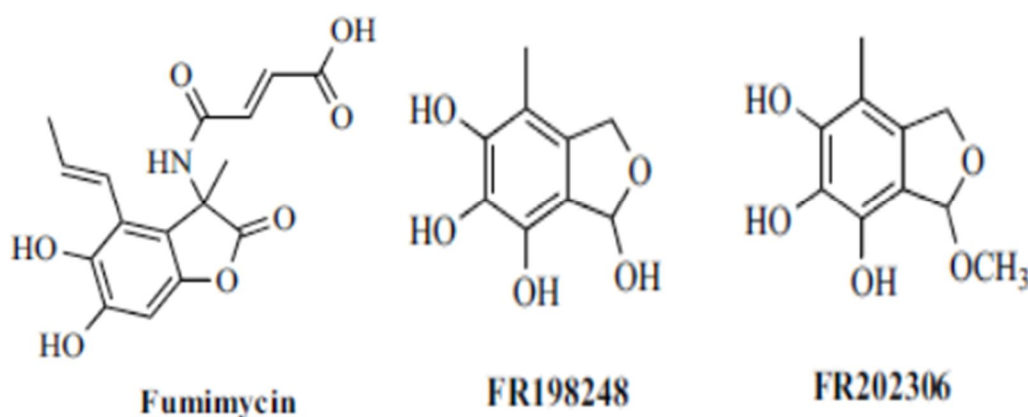


Figure III.9 Structures chimiques de certains inhibiteurs naturels, d'après *Know et al*, 2010.

FR198248 : 1,3-Dihydro-4-méthyl-1,5,6,7-isobenzofurantetraol

FR202306 : 3-méthoxy-7-méthyl-1,3-dihydroisobenzofuran-4,5,6-triol

VI.1.4. Le CAPE

En 2013, *Kunqiang et al* ont identifié le *caffeic acide phenethyl ester* (CAPE) comme un inhibiteur compétitif et spécifique de la PDF d'*H. pylori* (Figure III.10), avec une CI50 de 4.02 μ M (*Kunqiang et al*, 2013), il est capable aussi d'inhiber *in vitro* la croissance d'*H. pylori*.

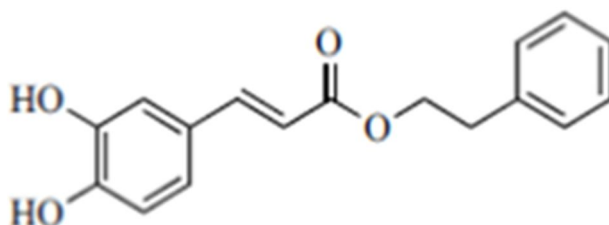


Figure III.10 Structure chimique de CAPE, d'après *Kunqiang et al*, 2013.

VI.2. Les inhibiteurs synthétiques

Se basant sur le mécanisme de la réaction catalysée par la PDF, une structure générale pour les inhibiteurs de la PDF (Figure III.11) a été proposée (*Yuan et al*, 2001).

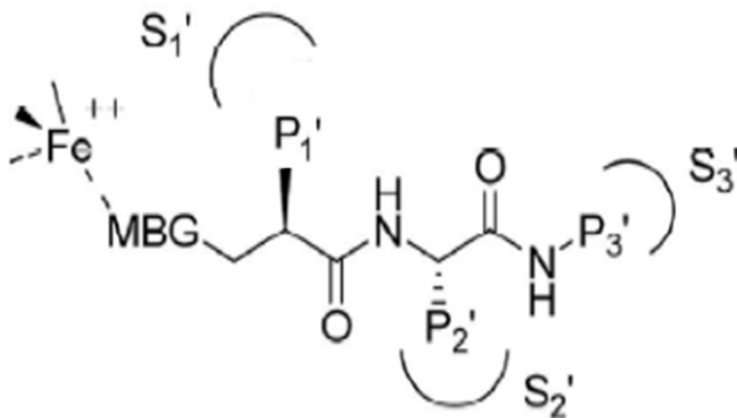


Figure III.11 Structure générale d'un inhibiteur de la PDF, d'après *Yuan et al*, 2001.

MBG (*Metal Binding Group*) : représente le groupement chélateur qui sera le fragment crucial à pourvoir l'énergie d'interaction.

P1' est le substituant de l'inhibiteur, lequel limite la chaîne latérale de la méthionine du substrat d'interagir avec la poche S1'.

P2' et **P3'** sont les groupements de l'inhibiteur qui peuvent fournir une énergie d'interaction supplémentaire, une sélectivité, et des propriétés pharmacocinétiques favorables.

Depuis la production de la PDF de nombreuses espèces bactériennes, les structures de plusieurs types d'inhibiteurs de la PDF ont été rapportées. Ils possèdent tous une fonction à une de leurs extrémités qui peut se lier au métal de site actif pour former un chélate.

Sur la base de leurs structures les inhibiteurs de la PDF peuvent se regrouper en trois classes ; des inhibiteurs peptidiques, des inhibiteurs pseudo-peptidiques et des inhibiteurs non peptidiques.

VI.2.1. Les inhibiteurs peptidiques (Inhibiteurs à base de substrat)

Lorsque la forme native de la Fe^{2+} -PDF d'*E. coli* a été purifiée et caractérisée en 1997 (Rajagopalan *et al*, 1997), aucun inhibiteur de la PDF n'a été identifié. Par conséquent, plusieurs groupes de chercheurs ont commencé la conception des inhibiteurs du PDF comme analogues de substrat (Hu *et al*, 1999 ; Meinnel *et al*, 1999 ; Huntington *et al*, 2000), ils ont essayé de varier les résidus du substrat par d'autres acides aminés alternatifs.

Les inhibiteurs de cette classe possèdent différents groupes chélatant le métal comme les thiols (Yaoming *et al*, 2000), les phosphonates (Hu *et al*, 1998), et les aldéhydes (Daniel *et al*, 1999) (Figure III.12). Généralement ces composés sont dénués d'une activité antibactérienne significative.

Yaoming *et al* et Kristi *et al* ont exploré des dérivés de thiols pour leur capacité d'interagir avec les ions fer et nickel (Kristi *et al*, 2000 ; Yaoming *et al*, 2000), ces composés synthétisés ont présenté une inhibition compétitive contre la PDF d'*E. coli* et de *Bacillus subtilis* (Kristi *et al*, 2000 ; Yaoming *et al*, 2000). De même, Yun-Jin *et al* ont exploré la faisabilité d'utiliser le H-phosphonate comme groupe de liaison de métal pour inhiber l'activité de la PDF (Hu *et al*, 1998). Les composés de cette classe sont dépourvus d'une activité inhibitrice puissante (Hu *et al*, 1998).

Les chercheurs du Merck Research Laboratory (USA) ont étudié des inhibiteurs aldéhydes peptidiques (Daniel *et al*, 1999), en postulant que l'aldéhyde pourrait se lier au centre métallique sous la forme d'un hydrate. L'inhibiteur le plus puissant de cette classe était la calpeptine (Figure III.12), il a montré un effet inhibiteur contre la PDF d'*E. coli* et de *B. subtilis* avec des valeurs de constante d'inhibition de 26 et 55,6 μ M, respectivement.

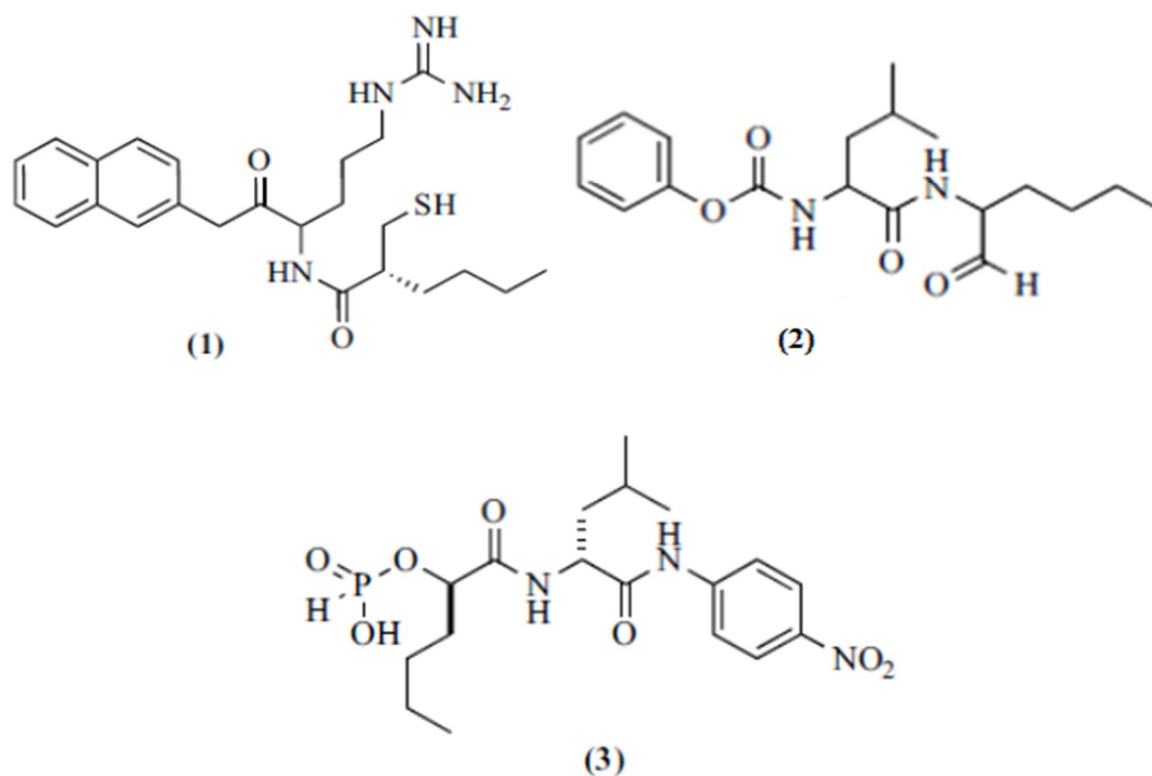


Figure III.12 Structure chimique des inhibiteurs peptidiques, d'après Hu *et al*, 1998 ; Daniel *et al*, 1999 ; Yaoming *et al*, 2000.

(1) (2R)-N-[6-carbamimidamido-1-(naphthalen-2-yl)-2-oxohexane-3-yl]-2-(sulfanylmethyl)hexanamide

(2) Calpeptin

(3) [(1-{(1S)-3-methyl-1-[(4-nitrophenyl)carbamoyl]butyl}carbamoyl)pentyl)oxyl]phosphinic acid

VI.2.2. Les inhibiteurs pseudo-peptidiques (les dérivés d'hydroxamate et de N-formyl-N-hydroxylamine)

Les inhibiteurs les plus puissants de la PDF sont ceux appartenant à la classe des inhibiteurs pseudo-peptidiques. Les caractéristiques structurales communes de ces inhibiteurs sont la nature du groupement chélateur qui a été confinée à l'hydroxamate ou la N-formyle-N-hydroxylamine et la nature du groupement en position P2' qui peut être le tertio-butyle (Clements *et al*, 2001 ; Smith *et al*, 2002 ; Davies *et al*, 2003), le proline (Chen *et al*, 2004), le pyrrolidine (Corinne *et al*, 2002), le dihydropyrrole (Wei *et al*, 2010), le méthylène pyrrolidine (Wei *et al*, 2011), l'oxazolidine (Li *et al*, 2010) ou l'azaaminole (Zega *et al*, 2005), tandis que les substituants aux autres positions sont très divers. Les inhibiteurs les plus connus de cette

classe sont le BB-3497, le VRC3375, le VRC4307, le LBM415, le BB-83698 et le GSK1322322 (Figure III.13).

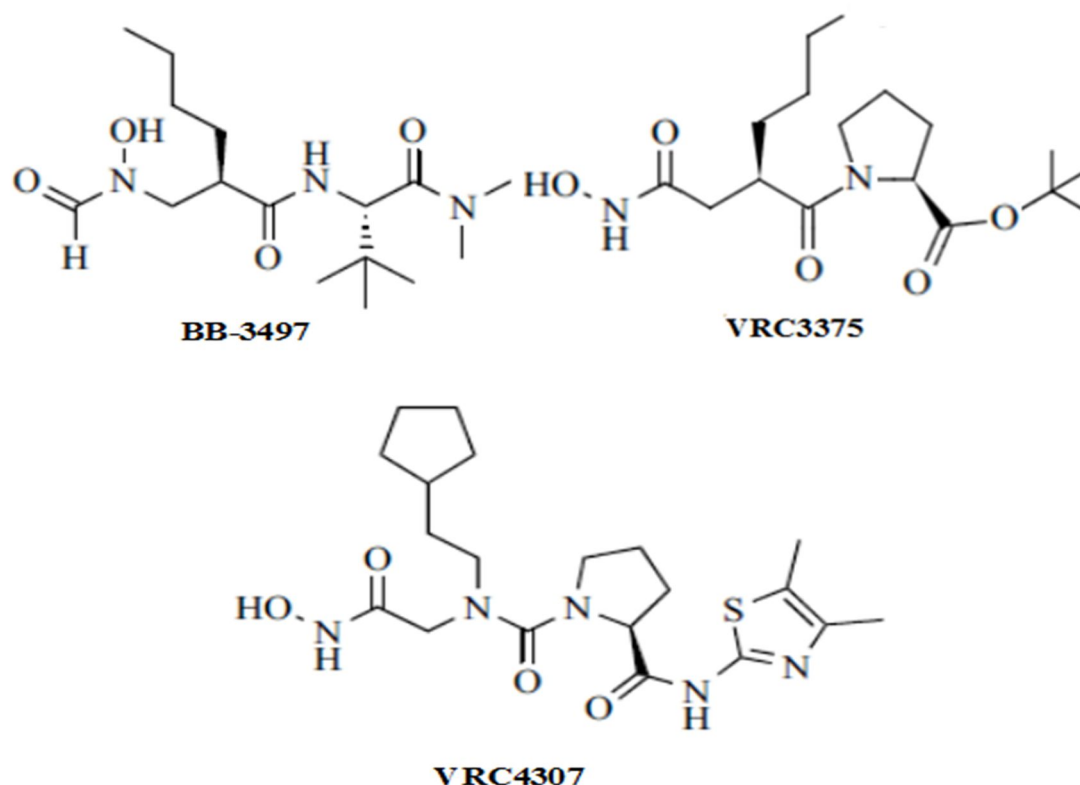


Figure III.13 Structure chimique des trois inhibiteurs pseudo-peptidiques, d'après Clements *et al*, 2001 ; Chen *et al*, 2004)

BB3497: 2-[(formyl-hydroxy-amino)-methyl]- acid hexanoic (1-dimethylcarbamoyl-2,2-dimethyl-propyl)-amide.

VRC3375: tert-butyl(2S)-1-[(2R)-2-[2-(hydroxyamino)-2oxoethyl]hexanoyl]pyrrolidine-2-carboxylate.

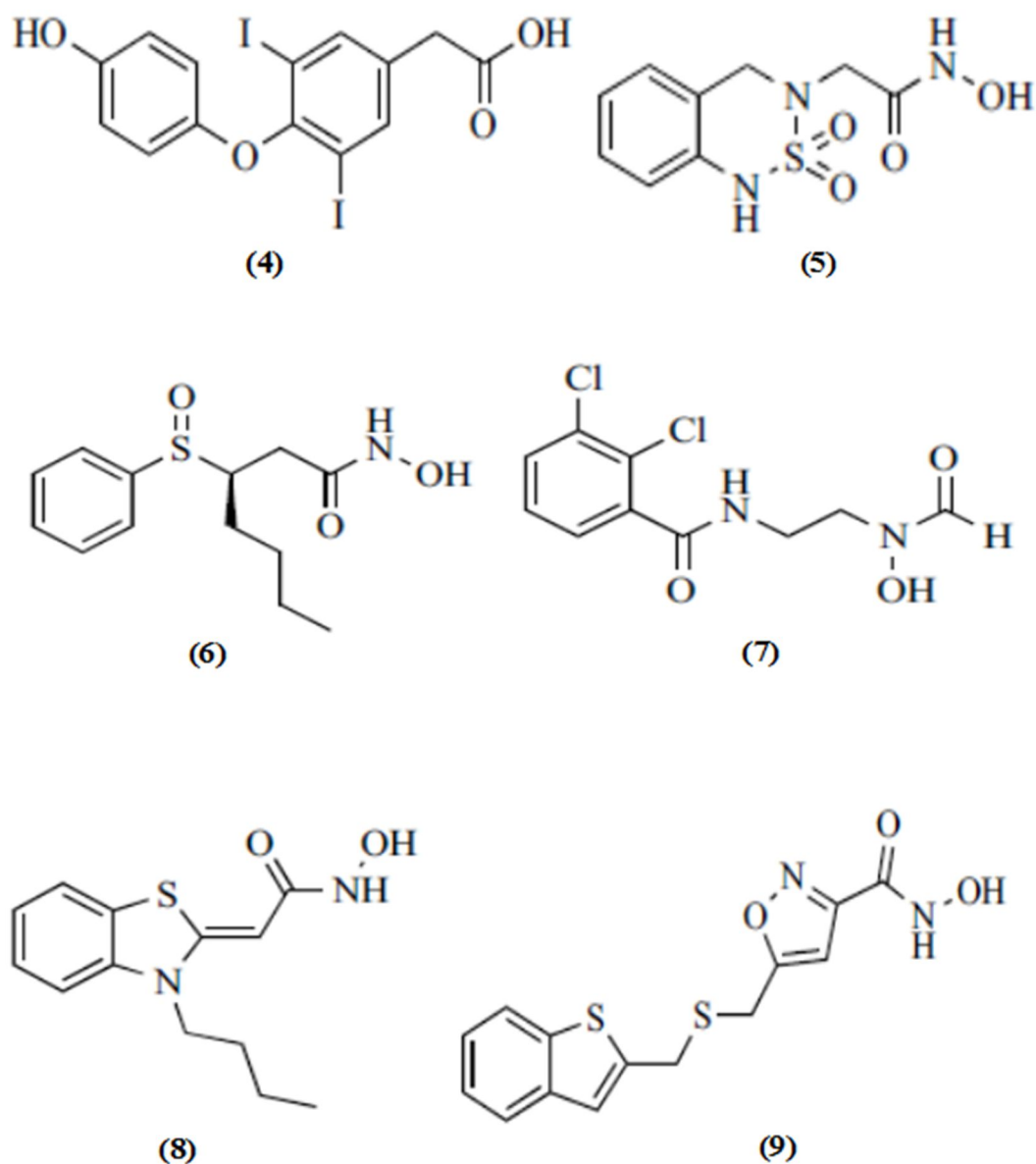
VRC 4307: (2S)-2-N-(4,5-dimethyl-1, 3-thiazol-2-yl)-1-N-[2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl]-1-N-(3-methylbutyl) pyrrolidine-1,2-dicarboxamide.

VI.2.3. Les inhibiteurs non peptidiques

Une étude réalisée par les chercheurs de *Pfizer Global Research* (USA) en 2000 (Apfel *et al*, 2000), a permis d'identifier les premiers inhibiteurs non peptidiques de la PDF, ces composés sont les dérivés d'acide thyropropique. Dans la même année les scientifiques de *Hoffmann-La Roche Ltd* (Canada) ont rapporté les dérivés de β -sulfonyl et β -sulfinyl hydroxamates comme nouvelles classes des inhibiteurs de la PDF (Maithri *et al*, 2000), les composés contenant du sulfonyl ont en général démontré une activité inhibitrice meilleure

que celle des composés sulfinyliques. La même équipe de recherche a développé et synthétisé des dérivés d'acide hydroxamique bicyclique comme des inhibiteurs sélectifs de la PDF d'*E. coli* (Christian *et al*, 2001), le composé le plus puissant de cette série, composé 5 (Figure III.14), a montré une valeur de CI50 de 0,12 μ M.

Plusieurs autres classes d'inhibiteurs non peptidique sont été développés comme les dérivés d'acide biaryl (Barbara *et al*, 2000), de benzamide (Aubart *et al*, 2004), de benzothiazole (Wataru *et al*, 2003), d'isoxazole (Patrizia *et al*, 2004), de benzimidazole (Ling *et al*, 2010), de dithiazole (Alexander *et al*, 2010), de noyau indole (Adrein *et al*, 2007 ; Sylvain *et al*, 2009), et les dérivés macrocycliques (Gang *et al*, 2008) (Figure III.14).



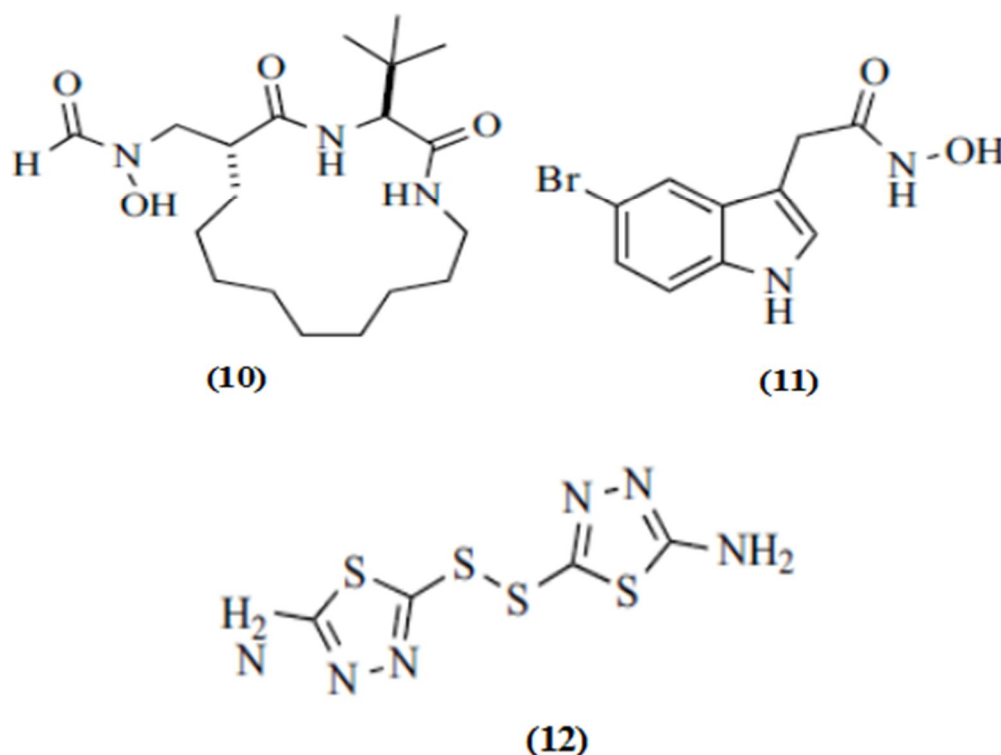


Figure III.14 Structure chimique des inhibiteurs non peptidiques, d'après Apfel *et al*, 2000 ; Christian *et al*, 2001 ; Wataru *et al*, 2003 ; Aubart *et al*, 2004 ; Patrizia *et al*, 2004 ; Ling *et al*, 2010 ; Alexander *et al*, 2010 ; Adrein *et al*, 2007 ; Gang *et al*, 2008.

(4) [4-(4-hydroxyphenoxy)-3,5-diiodophenyl]acetic acid

(5) (3,4-Dihydro-1H-2,1,3-benzothiadiazine-3-acetohydroxamic acid)2,2-dioxide

(6) (3R)-3-(benzenesulfinyl)-N-hydroxyheptanamide

(7) 2,3-dichloro-N-[2-(N-hydroxyformamido)ethyl]benzamide

(8) 2-(3-butyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)-N-hydroxyacetamide

(9) 5-(1-benzothiophen-2-ylmethylsulfanylmethyl)-N-hydroxy-1,2-oxazole-3-carboxamide

(10) N-[(6R)-3-tert-butyl-2,5-dioxo-1,4-diazacyclopentadecan-6-yl]methyl-N-hydroxyformamide

(11) 2-(5-bromo-1H-indol-3-yl)-N-hydroxyacetamide.

(12) 5-[(5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-yl)disulfanyl]-1,3,4-thiadiazol-2-amine

VI.3. Les candidats cliniques

Après la validation initiale de la PDF comme une cible antibactérienne, plusieurs inhibiteurs de la PDF ont été développés. De nombreuses études précliniques ont été réalisées pour ces composés et trois d'entre eux, GSK1322322, BB-83698 et LBM415, sont entrés dans des essais cliniques :

VI.3.1. LBM415

Le LBM415, appelé aussi VIC-104959 ou NVP-PDF-713, a été découvert par *Vicuron Pharmaceuticals* (USA) en collaboration avec *Novartis* (Suisse). Ce composé est entré dans la phase I des essais cliniques en Octobre 2003 pour le traitement par voie orale des maladies infectieuses d'origine bactérienne, c'est un composé de N-formyl-N-hydroxylamine contenant un résidu de proline en P2' (Figure III.15), il a montré une puissante activité contre diverses espèces pathogènes, parmi lesquelles celles impliquées dans les infections des voies respiratoires telles *S. pneumoniae* (CMI₉₀ = 1µg/ml) et *S. aureus* (CMI₉₀ = 2µg/ml), et une activité modérée contre *E. faecalis* (MIC₉₀ = 4 µg/mL) et *H. influenzae* (CMI₉₀ = 8 µg/ml) (Fritsche *et al*, 2005).

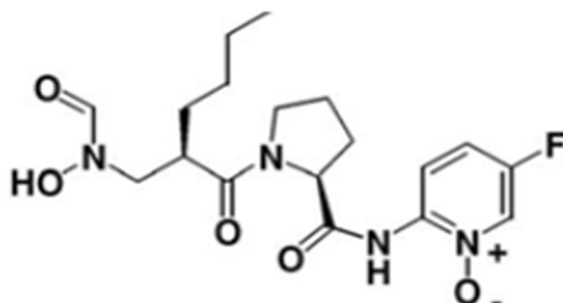


Figure III.15 Structure chimique de LBM415, d'après Fritsche *et al*, 2005 ; N-(5-fluoro-1-oxidopyridin-2-yl)-1-[(2R)-2- {[formyl (hydroxy) amino]methyl}hexanoyl]-L-prolinamide.

VI.3.2. BB-83698

Il a été découvert par *British Biotech* (Grande-Bretagne), en collaboration avec *Genesoft* (USA), il représente le premier inhibiteur de la PDF entré dans les essais cliniques pour le traitement par voie intraveineuse de diverses infections bactériennes (Figure III.16) (Azoulay-Dupuis *et al*, 2004). Cet inhibiteur pseudo-peptidique montre une excellente activité *in vitro* contre *S. pneumoniae*, avec une CMI₉₀ égale à 0,5 ug/ml, modérée contre *S. aureus* et *H. influenzae* avec des CMI₉₀ de 8 µg/ml et 32-64 µg/ml respectivement (Lofland *et al*, 2004).

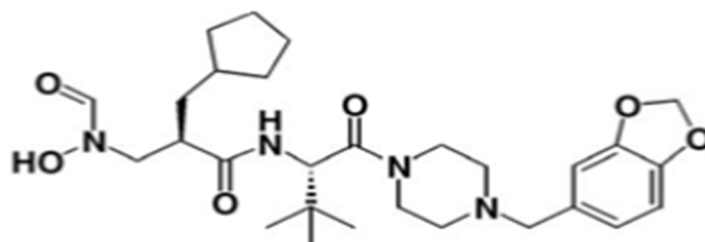


Figure III.16 Structure chimique de BB-83698, d'après Azoulay-Dupuis *et al*, 2004 ;(2R)-N-[(2S)-1-[4-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl) piperazin-1-yl]-3,3-diméthyl-1-oxobutan-2-yl]-2-(cyclopentylmethyl)-3-[formyl (hydroxy) amino] propanamide,

VI.3.3. GSK1322322

C'est un nouvel inhibiteur de la classe pseudo-peptidique (Figure III.17), il a été découvert par *GlaxoSmithKline* (Grande-Bretagne), ce composé a montré des bonnes propriétés pharmacocinétiques dans la phase I des essais cliniques, et des résultats prometteurs dans la phase II (<http://www.clinicaltrials.gov>).

Le GSK1322322 a été développé pour le traitement oral et intraveineux des infections d'origine bactérienne de la peau et des structures cutanées ainsi que des infections communautaires des voies respiratoires (O'Dwyer *et al*, 2013). Il a montré une puissante activité antimicrobienne contre plusieurs espèces bactériennes, parmi lesquels *Moraxella catarrhalis* (CMI₉₀ = 1 µg/ml), *S. pneumoniae* (CMI₉₀ = 2 µg/ml), *H. influenzae* (CMI₉₀ = 4 µg/ml) *S. aureus* (CMI₉₀ = 4 µg/ml) et *S. pyogenes* (CMI₉₀ = 0.5µg/ml) (Lofland *et al*, 2004 ; O'Dwyer *et al*, 2013) et des agents pathogènes résistants aux médicaments (Karen *et al*, 2013).

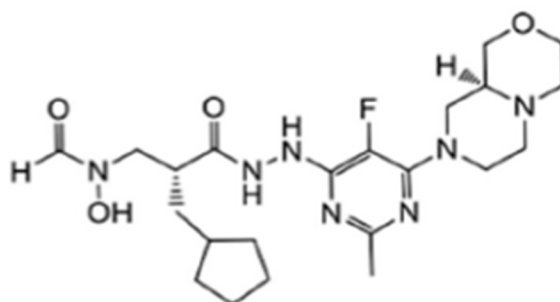


Figure III.17 Structure chimique de GSK1322322, d'après O'Dwyer *et al*, 2013; N-[(2R)-3-[2-[6-[(9aS)-3,4,6,7,9,9a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]oxazin-8-yl]-5-fluoro-2-méthylpyrimidin-4-yl]hydrazinyl](cyclopentylmethyl)-3-oxopropyl]-N-hydroxyformamide.

CHAPITRE IV

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE IV

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans notre travail, nous avons utilisé le programme FlexX dans sa version 2.1.8, 2014, c'était la dernière version disponible au début de notre recherche. Ce programme de docking a été installé dans notre microordinateur TOSHIBA, ayant une mémoire vive de 4GO et un processeur 2,40 GHz Intel Core i3, sous le système d'exploitation Windows 8.

I. Tests de fiabilité de programme FlexX

Avant de commencer le criblage virtuel des composés chimiques à partir de la banque de données ZINC vis-à-vis de la peptide déformylase de certaines espèces bactériennes pathogènes, nous avons essayé de tester la capacité de ce programme à prédire l'emplacement correct d'un ligand au niveau de sa protéine cible. Trois méthodes sont communément utilisées pour tester la fiabilité des différents algorithmes de docking :

- L'écart quadratique moyen ou le RMSD.
- L'analyse visuelle.
- Le coefficient de corrélation.

I.1. Test du RMSD

La fiabilité d'un programme de docking est évaluée en termes de capacité à reproduire des complexes protéine-ligand déterminés expérimentalement. La valeur de déviation quadratique moyenne ou RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre la conformation et l'orientation du ligand déterminée par le programme de docking et sa pose dans le complexe expérimental doit être la plus petite possible. Le ratio admis est une différence maximale de 2 angströms (Vieth *et al*, 1998 ; Grosdidier, 2007 ; Chikhi et Bensegueni, 2008).

Plus la valeur de déviation quadratique moyenne se rapproche de 0, plus la conformation prédite par le logiciel se superpose avec celle de référence. La norme actuelle pour évaluer la performance d'un logiciel de docking est de faire ce test sur environ une centaine de complexes protéine-ligand cristallisés (Kramer *et al*, 1999 ; Kellenberger, 2004). Ce premier test a été réalisé sur 107 complexes tirés de la PDB.

I.2. Analyse visuelle

L'analyse visuelle est une étape complémentaire au test RMSD. Elle permet une meilleure appréciation des résultats obtenus par ce dernier et aide donc à juger de la performance du programme de docking utilisé.

I.3. Coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson permet d'étudier l'intensité et le sens de la corrélation qui existe entre deux variables. La valeur du coefficient de corrélation est située entre -1 et 1 (Fox, 1999). Plus le coefficient de corrélation est proche des valeurs extrêmes -1 et 1 , plus la corrélation linéaire entre les variables est forte.

Afin d'étudier la corrélation entre l'énergie d'interaction estimée par la méthode de docking à l'aide de FlexX et l'activité biologique (CI50) déterminée expérimentalement, nous avons étudié 31 inhibiteurs de la PDF connus à travers la littérature (Meinzel *et al*, 1999 ; Chen *et al*, 2000 ; Jayasekera *et al*, 2000 ; Apfel *et al*, 2001 ; Howard *et al*, 2004 ; Jones *et al*, 2004 ; Chae *et al*, 2005 ; Boularot *et al*, 2005). La disponibilité des valeurs de leur CI50 est le critère de choix de ces inhibiteurs.

II. Criblage virtuel de la banque de données ZINC

La sélection d'une cible pharmacologique d'une part, ainsi que le choix et la préparation d'une base de composés chimiques à cribler d'autre part, représentent la première étape de l'expérience d'identification de composés bioactifs.

Une stratégie basée sur le criblage virtuel d'une base de ligands a été utilisée afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la peptide déformylase bactérienne. Les différentes phases de cette stratégie sont présentées en figure IV.1, partant du choix, de la filtration de la chimiothèque, de la sélection d'une cible protéique et aboutissant à un composé avec une affinité potentielle.

Toute approche de criblage virtuel se décompose en trois étapes d'égale importance (Figure IV.1):

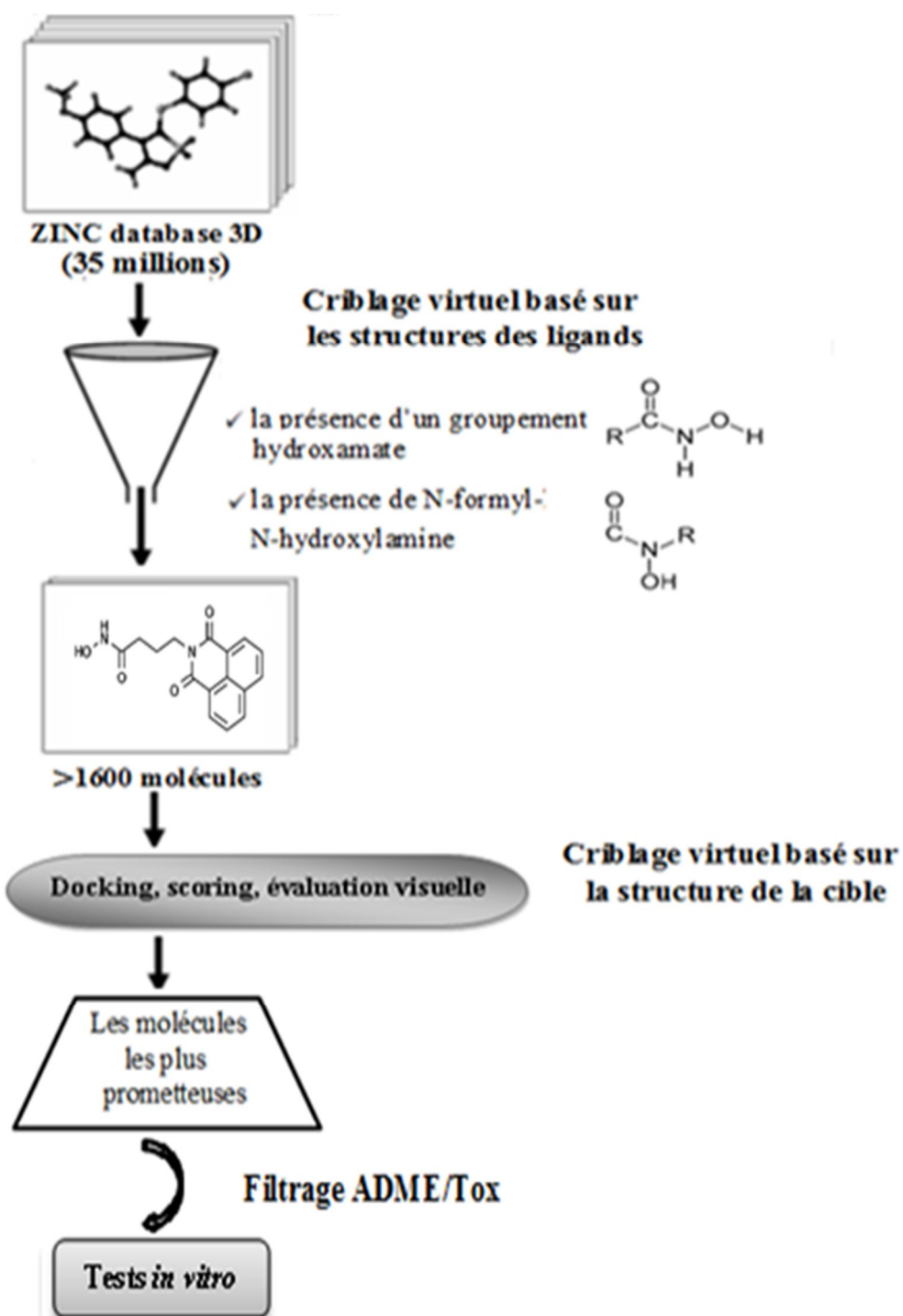


Figure IV.1 Différentes phases de la criblage de la chimiothèque

II.1. Préparation de la chimiothèque à cribler

Tout d'abord, nous avons focalisé notre travail sur la base de ligands à utiliser pour réaliser le criblage virtuel.

II.1.1. Choix de la chimiothèque

Le choix d'une base de composés chimiques constitue une étape essentielle dans la stratégie de recherche de nouvelles molécules candidates médicamenteuses par criblage virtuel. La chimiothèque ZINC est une base de données américaine de molécules chimiques, gérée par *John Irwin* dans le laboratoire *Shoichet* au département de chimie pharmaceutique de l'Université de Californie à San Francisco, USA.

C'est une base prête à l'emploi qui contient plus de 35 millions de composés de divers formats (sdf, mol2 et smile...) destinés au docking moléculaire dont les structures tridimensionnelles sont gratuitement accessibles via son site d'internet (<http://zinc.docking.org>) et les molécules sont disponibles commercialement auprès de divers fournisseurs (Ambinter, eMolecules, Mcule, Molport, ...). Cette base de données permet une recherche par vendeur et les composés sont bien annotés, sous forme de descripteurs chimiques et en termes de propriétés physico-chimiques (<http://zinc.docking.org/>), elle constitue une source majeure de composés bioactifs.

II.1.2. Filtrage et préparation de la chimiothèque

Afin de réduire la taille de la banque de données ZINC et de ne retenir que des composés d'intérêt, des molécules commerciales potentiellement inhibitrices de la PDF bactérienne, il est nécessaire de pré-filtrer la chimiothèque par divers descripteurs pour ne sélectionner que des candidats médicaments potentiels.

Nous allons présenter le protocole utilisé pour sélectionner un ensemble de composés destinés à être testés par docking moléculaire sur la cible peptide déformylase bactérienne. Cette cible biologique est impliquée dans le traitement de plusieurs pathologies humaines, notamment les maladies infectieuses d'origine bactérienne.

La méthode "*ligand-based*" utilise des molécules connues pour être actives sur la cible choisie comme référence pour définir les propriétés physicochimiques et les fragments responsables de leur affinité et les rechercher sur des composés similaires (Todeschini et Consonni, 2000 ; Mason *et al*, 2001 ; Clark et Webster-Clark, 2008 ; Tuccinardi, 2009). Cette approche est rapide et relativement simple à mettre en œuvre.

Il existe actuellement plusieurs molécules connues capables d'inhiber la PDF bactérienne (actinonin, BB-3497, LMB415, GSK1322322...) (Clements *et al*, 2001 ; Chen *et al*, 2004 ; O'Dwyer *et al*, 2013), il est donc possible d'exploiter les informations disponibles sur ces molécules actives afin d'identifier de nouveaux composés susceptibles d'interagir avec cette cible.

L'analyse des inhibiteurs de la PDF montre qu'ils ont en commun un certain nombre de caractéristiques : ils possèdent un groupement chélateur, généralement l'hydroxamate ou le N-formyl-N-hydroxylamine), interagissant avec l'ion métallique présent dans le site actif, ainsi qu'un groupement apolaire qui fait des interactions avec la poche hydrophobe du site actif.

Dans ce contexte, on dispose d'un critère permettant de sélectionner des composés à cribler par docking. Ce critère de sélection est la présence d'un groupement hydroxamate ou N-formyl-N-hydroxylamine comme sous-structure bidimensionnelle (Figure IV.2 et IV.3). Le navigateur *Enhanced Zinc Database* a été utilisé pour rechercher tous les composés contenant un de ces deux fragments.

The screenshot displays the ZINC database search interface in a web browser. The browser's address bar shows the URL `zinc.docking.org/search/structure`. The page header includes the UCSF logo and navigation links for 'About UCSF', 'Search UCSF', and 'UCSF Medical Center'. The ZINC logo is prominently displayed, along with a 'Not Authenticated - sign in' link and a shopping cart icon labeled 'Active cart: Temporary Cart (0 items)'. A navigation menu contains 'About', 'Search', 'Subsets', 'Help', 'Social', and a search bar with a 'Go' button. Below this, there are tabs for 'Text', 'Structure', 'Properties', 'Catalogs', 'ZINC', 'Targets', 'Rings', and 'Combination'. The main search area features a toolbar with various icons and a list of elements (C, N, O, S, P, F, Cl, Br, I, X). A chemical structure of a hydroxamic acid (O=CNO) is shown in the center. To the right, the search input field contains '1. O=CNO' and a 'Substructure' dropdown menu. Below the search area, there are buttons for 'Upload SMILES', 'Choisissez un fichier', 'Aucun fichier choisi', and 'Paste SMILES'. The footer of the page contains links for 'Bioinformatics and Chemical Informatics Research Center (BCIRC)', 'Terms of use', 'Privacy policy', 'Questions, Discussion, Bug reports, Feature requests', 'Thank you NIGMS!', 'GM2x806', and 'Go Secure'. The Windows taskbar at the bottom shows the 'démarrer' button, several open applications, and the system clock at 07:49.

Figure IV.2 Recherche par sous structure dans ZINC database

La base de données commerciale ZINC nous propose 1671 produits convenables pour le criblage virtuel (Figure IV.3). Les structures tridimensionnelles de ces ligands peuvent être téléchargées au format .mol2 ou .sdf à partir du site web de ZINC.

The screenshot displays the ZINC database search results for a query. The page header includes the UCSF logo and navigation links. The main title is 'ZINC 12'. Below the header, there are navigation tabs for 'About', 'Search', 'Subsets', 'Help', and 'Social'. A search bar is visible with the text 'Quick Search Bar...'. The results section shows a grid of 12 chemical structures, each with a unique ID number (e.g., 1. 12, 2. 381, 3. 463, 4. 710, 5. 747, 6. 850, 7. 996, 8. 1008, 9. 2908, 10. 4067, 11. 4223, 12. 4294). The structures are displayed in a grid format, with some showing stereochemistry. The page also includes a 'Back' button, 'Page Size: 50', and 'MOL2' format options. The bottom of the image shows a Windows taskbar with the 'démarrer' button and various application icons.

Figure IV.3 Résultats de la recherche par sous structure

Les ligands sélectionnés à partir de la base de données ZINC ont été utilisés pour effectuer un criblage virtuel basé sur la structure de la protéine cible afin d'étudier leur mode d'interaction avec la PDF de plusieurs bactéries pathogènes.

II.2. préparation de récepteur

La plus grande banque de données de structures tridimensionnelles des macromolécules biologiques, y compris les protéines et les acides nucléiques, est la PDB (<http://www.pdb.org>). Elle a été créée en 1971 au *Brookhaven National Laboratory* (Upton, USA) et contenait à l'origine 7 structures. A ce jour, la PDB réunit plus de 122760 structures protéiques (<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>) issues de classes et d'organismes très divers. Ces structures sont disponibles gratuitement pour les utilisateurs.

Trois techniques expérimentales permettent de déterminer les structures tridimensionnelles des protéines : la cristallographie par rayons X, la résonance magnétique nucléaire et la microscopie électronique. La première méthode est la plus utilisée pour la majorité des structures de PDF disponibles dans la PDB, la moitié de ces structures sont sous forme de complexes avec divers ligands. Ces derniers se différencient entre eux par :

- la source bactérienne de la PDF : *E. coli*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*.... ;
- l'ion métallique présent dans le site actif de l'enzyme: Fer, cobalt, nickel,.... ;
- la nature du ligand intervenant dans le complexe : Substrat, inhibiteur ;
- le degré de résolution du complexe.

Un total de cinq structures cristallographiques ont été extraites de la PDB au format .pdb, les informations concernant ces structures sont présentées dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1. Principales caractéristiques des complexes utilisés

Code	Bactérie	Résolution (Å)	Facteur de résolution	Nombre de chaîne	Nombre des acides aminés par chaîne	Référence
2AI8	<i>Escherichia coli</i>	1.7	0.226	3	168	(Smith <i>et al</i> , 2003)
2AIE	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.7	0.258	1	203	(Smith <i>et al</i> , 2003)
3U7K	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.9	0.266	1	191	(Lee <i>et al</i> , 2012)
1S17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.95	0.233	2	180	(Molteni <i>et al</i> , 2004)
2OS1	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.5	0.198	1	188	(Kim <i>et al</i> , 2008)

Les structures cristallines des PDFs bactériennes choisies possèdent de bonnes résolutions, ce qui reflète leur bonne qualité, car une résolution inférieure à 2Å permet de distinguer tous les atomes y compris les hydrogènes.

Les ligands rencontrés dans les différents complexes 2AI8, 2AIE, 3U7K, 1S17 et 2OS1 sont respectivement : le SB-485343, le SB-505684, le MDB, le GNR et l'actinonin.

II.3. Criblage virtuel par docking moléculaire

Le docking moléculaire à haut débit consiste à simuler et à prédire le mode de fixation et l'affinité de liaison de chacun des composés de la base de données choisie par rapport à la cible pharmacologique d'intérêt et à classer ces molécules par ordre décroissant d'affinité prédite de façon à sélectionner les touches d'intérêt.

Le criblage virtuel de la base de composés chimiques ZINC a été réalisé en utilisant le programme FlexX (2.1.8, 2014), un algorithme de docking rapide capable de docker des molécules de nature organique dans le site actif de la protéine étudiée. Cette approche de criblage virtuel a agi comme un filtre des 1671 composés pour réduire le nombre de composés à étudier *in vitro*, les molécules ayant la meilleure affinité et la meilleure énergie d'interaction avec les résidus du site d'interaction seront retenues pour les tests expérimentaux. Le récepteur a été considéré comme corps rigide pendant l'amarrage alors que les ligands ont été considérés comme flexibles.

II.4. Protocole de docking par FlexX

FlexX est un programme informatique commercialisé. C'est l'un des meilleurs logiciels de docking moléculaire (Chakraborti et Thilagavathi, 2003 ; Kellenberger *et al* 2004 ; Warren *et al*, 2006 ; Chikhi et Bensegueni, 2008), il s'est avéré efficace dans de nombreux processus d'identifications de composés biologiquement actifs (Forino *et al*, 2005 ; Chikhi *et al*, 2006 ; Hamlaoui *et al*, 2011 ; Ganugapati et Swarna, 2014 ; Parmenopoulou *et al*, 2014). Plusieurs agents thérapeutiques ont été découverts avec FlexX et sont sur le marché (Stoermer, 2006).

Nous avons choisi d'utiliser ce programme dans le GUI mode (*Graphical User Interface*) pour cribler virtuellement la banque de données ZINC en raison de sa précision et sa rapidité à traiter les ligands.

FlexX utilise le récepteur sous le format .pdb et les ligands sous le format .mol2 ou le format .sdf. Le complexe PDF-ligand est téléchargé directement à partir de la PDB en introduisant son code, il apparaît sur l'écran et les étapes suivantes de docking sont nécessaires :

a. Préparation de la protéine:

- **Sélectionner la ou les chaînes respectives de récepteur :** après téléchargement du complexe, il faut sélectionner la chaîne qui sera utilisée dans l'amarrage.
- **Sélectionner les cofacteurs ou les coenzymes :** les cofacteurs qui entrent dans la fonction catalytique de l'enzyme sont ensuite déterminés.
- **définir le site catalytique de la PDF :** Une étape essentielle dans la stratégie du criblage virtuel est la détermination des acides aminés intervenant dans le processus de reconnaissance et de fixation du ligand. Un ligand cristallisé avec sa protéine permet de déterminer l'emplacement du site actif.
FlexX utilise tous les atomes de la protéine avec une distance de 6.5 Å des atomes du ligand connu pour définir le site de liaison.
- **Sélectionner les molécules d'eau :** FlexX laisse l'opportunité de simuler l'existence de molécules d'eau dans l'environnement du site actif. La présence d'eau est parfois essentielle dans les interactions entre le récepteur et le ligand, en agissant comme un médiateur de liaison hydrogène entre la protéine et son ligand lorsque certains de leurs groupements, donneur ou accepteur d'hydrogène, sont trop éloignés pour interagir directement.
- **Enregistrer le récepteur préparé.**

b. Arrimage d'un ligand dans le site d'interaction:

Le choix de l'option « docking » dans le logiciel permet de sélectionner le ou les ligands à étudier et lancer l'opération de docking qui se fait par une fragmentation puis reconstruction du ligand, pour prédire la meilleure conformation du ligand dans le site d'interaction de l'enzyme. FlexX score est la fonction mathématique utilisée pour diriger l'assemblage des fragments et la reconstruction du ligand dans le site actif, elle permet de classer les ligands selon leur affinité vis-à-vis du récepteur.

c. Visualisation des résultats

La prédiction du mode de liaison par FlexX est créée sous forme de fichier au format *FlexX Suite Project* (.fxx) contenant un tableau en bas présentant le détail du score, des termes énergétiques, le pourcentage de similarité et le RMSD entre la conformation de ligand prédite par le logiciel et celle déterminée expérimentalement. En haut, présentant en bi et tridimensionnel le mode de liaison de la molécule étudiée avec le site d'interaction de la

protéine cible (Figure IV.4). Une telle interface permet de rendre très accessible l'interprétation des prédictions.

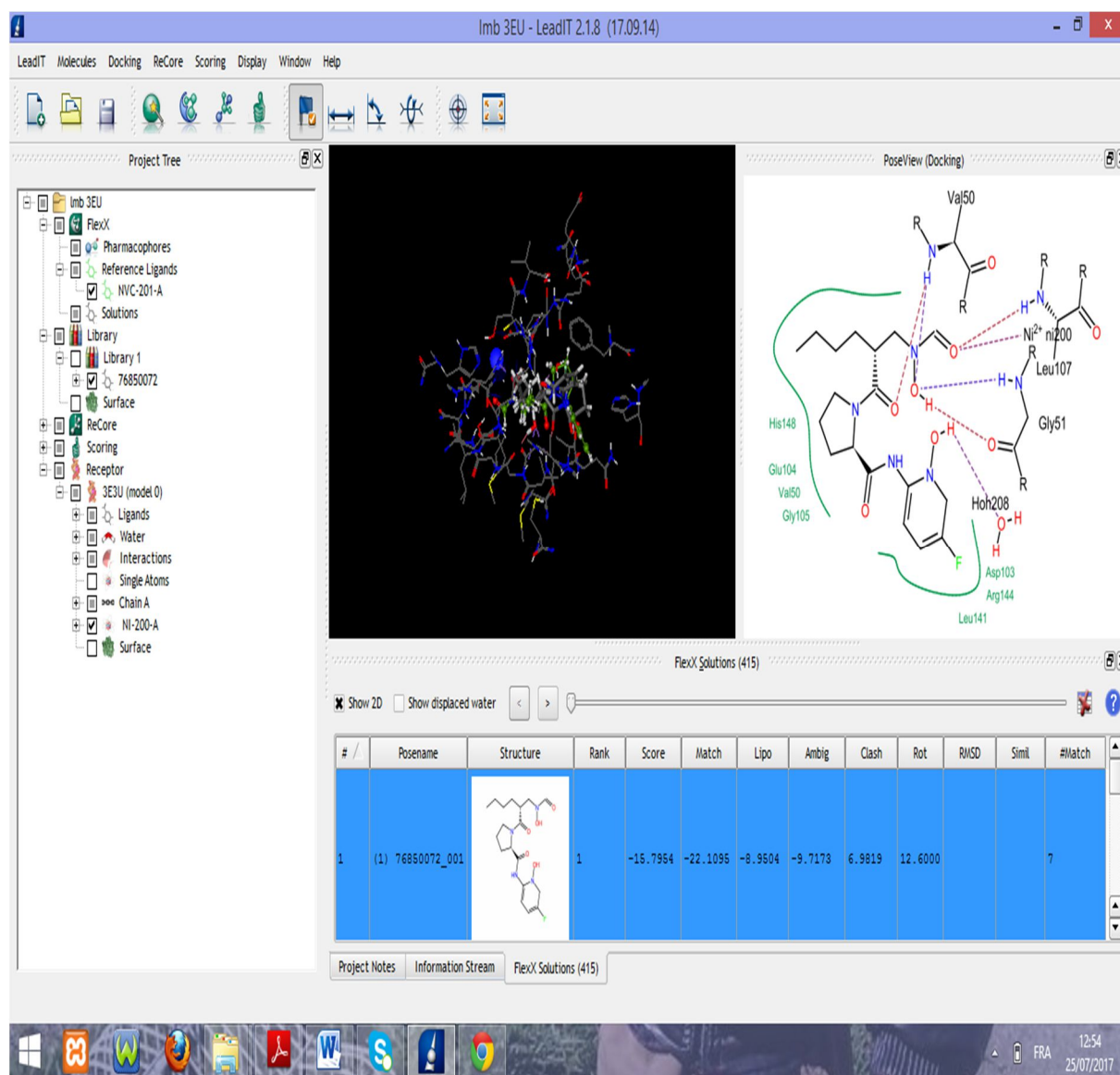


Figure IV.4 Prédiction et visualisation réalisées par FlexX

d. Traitement des résultats de docking :

Après quelques secondes, selon la taille du composé à amarrer, nous pouvons observer sur l'écran la molécule qui vient interagir avec les résidus de site actif de la PDF, ainsi qu'un tableau contenant toutes les solutions obtenues, et deux figures bi et tridimensionnelles représentant les liaisons entre le ligand et le site catalytique pour chacune des solutions trouvées. FlexX donne l'énergie d'interaction en kJ/mol.

Chaque solution possède six scores :

- Total-score = Match-score + Lipo-score + Ambig-score + Clash-score + Rot-Score + ΔG_0 .
- Match-score = représente les énergies des liaisons hydrogène et des ponts salins formés entre le ligand et les résidus du site actif.
- Lipo-score = énergie des interactions hydrophobiques.
- Ambig-score = énergie des contacts lipo-hydrophiliques.
- Clash-score = énergie d'encombrement stérique.
- Rot-score = la perte d'entropie du ligand lors de la complexation au récepteur.
- ΔG_0 = l'entropie conformationnelle du ligand.

Plusieurs orientations du ligand au sein de son récepteur sont générées et classées par ordre décroissant, les résultats obtenus permettent de classer les composés de la base de données selon leur énergie d'interaction avec le site actif de la protéine cible qui est la peptide déformylase de façon à sélectionner les touches d'intérêt.

III. La règle de Lipinski

Les composés les plus prometteurs ont ensuite été filtrés afin d'éliminer les composés qui ne répondaient pas à la règle de cinq proposée par *Christopher Lipinski*. Cette règle permet de déterminer si un composé chimique avec une activité biologique possédant les propriétés admises généralement pour être un médicament susceptible d'être administré par voie orale (Lipinski *et al*, 2001). La règle de Lipinski permet de prédire la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle, elle a été définie à partir de 2245 médicaments commercialisés ou ayant passé avec succès les tests cliniques. En effet, en complément aux critères de cette règle, d'autres sont pris en compte dans la sélection de composés potentiellement candidats (Veber *et al*, 2002).

Les critères utilisés pour la filtration de nos composés sont les suivants :

- Le poids moléculaire ne doit pas être supérieur à 500 daltons ;
- Le coefficient de partition (logP) doit être ≤ 5 ;
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être ≤ 5 ;
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être ≤ 10 ;
- La surface polaire du composé doit être inférieure à 140 \AA^2 ;
- Le nombre de liaisons de rotation doit être inférieur à 15 ;

- Nombre d'halogènes ≤ 7 ;
- Nombre de cycles ≤ 6 ;
- Pas de grands cycles de plus de 7 membres ;
- Au moins un atome d'azote ou d'oxygène dans la molécule.

IV. Commande de meilleures molécules

Dans la base de composés chimiques ZINC, chaque produit est associé aux informations concernant les fournisseurs auprès desquels on peut se le procurer. Cependant, certains produits n'étaient plus disponibles chez le fournisseur et d'autres étaient excessivement onéreux. Les produits ayant les meilleurs scores seront retenus pour les tests *in vitro*.

Notre budget étant limité, nous avons choisi de commander seulement 15 molécules pour les tester expérimentalement. Ces molécules ont été achetées à partir d'*Ambinter c/o Greenpharma* (Orléans, France), 5mg pour chacune. Elles sont livrées sous forme de poudre, donc il faut les solubiliser. D'après le fournisseur le meilleur solvant est le diméthylsulfoxyde (DMSO) qui a la capacité de déstabiliser les membranes biologiques, permettant un accès aux zones profondes des cellules (Novak, 2002). La présence de DMSO étant généralement sans effet nocif sur des lignées cellulaires (Novak, 2002).

V. Test *in vitro*

Le test *in vitro* consiste à mesurer le pouvoir inhibiteur des 15 molécules sur la croissance de diverses espèces bactériennes pathogènes par la méthode d'antibiogramme. Les composés chimiques étudiés sont les suivants : ZINC01187537, ZINC00034434, ZINC00162966, ZINC01430255, ZINC00162979, ZINC00500969, ZINC01428769, ZINC03872971, ZINC00039650, ZINC00126407, ZINC01455744, ZINC01393372, ZINC01455730, ZINC01428755, et ZINC01403330, (ZINC IDs).

V.1. Souches bactériennes

Cinq souches bactériennes (Tableau IV.2) ont été choisies pour leur pathogénicité et leur multi-résistance, elles sont des souches référentielles de l'*American Type Culture Collection* (ATCC), ces bactéries sont activées à 37°C par repiquage sur milieu Muller-Hinton. Ces bactéries sont fournies par le Centre Universitaire de Mila, Algérie.

Tableau IV.2 Liste des souches bactériennes étudiées

Famille	Genre et espèce	Gram
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	Négatif
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC700603)	Négatif
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	Négatif
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	Positif
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC29212)	Positif

V.2. Description des bactéries étudiées

V.2.1. *Escherichia coli*

Les espèces *E. coli* sont des bacilles à Gram négatif (Patrick *et al*, 1988), de forme non sporulée et de type anaérobie facultatif, avec une longueur variant de 2 à 6 µm et une largeur de 1,1 à 1,5 µm (Waszkowycz *et al*, 2001). Ces bactéries sont généralement mobiles grâce aux flagelles.

Elles constituent 80% de la flore normale du tube digestif des êtres humains et animaux. Dans certains cas, elles peuvent provoquer des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites.

V.2.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une cocci à Gram positif (Patrick *et al*, 1988), de forme sphérique, de type asporulé et immobile, son diamètre varie de 0.8 à 1 µm (Steven *et al*, 2004). Les espèces *S. aureus* sont regroupées en diplocoques ou en petits amas. Elles sont responsables d'intoxications alimentaires et d'infections localisées suppurées.

Elles peuvent diffuser dans le sang et atteindre des tissus profonds, provoquant des infections suppuratives beaucoup plus graves, pouvant être létales, comme l'endocardite, la méningite et l'ostéomyélite (Patrick *et al*, 1988).

V.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif, cette bactérie fine est de 1.5 à 3 µm de longueur et de 0.5 à 0.8 µm de largeur. Elle est mobile grâce à un flagelle polaire, dépourvu de spores et de capsule. Cette bactérie est responsable de 10 % de l'ensemble des infections

nosocomiales, occupant le 3^{ème} rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires (Richard et Kiredjian, 1995).

V.2.4. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella est un bacille à Gram négatif, immobile et capsulé. Elle est présente dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des animaux, dont l'homme, en tant que bactérie commensale. Cette bactérie est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales, dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50 %, elle cause aussi des infections urinaires communautaires et nosocomiales (Denis *et al*, 2007).

V.2.5. *Enterococcus faecalis*

E. faecalis sont des bactéries à Gram positif souvent sous forme de coques ovoïdes. Elles sont immobiles et de forme non capsulées. On trouve ce type de bactéries dans la flore microbienne du tractus gastro-intestinal, des voies génitales féminines et, dans une moindre mesure, dans la cavité orale (Ryan et Ray, 2004).

Elles peuvent envahir le courant sanguin et provoquer des infections diverses comme la septicémie, les infections urinaires, la méningite, l'endocardite, la péritonite, et les abcès intra-abdominaux (Ryan et Ray, 2004).

V.3. Molécule de référence : antibiotique

L'antibiotique utilisé est la ciprofloxacine à 5µg (lot 0000281253). Elle appartient à la classe des quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones. La ciprofloxacine a un effet bactéricide, elle inhibe l'ADN gyrase bactérienne, une enzyme de la famille des topoisomérases, nécessaire à la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN bactérien (Drlica et Zhao, 1997 ; Yves *et al*, 2010). C'est un antibiotique à large spectre, il est habituellement efficace sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

V.4. Antibiogramme par la diffusion sur milieu solide

Le pouvoir antibactérien des 15 meilleurs composés de l'étude précédente a été déterminé par la méthode de diffusion sur milieu solide en utilisant la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale comme référence (<http://www.sante.dz/aarn>). Elle

consiste à tester la sensibilité d'une espèce microbienne à une ou plusieurs molécules dans une optique essentiellement thérapeutique.

Des disques de papier Whatman N°3 de diamètre 6 mm, imprégnés des composés à tester de concentration 2.3 mg/ml à 60 mg/ml, sont placés à la surface d'un milieu Muller-Hinton, préalablement ensemencé avec un inoculum pur de la bactérie à étudier, préparé à partir d'une culture de 18 à 24 heures et calibrée par une solution saline stérile pour avoir un inoculum de 10^8 UFC/ml, correspondant à une densité optique de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm, soit une densité égale à 0,5 Mc Farland. Dès l'application des disques, les molécules testées diffusent de manière uniforme.

L'inhibition de la croissance bactérienne a été examinée après une nuit d'incubation à une température de 37°C, si le composé testé est actif contre la souche étudiée, il se forme une zone d'inhibition autour du disque correspondant à une absence de culture, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe. Des disques témoins imprégnés de DMSO, de ciprofloxacine sont inclus dans les essais. L'expérimentation a été réalisée en duplicata.

V.5. Détermination des CMI en milieu liquide

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique vis-à-vis de certaines souches bactériennes est la CMI. C'est la plus faible concentration d'une série de dilutions d'antibiotique de demi en demi inhibant toute croissance bactérienne visible (Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, 2011).

Pour chacune des molécules testées une solution mère de concentration de 2048 µg/ml est préparée. Dans des tubes stériles, le bouillon nutritif est réparti à raison de 0.25 ml par tube, puis à partir de la solution mère, des dilutions de raison 2 sont réalisées afin d'obtenir des concentrations intermédiaires allant de 1024 µg/ml à 4 µg/ml (Tableau IV.3).

Une suspension de la souche à étudier est préparée à partir d'une culture pure de 48 heures dans 5 ml d'eau physiologique stérile, d'une densité équivalente à 0,5 MF (10^8 CFU/ml). Cette suspension est diluée au $1/10^{\text{ème}}$ pour distribuer 50 µl d'un inoculum de 5.10^5 CFU/ml de germes dans chaque tube. Pour chaque série, un témoin sans antibiotique et avec le DMSO est réalisé.

0.70 ml du bouillon nutritif est réparti dans les tubes, la concentration d'antibiotique obtenue va ainsi de 256 µg/ml à 1 µg/ml. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la CMI est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible (Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, 2011). Les analyses ont été effectuées en duplicata et les résultats ont été exprimés en µg/ml.

Tableau IV.3 Schéma du mode opératoire (CMI par technique de dilution en milieu liquide)

N° tube	Volume de la solution d'antibiotique à rajouter	Concentration intermédiaire (µg/ml)	Volume de bouillon nutritif	Inoculum	Concentration finale/tube (vol final: 1 ml/tube)
1	0,25 ml de la solution à 2048 µg/ml	1024	0,70 ml	50 µl/tube	256 µg/ml
2	0,25 ml de la solution à 1024 µg/ml	512	0,70 ml	50 µl/tube	128 µg/ml
3	0,25 ml de la solution à 512 µg/ml	256	0,70 ml	50 µl/tube	64 µg/ml
4	0,25 ml de la solution à 256 µg/ml	128	0,70 ml	50 µl/tube	32 µg/ml
5	0,25ml de la solution à 128µg/ml	64	0,70 ml	50 µl/tube	16 µg/ml
6	0,25 ml de la solution à 64 µg/ml	32	0,70 ml	50 µl/tube	8 µg/ml
7	0,25 ml de la solution à 32 µg/ml	16	0,70 ml	50 µl/tube	4 µg/ml
8	0,25 ml de la solution à 16 µg/ml	8	0,70 ml	50 µl/tube	2 µg/ml
9	0,25 ml de la solution à 8 µg/ml	4	0,70 ml	50 µl/tube	1µg/ml
10	0.25 ml de DMSO	/	0,70 ml	50 µl/tube	/

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Tests de fiabilité

Deux paramètres importants permettent l'évaluation de la qualité d'un programme de docking moléculaire : leur habilité à reproduire des poses déterminées expérimentalement et leur capacité à distinguer les composés actifs dans une chimiothèque, voire de classer les composés en fonction de leur affinité vis-à-vis d'une cible pharmacologique donnée.

I.1. Prédiction d'affinité

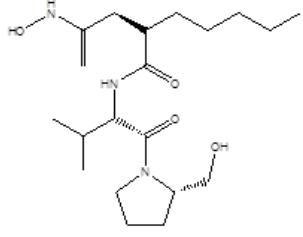
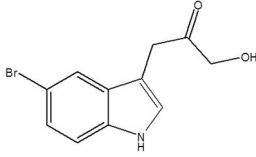
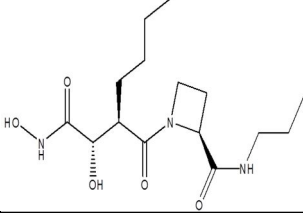
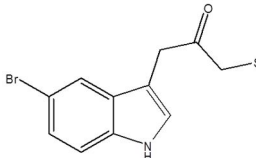
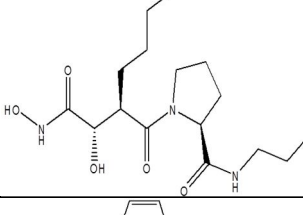
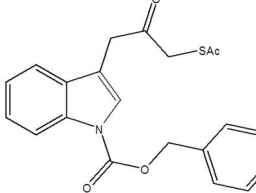
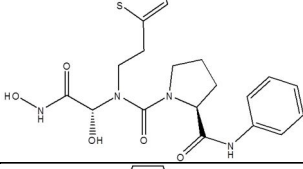
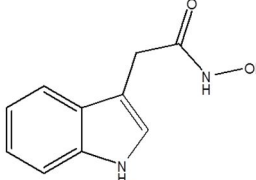
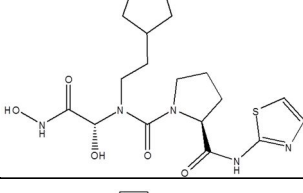
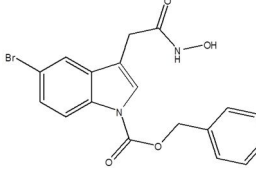
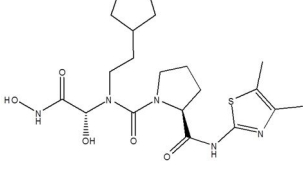
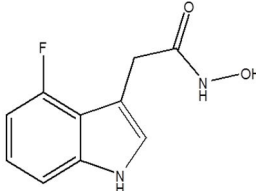
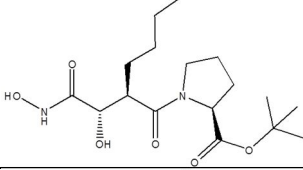
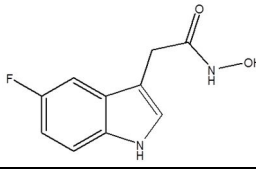
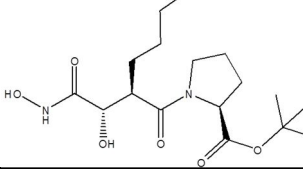
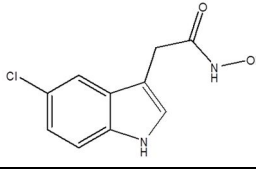
Une fonction de score idéale devrait être capable de classer des molécules chimiques connues en fonction de leur énergies d'interaction et de leur affinités pour la protéine cible (Clark et Webster-Clark, 2008).

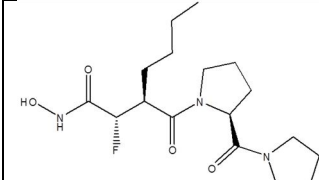
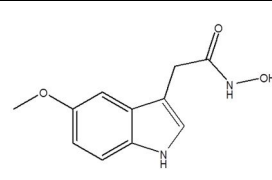
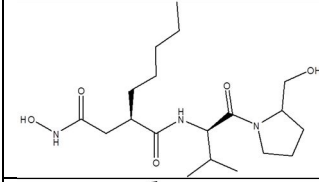
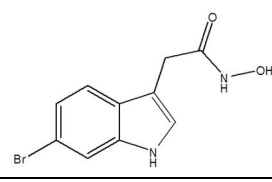
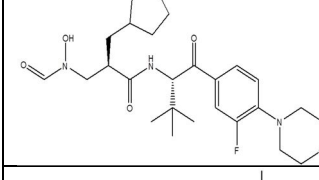
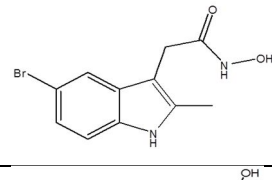
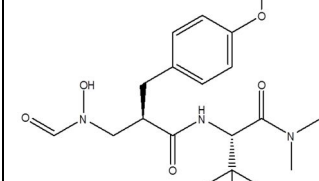
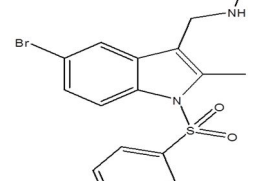
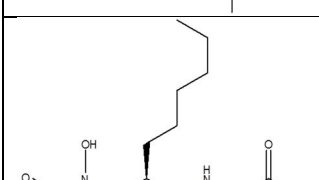
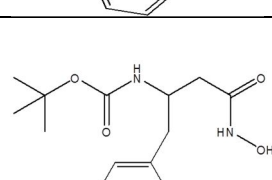
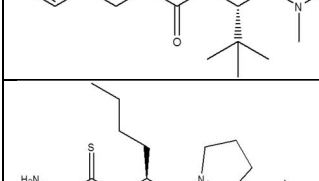
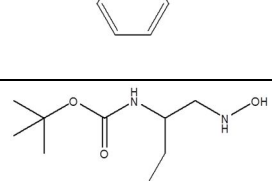
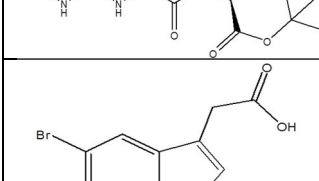
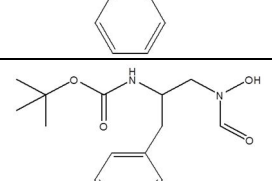
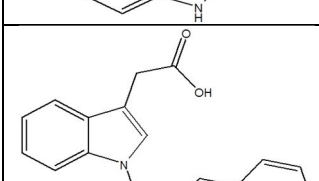
Dans le but d'évaluer la capacité du programme FlexX à reproduire les affinités expérimentales, un indice a été calculé qui est le coefficient de corrélation entre les classements par les affinités prédites et les classements par CI50, Plus le coefficient de corrélation est proche des valeurs extrêmes -1 et 1, plus le programme est efficace.

L'analyse par régression linéaire de la corrélation entre l'affinité obtenue par l'amarrage moléculaire avec FlexX (2.1.8, 2014) et l'activité biologique (CI50) déterminée *in vitro* a été réalisée sur 31 complexes PDF-inhibiteurs dont l'activité biologique a déjà été étudiée (Hu *et al*, 1999 ; Chen *et al*, 2000 ; Jayasekera *et al*, 2000 ; Apfel *et al*, 2001 ; Howard *et al*, 2004 ; Jones *et al*, 2004 ; Chae *et al*, 2005 ; Boularot *et al*, 2005). La disponibilité des valeurs de leur CI50 est le critère de choix de ces inhibiteurs.

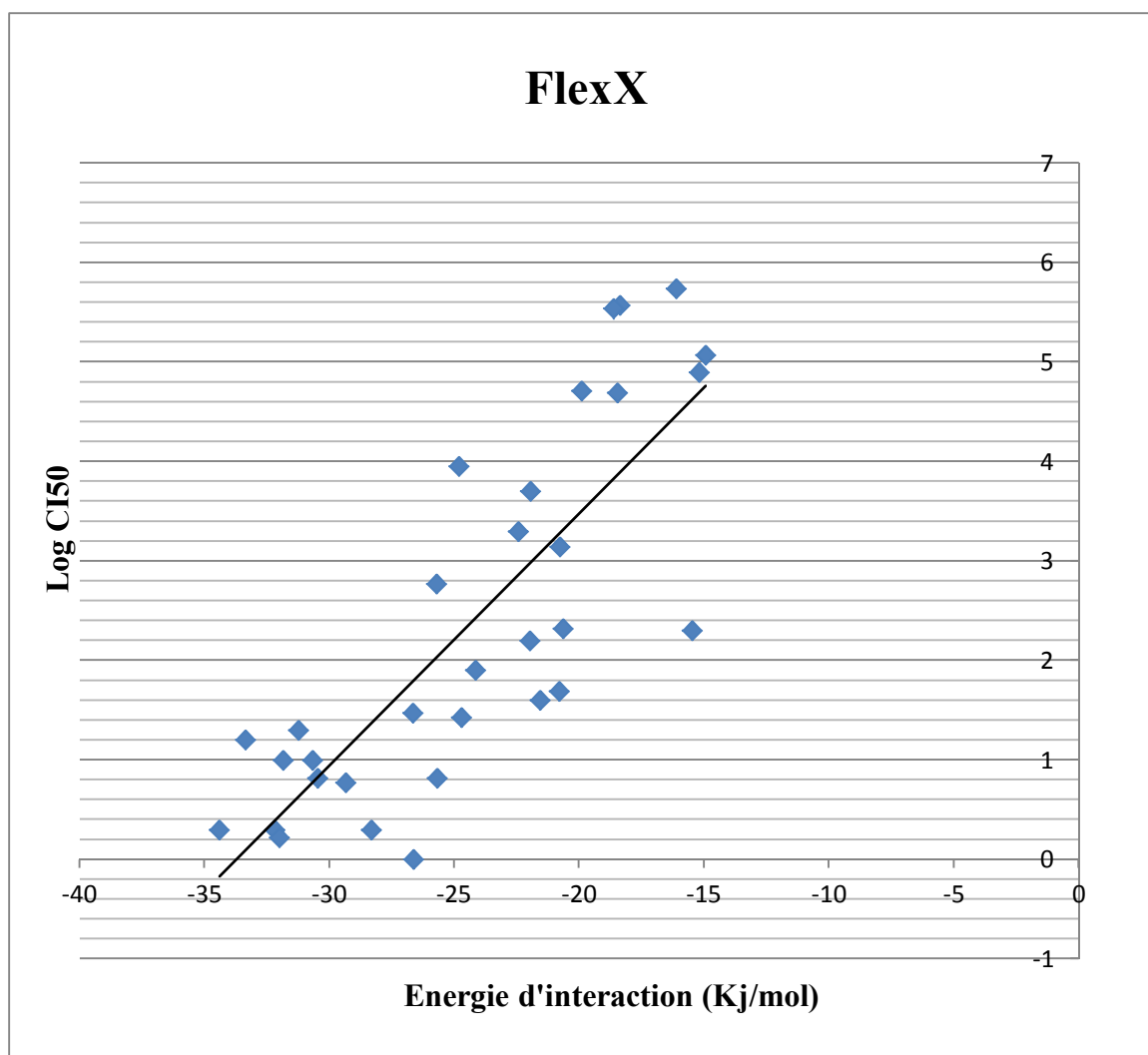
Les résultats des énergies d'interaction des inhibiteurs étudiés avec la PDF bactérienne, leurs structures ainsi que leurs CI50 sont représentés dans le tableau V.1.

Tableau V.1 Les inhibiteurs de la PDF avec leurs activités biologiques reportées et leurs énergies d'interaction

Inhibiteur	CI50 (nM)	ΔG (kJ/mol)	Log CI50	Inhibiteur	CI50 (nM)	ΔG (kJ/mol)	Log CI50
	10	-31.8405	1		560000	-16.1169	5.74
	6.7	-25.6734	0.82		80000	-15.1848	4.90
	6.7	-30.4522	0.82		350000	-18.6125	5.54
	2	-34.4033	0.30		1400	-20.7652	3.14
	16	-33.3437	1.20		27	-24.7075	1.43
	2	-32.1871	0.30		2000	-22.4426	3.30
	1	-26.6332	0		160	-21.9765	2.20
	6	-29.3347	0.77		80	-24.1568	1.90

	20	-31.2429	1.30		9000	-24.8129	3.95
	10	-30.6771	1		210	-20.6331	2.32
	0.6	-32.0021	0.22		50000	-18.4504	4.69
	200	-15.4810	2.30		6000	-21.9471	3.77
	30	-26.6421	1.47		40	-21.5655	1.60
	590	-25.7024	2.77		52000	-19.9069	4.71
	380000	-18.3769	5.57		50	-20.7938	1.69
	300000	-14.9227	5.47				

CI50 : est la concentration d'inhibiteur nécessaire pour atteindre 50% d'inhibition de l'enzyme. Cette grandeur peut également être exprimée en log CI50.



Grphe V.1 Corrélation entre l'activité expérimentale (Log CI50) et les valeurs d'énergies d'interaction de divers inhibiteurs de la PDF

L'analyse par régression linéaire de la corrélation entre l'activité expérimentale représentée ici par Log CI50 et les énergies d'interactions simulées par le programme FlexX nous a permis d'obtenir un nuage de points (Grphe V.1) avec un coefficient de corrélation égale à 0.81 ce qui est proche à 1. Une telle valeur indique que les 2 paramètres analysés sont fortement corrélés et confirme ainsi de la haute performance du programme FlexX dans sa version 2.1.8, 2014 (Chikhi et Bensegueni, 2008 ; Boucherit *et al*, 2014).

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Warren *et al* (2006) qui utilisent FlexX et neuf autres programmes (Glide, Gold, Dock, Flo, Fred, LigFit, DockIt, MOE®, et MVP) pour tester sept cibles protéiques. Dans l'étude de la corrélation entre l'activité biologique déterminée expérimentalement et le score de docking, il a été prouvé que FlexX était le meilleur.

Notre résultat confirme aussi les résultats obtenus par Chakraborti et Thilagavathi (2003) où une bonne corrélation (0.731) entre le score de FlexX et l'activité inhibitrice de COX-2 a été détectée.

I.2. Reproduction de poses expérimentales

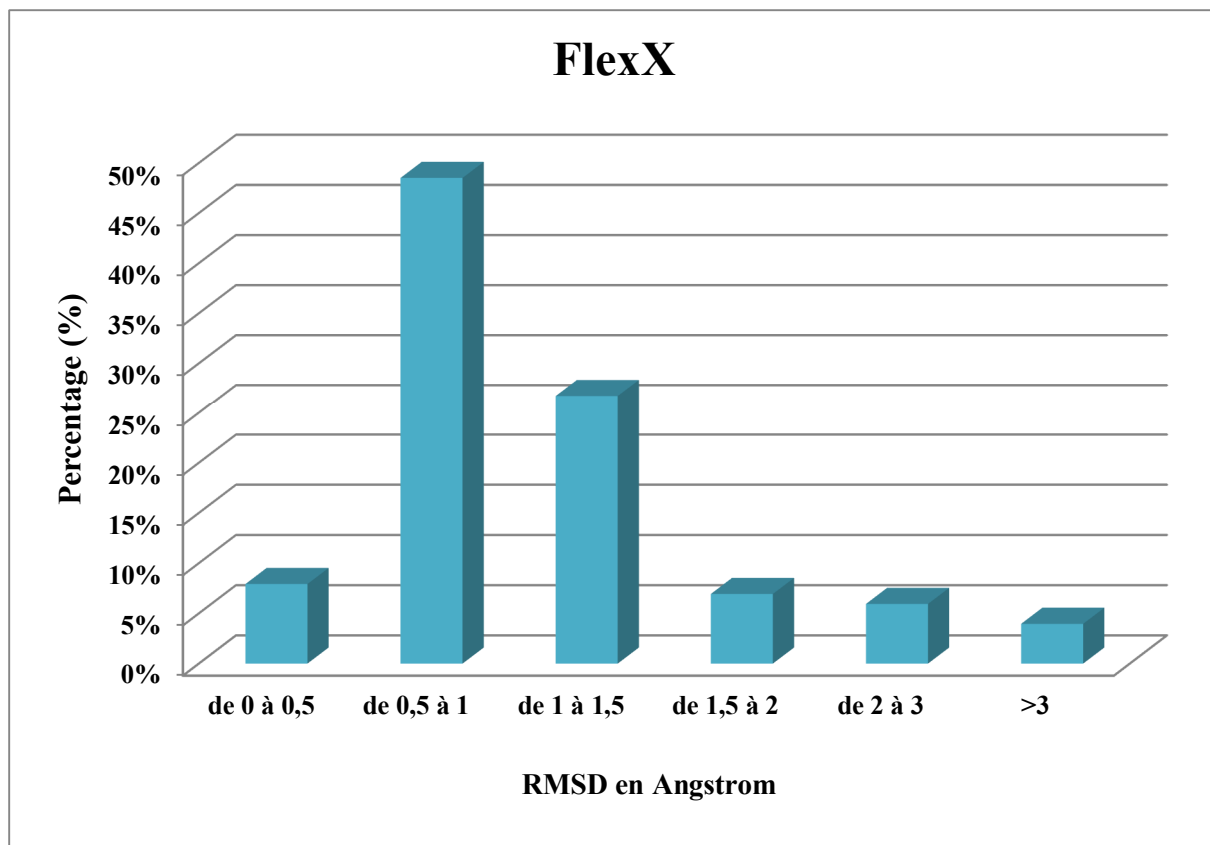
Les écarts quadratiques moyens entre les positions des ligands de 107 complexes protéine-ligand cristallographiques tirés de la PDB et celles des ligands amarrés par le programme FlexX (2.1.8, 2014), ont été calculés et présentés dans le tableau V.2. Une prédiction correcte est définie par un RMSD inférieur à 2Å entre le mode de liaison prédit et la structure cristalline (Vieth *et al*, 1998 ; Grosdidier, 2007).

Tableau V.2 Liste des 107 complexes protéine-ligand utilisés pour tester la fiabilité de programme FlexX par le RMSD

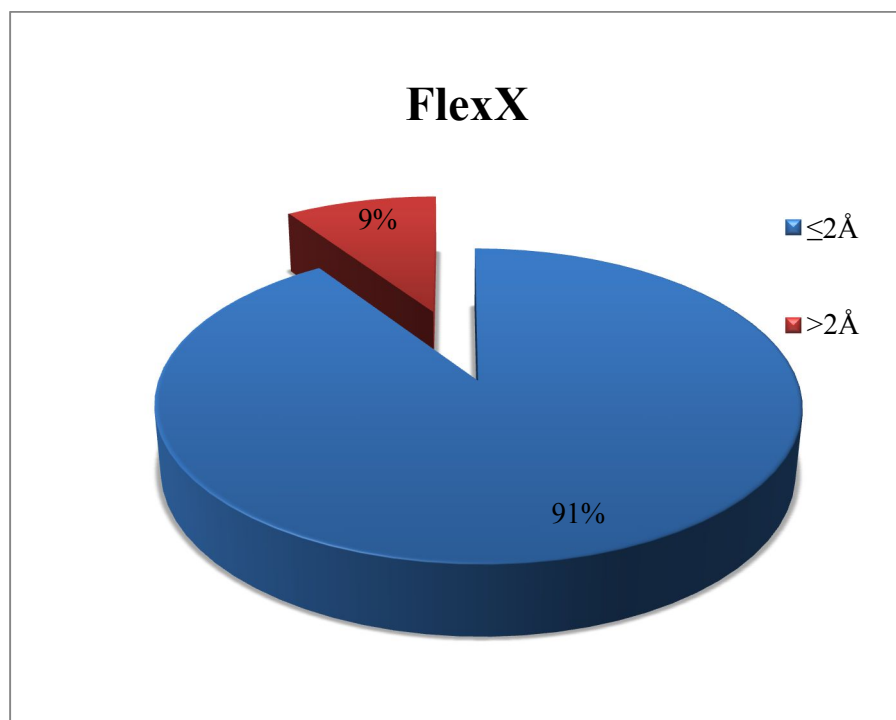
Code de complexe	Ligand	RMSD (Å)	Code de complexe	Ligand	RMSD (Å)	Code de complexe	Ligand	RMSD (Å)
2AIE	SB9	1.9263	1ICJ	2PE	2.4127	2Q96	A18	0.6533
2KMN	BB2	1.7383	3PN3	PN3	3.9090	3D27	W29	1.2102
1RL4	BRR	0.6855	3PN4	BB2	0.6271	3IU8	T03	1.0872
4DR9	BB2	0.7410	1G27	BB1	0.9337	3IU9	T07	1.0698
2EW5	Y12	1.2811	4JE7	BB2	0.5921	5JF1	BB2	1.4983
2EW6	Y13	0.9142	5CVK	56E	0.7845	5F00	5T8	0.6916
3EBH	BES	0.7152	2OS3	BB2	0.9363	1R58	AO5	1.0977
3U7K	MDB	0.4960	1LQY	BB2	0.5552	1R5H	AO2	1.0847
3U7M	FHF	1.4313	1QZY	TDE	0.4595	1YW7	A41	0.8200
3U7N	UHF	1.0310	2EVC	FC3	0.5058	1YW8	A75	0.5625
1WS1	BB2	0.7153	1YVM	TMG	0.7963	1YW9	A84	4.0925
3K6L	2BB	1.0251	2EVO	CT0	1.7119	2EA2	F77	1.0244
1S17	GNR	0.3008	2BB7	QMC	1.0199	2EA4	F79	0.6814
4E9A	EPE	0.9300	2ADU	R20	0.6172	2GA2	A19	1.0372

4E9B	BB2	0.6161	2EVM	FC2	0.4651	3PKA	Y02	2.3922
3U04	BB2	1.1522	2G6P	HM2	0.9795	3PKB	Y16	0.5804
4EOX	0S5	0.6725	2GG0	U11	1.0668	3D27	W29	1.3168
3PKB	Y16	0.5804	3PKC	Y08	1.5255	5EDH	5MF	0.3812
1Q1Y	BB2	0.5552	2GG2	U12	1.2568	3PKD	Y10	1.1170
1LR1	ACT	0.8318	2GG3	U13	2.4857	3PKE	Y10	1.0755
1BSZ	2PE	5.8013	2GG5	U19	1.0359	4FLI	Y16	1.1990
4ZX3	4TK	0.5935	2GG7	U14	1.8121	4FLJ	Y08	1.2095
1IX1	ACT	0.9757	2GG8	U15	1.9496	4FLK	Y10	1.1858
1SZZ	ACT	1.3764	2GG9	U16	1.8996	4FLL	YZ6	2.4069
2AI7	SB7	0.7936	2GGB	U17	0.9866	4IDY	HED	2.7921
2AI8	SB7	0.8673	2GU4	NLP	0.8295	4IKR	PVP	1.1922
2AIA	SB8	3.0637	2GU6	NLP	0.3756	4IF7	HCM	0.7153
3E3U	NVC	0.9454	2NQ6	HM4	0.9095	4IKS	TFD	1.3606
3G5K	BB2	0.5791	2NQ7	HM5	0.5947	4IKT	TFV	0.7080
3UWB	BB2	0.6667	2P98	YE7	0.7237	4IKU	SHX	0.9925
3M6P	BB2	0.7878	2P99	YE6	0.4939	4IU6	FZ1	0.8669
3O3J	BB4	0.6965	2P9A	YE6	1.5769	4U6C	Q06	1.3880
1G2A	BB2	0.6561	2Q92	B21	0.5938	4U1B	Q08	0.6271
3M6R	BB2	0.5892	2Q93	B21	0.6083	4U69	Q07	0.3142
3M6Q	BB2	2.2042	2Q94	A04	0.6503	3HAB	677	0.6651
1LRY	BB2	0.6520	2Q95	A05	0.6442			

Les deux graphes suivants montrent les résultats obtenus lors de l'évaluation de programme FlexX pour sa capacité à reproduire les modes d'interaction expérimentaux des composés vis-à-vis de leurs récepteurs, les résultats sont montrés en pourcent (%), à divers intervalles de RMSD.



GrapheV.2 Résultats en % obtenu par FlexX à divers intervalles de RMSD



Graphe V.3 Résultat global du RMSD en %

Le test de fiabilité par le RMSD nous a permis de remarquer que le logiciel FlexX montre une performance pour reproduire les poses expérimentales, en effet, 90.65% des valeurs de RMSD sont inférieures ou égale à 2Å et que seulement 9.35% des résultats sont supérieurs à 2Å, la majorité des bonnes RMSD se situe dans l'intervalle 0,5 – 1,0 Å.

Notre résultat est corrélé avec les résultats obtenus par Chikhi A., en 2007 où la fiabilité de FlexX et deux autres logiciels (Arguslab et Surfex) a été étudiée, FlexX a reproduit bien les données expérimentales avec 80,6 % des valeurs de RMSD sont inférieures ou égales à 2Å.

Le même programme, utilisé par Hioual *et al* (2014) présente 60.78% des valeurs positives. La différence de résultats réside probablement dans la structure et la nature de la protéine cible ainsi que des ligands étudiés par ces chercheurs et les nôtres. Cela montre que la réponse d'un même programme diffère d'un type de complexe à un autre.

I.3. Analyse visuelle

La visualisation des résultats de docking moléculaire faisant suite au test RMSD est aussi une étape importante pour juger la fiabilité du programme FlexX. Elle permet de visualiser les résultats décrite par les valeurs numériques de RMSD.

La visualisation des résultats de docking par FlexX des deux complexes récepteur-ligand, le 5F00 et le 5EDH (avec un RMSD de 0.6916 Å et 0.3812 Å respectivement), est présentée dans les figures suivantes :

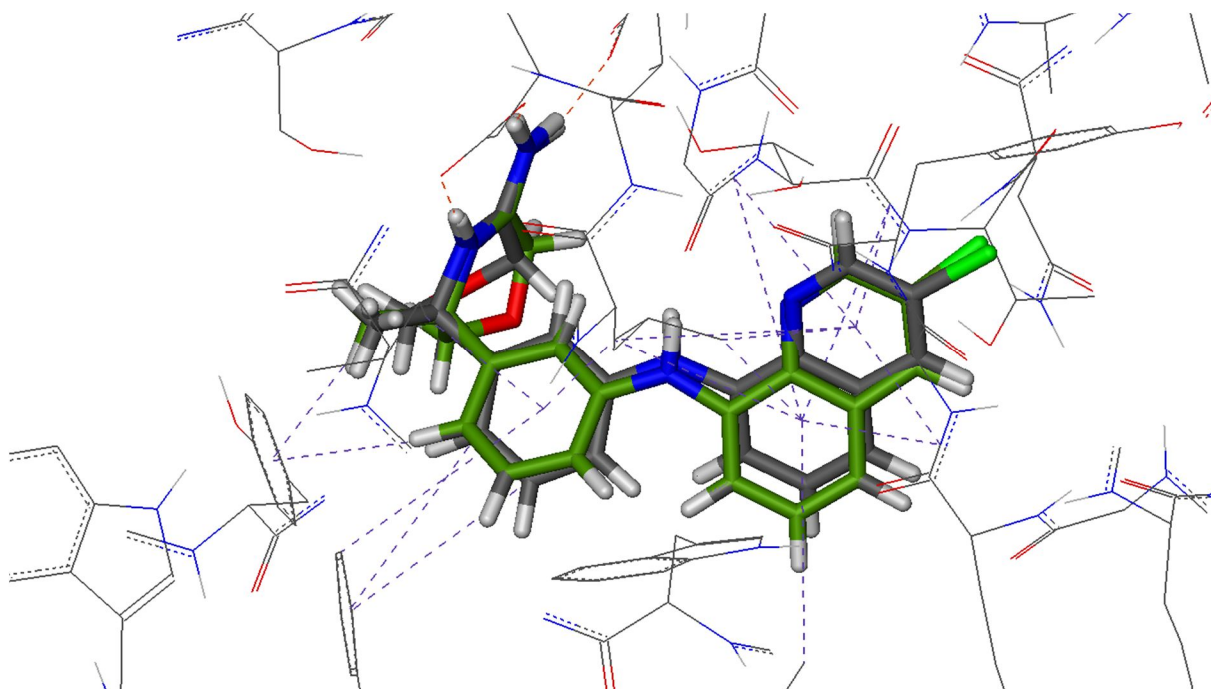


Figure V.1 Comparaison de la conformation expérimentale de l'inhibiteur 5T8 du complexe 5F00 (colorée par type d'atome) et sa conformation prédite par FlexX (colorée en vert)

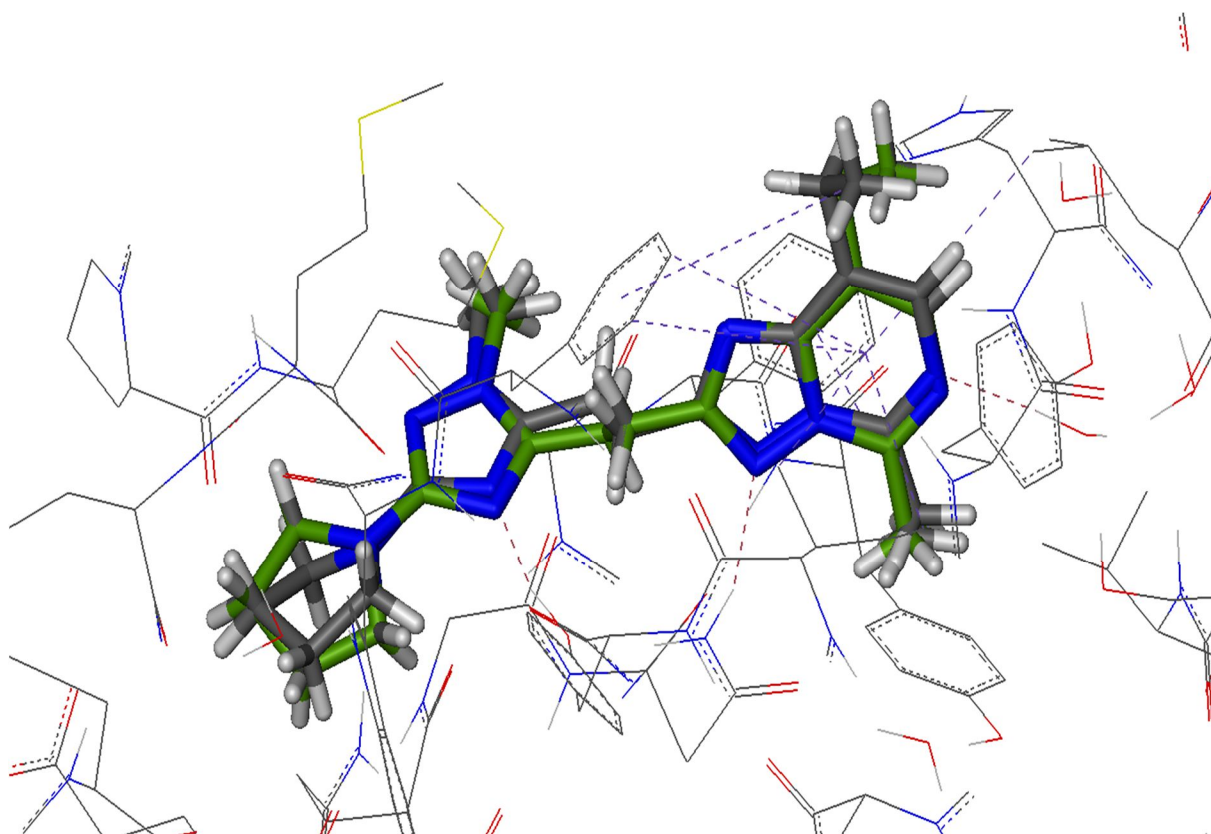


Figure V.2 Superposition du ligand 5MF du complexe 5EDH simulé par FlexX (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré par type d'atome).

L'analyse visuelle montre que les conformations des ligands simulés par FlexX sont correctement orientées dans le site d'interaction de la protéine cible. Il n'y a pas une différence significative entre la pose du ligand générée par le docking et sa conformation déterminée expérimentalement.

Les différents tests utilisés dans cette étude pour évaluer la qualité de programme FlexX (2.1.8, 2014), le test RMSD, l'analyse visuelle et l'étude de la corrélation entre l'activité expérimentale et l'affinité prédite par le docking, nous permet de conclure que FlexX est un programme hautement performant. Il peut donc être utilisé, sans grands risque d'erreurs, pour cribler virtuellement la base de données chimiques ZINC dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs de la peptidase déformylase de certaines espèces bactériennes pathogènes en tant que nouveaux agents thérapeutiques.

II. Résultats de criblage

La maîtrise des maladies infectieuses d'origine bactériennes devient complexe du fait que plusieurs bactéries à Gram positif y compris, *S. aureus*, *E. faecalis* et *M. tuberculosis* ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques, ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (Rice, 2006 ; Jaiprakash *et al*, 2015). Parmi les bactéries pathogènes à Gram négatif les plus résistantes aux médicaments sont *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* (Wenzel et Edmond, 2000 ; D'Agata, 2004 ; Gaynes et Edwards, 2005).

Une des démarches possibles pour pallier le problème de résistance des bactéries aux agents antibactériens est de développer des stratégies basées sur l'inhibition de nouvelles cibles thérapeutiques non encore exploitées en antibiothérapie. Dans ce contexte, la PDF est apparue comme une cible prometteuse pour identifier de nouveaux agents antimicrobiens, car elle assure le clivage de groupement N-formyl de la méthionine N-terminale au cours de la synthèse de protéines chez les bactéries et elle n'est pas requise pour la synthèse protéique cytoplasmique chez les eucaryotes (Serero, 2004) et constitue ainsi une cible privilégiée pour le développement des nouveaux antibiotiques.

Dans le but d'identifier à partir de la banque de composés commerciaux ZINC des candidats médicaments pour la cible pharmacologique PDF, nous avons appliqué une stratégie combinant le criblage virtuel basé sur la structure de la protéine avec des essais microbiologiques.

II.1. Criblage basé sur la structure de ligands connus

Les approches de criblage virtuel sont devenues des étapes cruciales dans le processus de découverte de médicaments originaux. La chimiothèque ZINC est une base de données de plus de 35 millions de produits chimiques destinés aux criblages basés sur les ligands connus et aux méthodes basées sur la structure de la protéine (<http://zinc.docking.org/>).

Cette approche est une étape essentielle qui évite d'analyser inutilement des composés, plusieurs filtres peuvent être utilisés pour ne choisir que des molécules commerciales convenables à notre projet de recherche, de nouveaux inhibiteurs potentiels de la PDF bactérienne.

La stratégie de criblage "ligand-based" est basée sur les connaissances accumulées à propos de la structure et les propriétés de molécules connues pour être actives sur la protéine ciblée (Muegge et Oloff, 2006).

Depuis la production de diverses PDFs bactériennes, plusieurs classes d'inhibiteurs de la PDF ont été identifiées, les plus puissants sont ceux appartenant aux classes pseudo et non peptidiques, comme le BB-3497, le VRC3375, le VRC4307, le LBM415, le BB-83698 et le GSK1322322 (Clements *et al*, 2001 ; Hackbarth *et al*, 2002 ; Wise *et al*, 2002 ; Chen *et al*, 2004 ; Lofland *et al*, 2004). Les caractéristiques structurales communes de ces inhibiteurs sont la nature du groupement chélateur qui a été confinée à l'hydroxamate ou la N-formyle-N-hydroxylamine, ce groupement est le fragment crucial à pourvoir l'énergie de d'interaction avec le site actif de l'enzyme, ainsi la nature hydrophobique de groupement en position P1' lequel empêche la chaîne latérale de la méthionine N-terminal de toutes les nouvelles chaînes polypeptidiques d'interagir avec les résidus de la poche S1' de la PDF

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au criblage virtuel basé sur la structure de la cible pour ses applications dans le cadre de la découverte de nouveaux médicaments et notamment de la recherche de hits.

A ce titre, on dispose de la présence d'un groupement hydroxamate ou N-formyl-N-hydroxylamine comme critère de choix des molécules destinées à être analysées virtuellement par docking moléculaire sur la cible peptide déformylase bactérienne.

La chimiothèque commerciale Zinc nous propose, parmi les millions de composés disponibles, une collection de plus de 1600 structures chimiques possédant un des deux fragments pharmacophores sélectionnés comme sous structure (Figure V.3).

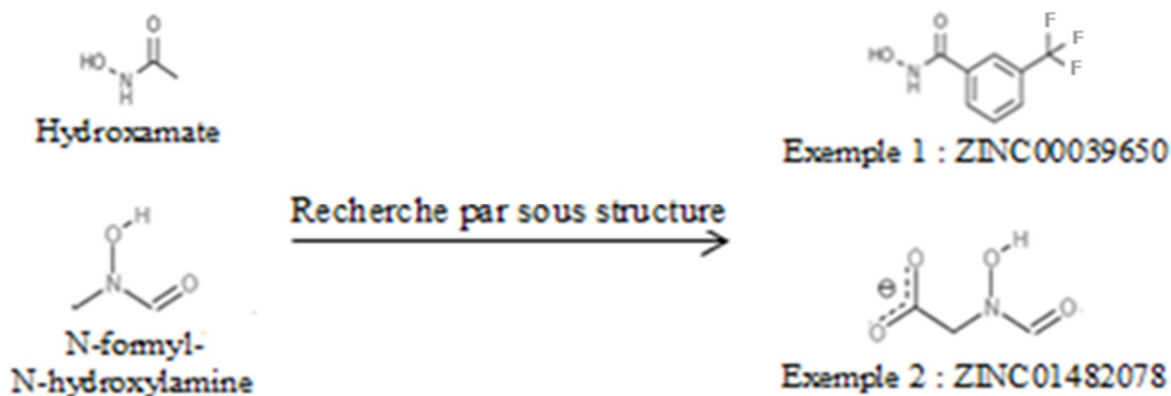


Figure V.3 Exemples de résultats obtenus par recherche par sous structure

II.2. Criblage virtuel basé sur la structure de la cible protéique

La méthode de criblage virtuel basé sur la structure 3D de la protéine consiste à amarrer et à prédire l'affinité et le mode d'interaction des ligands d'une chimiothèque ou des candidats médicaments pour le site actif ciblé, elle joue un rôle important dans la conception rationnelle des médicaments. Une évaluation de l'énergie de liaison peut indiquer la qualité de l'interaction récepteur-ligand et fournir des idées pour la découverte de nouveaux agents thérapeutiques. Les composés les plus prometteurs sont sélectionnés, achetés ou synthétisés puis testés expérimentalement.

Dans le but d'étudier les interactions entre les 1671 molécules sélectionnées par la méthode de criblage virtuel basée sur les ligands connus et les résidus de site actifs de cinq PDFs bactériennes choisis comme cibles médicamenteuses et de comparer leurs scores (énergies d'interaction) avec le ligand choisi comme référence qui est le GSK1322322, c'est le seul inhibiteur de la PDF qui montre des bonnes propriétés pharmacocinétiques dans la phase I des essais cliniques, et des résultats prometteurs dans la phase II (<http://www.clinicaltrials.gov>), une étude de docking moléculaire en utilisant FlexX dans sa version 2,1,8, 2014 a été effectuée. Cette analyse consiste rechercher parmi les composés sélectionnés, ceux qui seraient potentiellement complémentaires du site catalytique de l'enzyme en question.

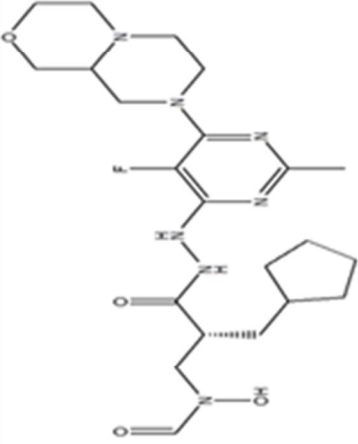
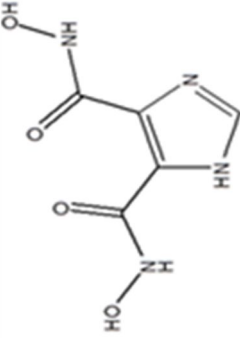
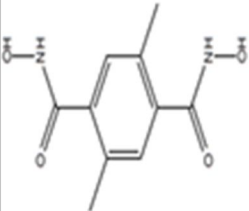
Sur les 1671 composés criblés, 394 ont une énergie d'interaction inférieure à celle de l'inhibiteur de référence (Annexe), GSK1322322, ce qui représente 23.57 % des composés étudiés. Les résultats de docking montrent que les composés sélectionnés par la méthode de criblage virtuel à base de ligand ont des orientations différentes dans les poches de liaison des PDFs bactériennes en raison de leur diversité sur leur composition atomique et leurs propriétés physico-chimiques.

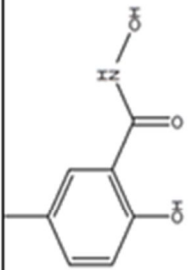
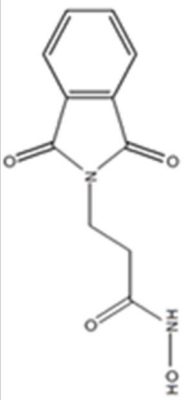
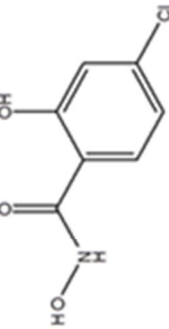
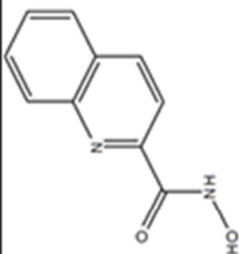
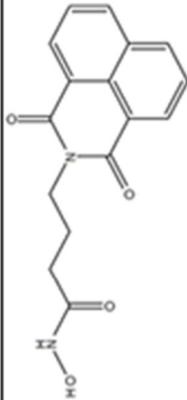
L'analyse des résultats a montré que les composés étudiés pénètrent dans les poches de liaison de l'enzyme par la formation de plusieurs liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes, et la plupart des liaisons hydrogène étaient formées par le groupement chélateur qui est l'hydroxamate ou le N-formyl hydroxylamine, ce qui est très similaire à l'inhibiteur GSK1322322.

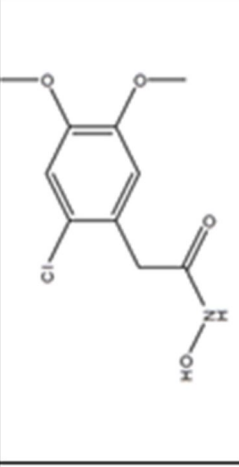
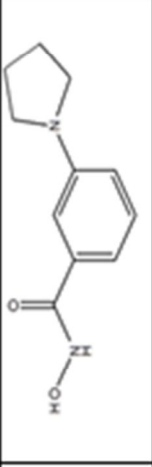
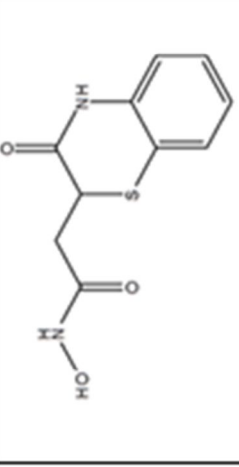
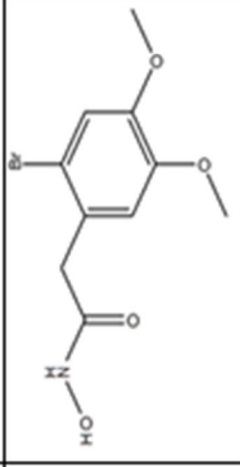
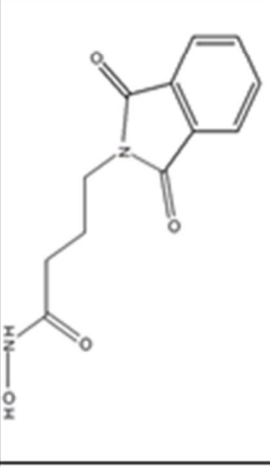
La sélection finale des composés à commander pour l'évaluation *in vitro* par des tests microbiologiques est passée par une analyse individuelle des interactions 3D de chaque touche virtuelle avec les PDFs étudiées ainsi qu'une étude de disponibilité des composés chez leurs fournisseurs respectifs.

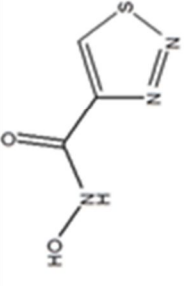
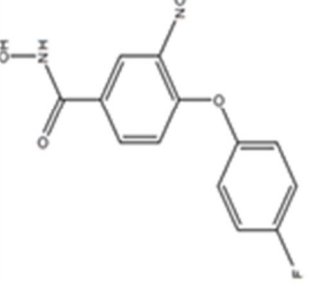
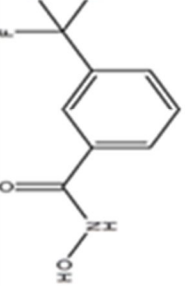
Les énergies de liaison et les structures moléculaires de quinze des meilleurs composés et de la molécule de référence, GSK1322322, avec les PDFs à étudiés, sont présentées dans le tableau V.3.

Tableau V.3 Structures moléculaires, nomenclatures, énergies prédites (Kj/mol) des 15 meilleurs composés avec différentes PDF bactériennes

Composé	Structure Chimique	Nomenclature	2AI8 <i>E. coli</i>	2AIE <i>S. pneumoniae</i>	1S17 <i>P. aeruginosa</i>	3UTK <i>S. aureus</i>	2OS1 <i>E. faecalis</i>
GSK 1322322		N-[(2R)-3-[2-[6-[9aS)-3,4,6,7,9,9a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]oxazin-8-yl]-5-fluoro-2-methylpyrimidin-4-yl]hydrazinyl]-2-(cyclopentylmethyl)-3-oxopropyl]-N-hydroxyformamide	-26.6049	-23.2952	-21.7993	-31.8904	-23.2981
ZINC 01187537		1H-imidazole-4,5-dicarboxylic acid	-30.9474	-31.1087	-28.7659	-32.4642	-30.2911
ZINC 00344344		2,5-dimethylbenzene-1,4-dicarboxylic acid	-30.8880	-32.0422	-27.4118	-29.7140	-29.9685

ZINC 00162966		N,2-dihydroxy-5-methylbenzamide	-27.8499	-27.3023	-24.3264	-30.0906	-30.4427
ZINC 01430255		3-phthalimidopropanehydroxamic acid	-24.1982	-24.3674	-28.4578	-30.2230	-27.2496
ZINC 00162979		4-Chloro-N,2-dihydroxybenzamide	-27.4461	-26.7422	-27.9988	-31.1300	-27.8743
ZINC 00500969		N-Hydroxy-2-quinolinecarboxamide	-30.8043	-29.3124	-26.8256	-28.3234	-28.9398
ZINC 03872971		4-(1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)-N-hydroxybutanamide	-27.5140	-26.5748	-36.8396	-28.1095	-29.4593

ZINC 01455730		2-(2-chloro-4,5-dimethoxy-phenyl) ethanohydroxamic-acid	-24.8680	-26.8608	-26.9301	-26.8608	-28.1441
ZINC 01428769		3-pyrrolidinobenzene carboxylic-acid	-31.6889	-30.3892	-30.1684	-29.0384	-29.7004
ZINC 00126407		N-hydroxy-2-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-2-yl)acetamide	-28.6786	-26.6770	-32.9272	-31.2996	-30.6362
ZINC 01455744		2-(2-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)ethanohydroxamic-acid	-26.9704	-23.9066	-26.5919	-26.0579	-30.9264
ZINC 01428755		4-phthalimido butanohydroxamic-acid	-23.5473	-25.6418	-28.1613	-24.4482	-28.7596

<p>ZINC 01403330</p>		<p>N-hydroxy-1,2,3-thiadiazole-4-carboxamide</p>	<p>-29.1806</p>	<p>-28.8472</p>	<p>-29.2132</p>	<p>-30.1374</p>	<p>-32.5696</p>
<p>ZINC 01393372</p>		<p>4-(4-fluorophenoxy)-N-hydroxy-3-nitrobenzencarboxamide</p>	<p>-31.5692</p>	<p>-30.2228</p>	<p>-29.5150</p>	<p>-32.8282</p>	<p>-30.5342</p>
<p>ZINC 00039650</p>		<p>N-hydroxy-3-(trifluoromethyl)benzamide</p>	<p>-26.4851</p>	<p>-27.5980</p>	<p>-28.6427</p>	<p>-26.7776</p>	<p>-31.0492</p>

Parmi les inhibiteurs étudiés les quinze composés présentés dans le tableau ci-dessus présentent les meilleures énergies d'interaction avec les PDFs bactériennes, ils présentent donc les meilleurs effets inhibiteurs; c'est pour cela que nous les avons choisis comme modèles afin d'interpréter leurs différentes interactions établies avec l'enzyme.

Ces résultats préliminaires ne sont qu'une étape dans le processus d'identification des nouveaux d'inhibiteurs de la PDF.

III. Prédiction du mode d'interaction des meilleurs composés

La porte de l'identification de principe actif *in silico* s'ouvre avec la possibilité de prédire le mode d'interaction d'un petit composé avec une cible d'intérêt thérapeutique.

Nous avons réalisé le docking moléculaire d'une collection de 1671 composés chimiques provenant de la chimiothèque ZINC, afin de mettre en évidence des inhibiteurs potentiels plus affins de PDF. Après le docking de cette collection avec les PDFs bactériennes par FlexX nous avons obtenus 394 molécules présentant une augmentation de l'affinité par rapport au GSK1322322. Les résultats sont présentés dans l'annexe.

Des interactions intéressantes ont été détectées entre les cinq PDFs bactériennes et les quinze meilleurs composés avec un grand nombre de liaisons et des valeurs des énergies d'interaction faibles.

III.1. Complexe *P. aeruginosa* PDF- composé ZINC03872971

Comme le montre le tableau V.3, le composé ZINC03872971 dont le nom chimique 4-(1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)-N-hydroxybutanamide se présente comme le meilleur inhibiteur de la PDF de *P. aeruginosa*, suivi par les composés ZINC00126407 et ZINC01428769 avec des énergies d'interaction de -36.8396kJ/mol, -32.9272 kJ/mol et -30.1684 kJ/mol respectivement. Son orientation dans le site de liaison de la PDF de *P. aeruginosa* est représentée sur la figure V.4.

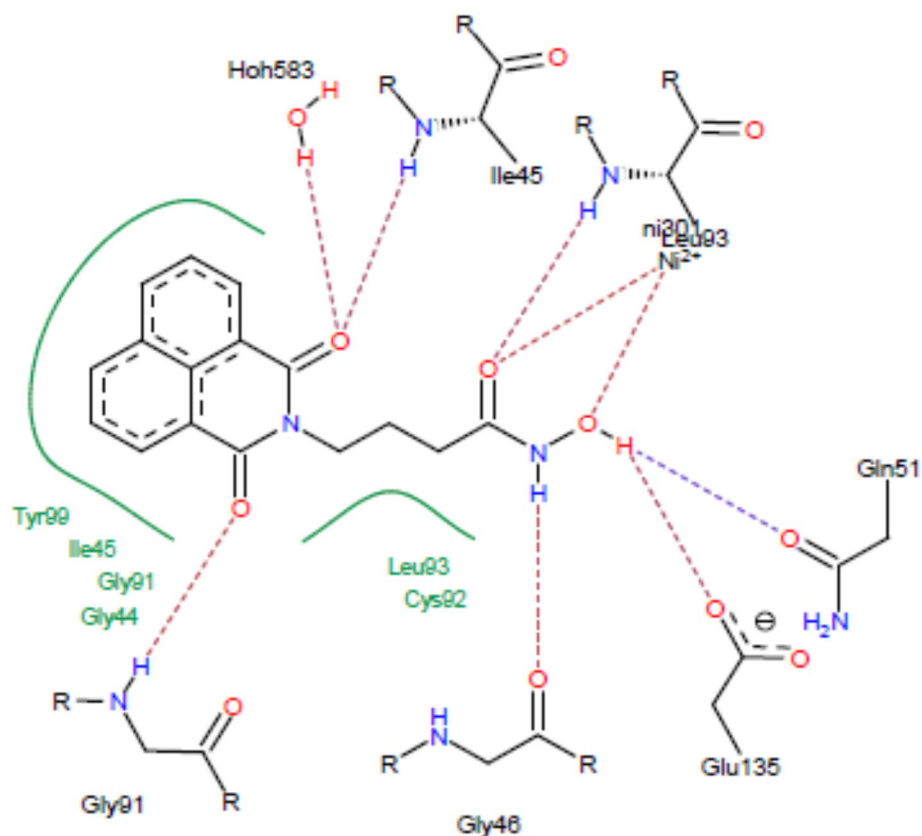


Figure V.4 Mode de liaison du composé ZINC03872971 avec le site actif de la PDF de *P. aeruginosa*. Les lignes vertes représentent les interactions hydrophobiques. Les tirets discontinus représentent les ponts hydrogène.

L'analyse visuelle montre que le composé ZINC03872971 chélate à l'ion métallique à travers le groupement acide hydroxamique et les atomes d'oxygène de son carbonyle et hydroxyle agissent comme un ligand bidenté pour le Ni_2^+ .

Le composé ZINC03872971 établit six liaisons hydrogène avec les résidus de site actif par l'intermédiaire de son groupement chélateur, parmi lesquels le Gln51 et Glu135 qui sont les deux acides aminés jouant un rôle important dans la fonction catalytique de cette enzyme (Becker *et al*, 1998), dans le tableau V.4 ci-dessous nous avons résumé ces différentes liaisons.

Tableau V.4 Les liaisons hydrogènes formées par le ligand ZINC03872971.

Liaisons Hydrogène	Atomes du ligand ZINC03872971	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
1	O15	H-H ₂ O583	1.98
2	O15	HN-Ile45	2.07
3	O12	HN-Gly91	2.18
4	O20	HN-Leu93	1.91
5	O20	Ni ²⁺	2.22
6	N21-H	O-Gly46	2.21
7	O22-H	OE1-Gln51	2.24
8	O22-H	OE1-Glu135	1.93
9	O22	Ni ²⁺	2.01

De nombreuses interactions de type hydrophobe assurent également la stabilité du complexe *P. aeruginosa* PDF-composé ZINC03872971 (Figure V.4). Ces interactions sont formées entre l'inhibiteur et les résidus Gly44, Ile45, Gly91, Cys92, Leu93 et Tyr99 du site actif de l'enzyme.

III.2. Complexe *E. coli* PDF-composé ZINC00500969

L'analyse réalisée par FlexX a permis d'identifier aisément les résidus jouant un rôle critique dans la formation et la stabilité des complexes PDFs-Inhibiteurs, c'est-à-dire ceux contribuant de façon importante et constante à l'énergie d'interaction. En ce qui concerne la PDF d'*E. coli*, les résidus clés sont ceux qui constituent l'essentiel du site de liaison, à savoir Gly89, Leu91, Cys90 (Meinzel *et al*, 1997) et, plus particulièrement, Gln50 et Glu133 (Tableau V.5).

L'analyse visuelle (Figure V.5) montre que le composé ZINC00500969 forme avec le site actif d'*E. coli* PDF six ponts hydrogène.

Tableau V.5 Les six ponts hydrogène formés par le composé ZINC00500969 et les résidus du site actif d'*E. coli* PDF.

Liaisons Hydrogène	Atomes du ligand ZINC00500969	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
1	O12	HN-Leu91	1,68
2	O12	HE2-Gln50	2.08
3	O14-H	OE1-Gln50	1.68
4	O14	Ni ²⁺	1.82
5	N13-H	OE2-Glu133	1.83
6	N10	HN-Leu91	2.09

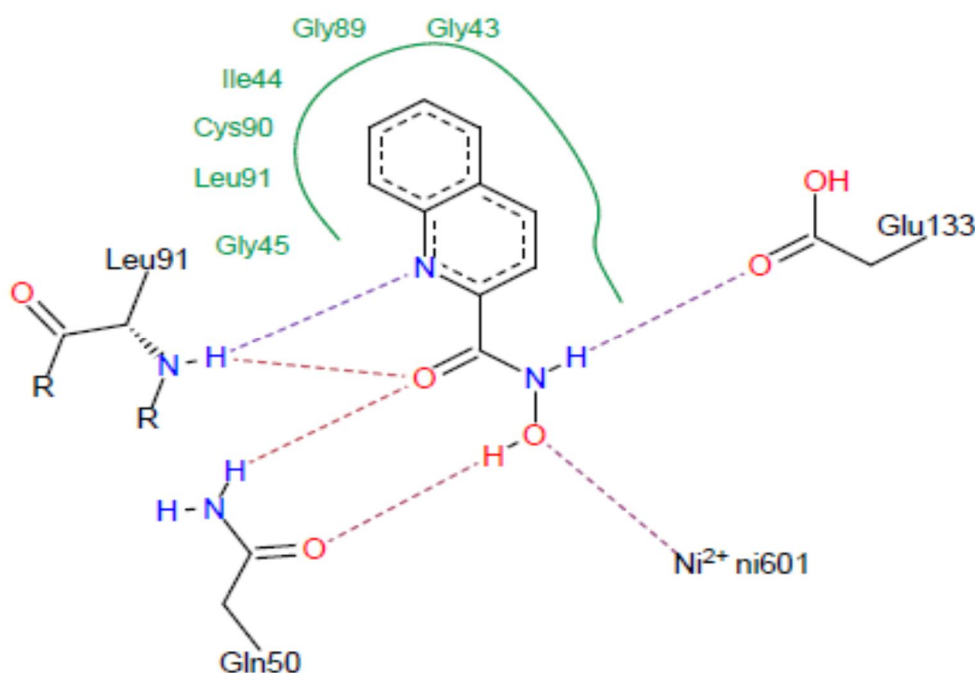


Figure V.5 La structure arrimée de ZINC00500969 à l'intérieur de la poche de liaison d'*E. coli* PDF montrant leurs différentes interactions

Il est très important de souligner que l'inhibiteur ZINC00500969 est stabilisé également au sein du site actif de la PDF d'*E. coli* par des interactions hydrophobiques avec les résidus Gly43, Ile44, Gly45, Gly89, Cys90 et Leu91.

III.3. Complexe *S. aureus* PDF-ZINC01393372

Parmi les molécules étudiées, le composé ZINC01393372 et ZINC01187537 avec de faibles énergies d'interaction envers toutes les PDFs bactériennes étudiées, se présentent comme des inhibiteurs puissants de la PDF (Tableau V.3).

Le composé ZINC01393372 dont le nom chimique N4-(4-fluorophenoxy)-N-hydroxy-3-nitrobenzene carboxamide est considéré comme le meilleur inhibiteur de PDF de *S. aureus*. L'analyse visuelle montre que ce composé établit six liaisons hydrogènes avec les résidus de site actif (Figure V.6), dans le tableau suivant nous avons résumé les paires d'atomes interagissant dans ces liaisons:

Tableau V.6 Les liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur ZINC01393372.

Liaisons Hydrogène	Atomes du ligand ZINC01393372	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
1	O15	H-H ₂ O196	2.10
2	O16	HN-Gly110	1.84
3	O18	Zn ²⁺	2.34
4	O18	HN-Leu112	2.08
5	O18	HE2-Gln65	1.64
6	O20-H	OE1-Gln65	2.10

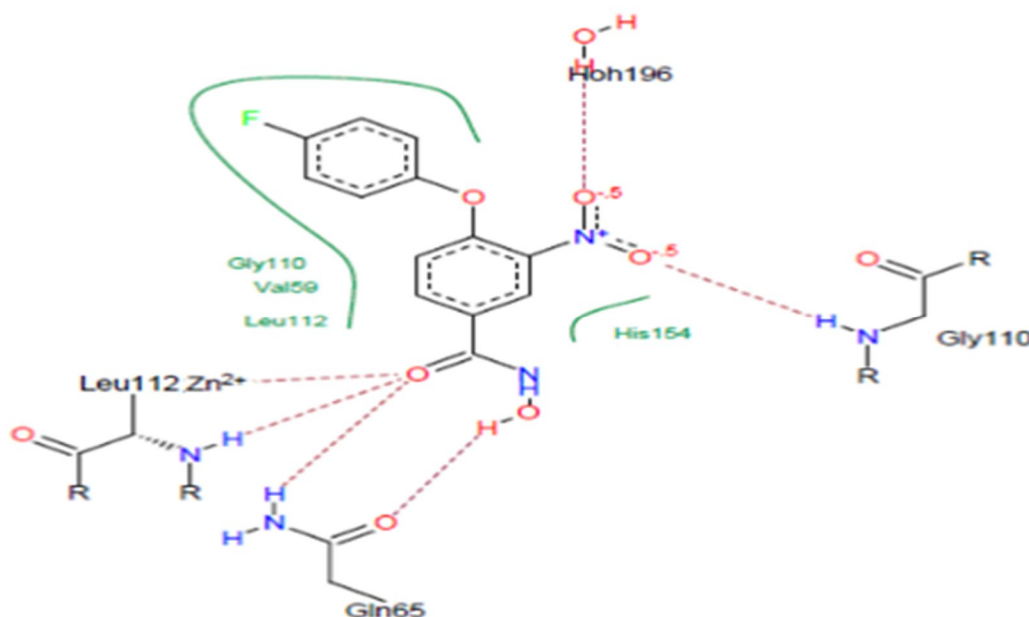


Figure V.6 Résultat de docking de composé ZINC01393372 avec *S. aureus* PDF

Des interactions hydrophobiques sont aussi observées avec les résidus Val59, Gly110, Leu112 et His154 (Figure V.7).

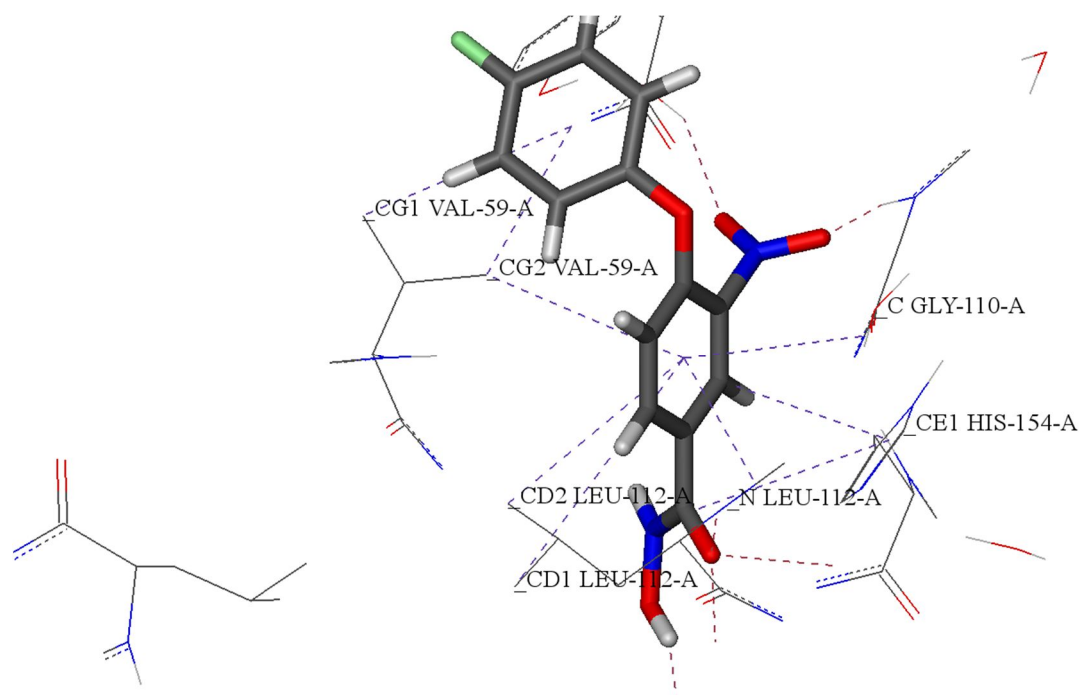


Figure V.7 Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé ZINC01393372 avec la PDF de *S. aureus*

III.4. Complexe *S. aureus* PDF-ZINC01187537

Avec une énergie d'interaction avec la PDF de *S. aureus* de -32.4642 kJ/mol, le composé ZINC01187537 possède la meilleure énergie après le ZINC01393372. Cette énergie se caractérise par la présence de dix ponts hydrogènes avec les résidus de site d'interaction Ser57, Val59, Gly60, Gln65, Leu112, His145 et Glu155, ces ponts sont représentés dans le tableau V.7 et la figure V.8 ci-dessous

Tableau V.7 Les dix ponts hydrogène formés par le ligand ZINC01187537.

Liaisons Hydrogène	Atomes du ligand ZINC01187537	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
1	N13-H	OE2-Glu155	1.79
2	O14-H	OE1-Glu155	1.85
3	O8	HN-Val59	1.70
4	O8	HN-Gly60	2.09

5	O12	HN-Leu112	1.61
6	O12	HE2-Gln65	2.25
7	O12	Zn ²⁺	2.50
8	O10-H	O-Ser57	2.33
9	O14	HE2-Gln65	2.03
10	N2-H	N-His154	2.05

L'étude du mécanisme d'inhibition de la PDF de *S. aureus* par le composé ZINC01187537 par docking moléculaire a révélé que ce composé forme des interactions faibles avec la poche hydrophobe de site actif (Figure V.8).

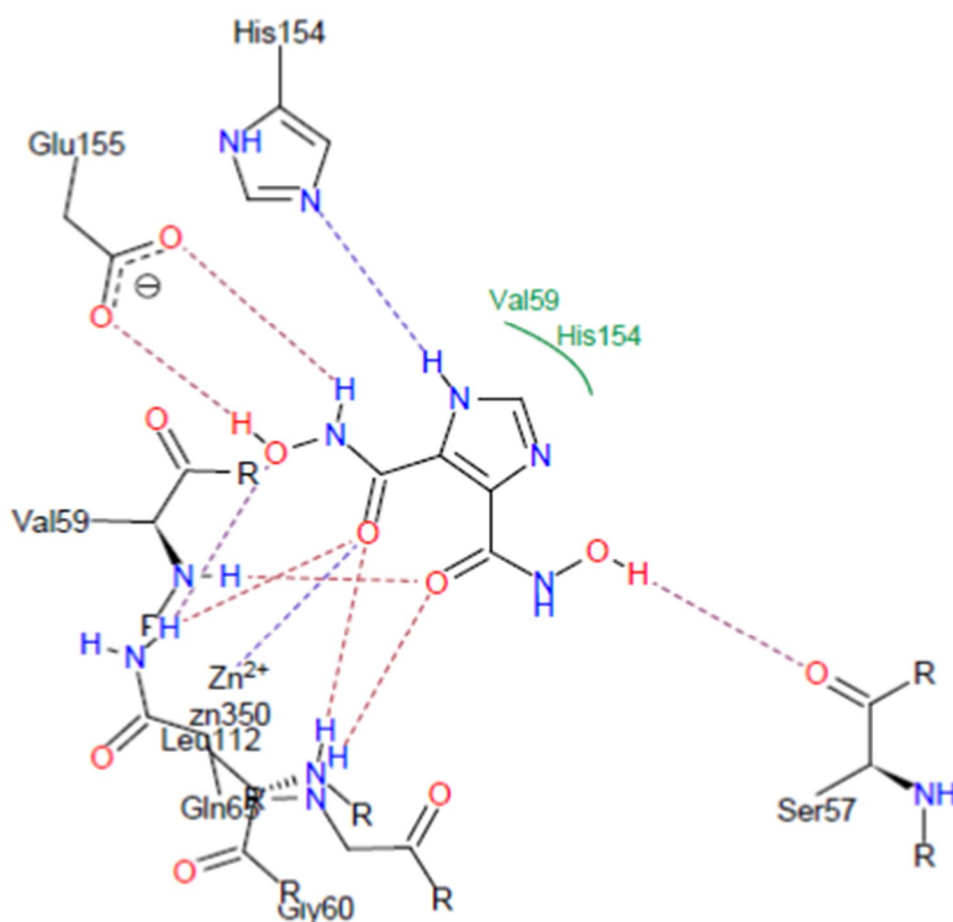


Figure V.8 La pose amarrée de ZINC01187537 dans la poche de liaison de *S. aureus* PDF

III.5. Complexe *S. pneumoniae* PDF-composé ZINC00344344

Parmi les quinze inhibiteurs étudiés, le composé ZINC00344344 forme le complexe *S. pneumoniae* PDF-inhibiteur le plus stable et possède le meilleur effet inhibiteur avec une valeur d'énergie de liaison de -32,0422 kJ/mol, suivi par le composé ZINC01187537 ($\Delta G = -31,1087$ kJ/mol).

La stabilité de ce composé dans le site actif est gouvernée par sa chélation à l'ion métallique via le carbonyle de son groupement hydroxamate, les interactions hydrophobiques de son groupement diméthyl-benzène avec la poche hydrophobe du site actif et les liaisons hydrogènes formées entre les résidus de la protéine et l'inhibiteur (Tableau V.8 et Figure V.9).

Tableau V.8 Représentation des liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur ZINC00344344.

Liaisons Hydrogène	Atomes du ligand ZINC00344344	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
1	N10-H	O-Gly71	1.97
2	O11	HE1-Glu174	1.97
3	O11-H	OE1-Gln76	1.91
4	O9	Ni ²⁺	1.80
5	O9	H-Leu131	2.21
6	O14	H-H ₂ O3165	2.03
7	N15-H	O-Gly68	1.75

La figure V.9 illustre le mode d'interaction du composé ZINC00344344 avec les résidus de site actif de la PDF de *S. pneumoniae*.

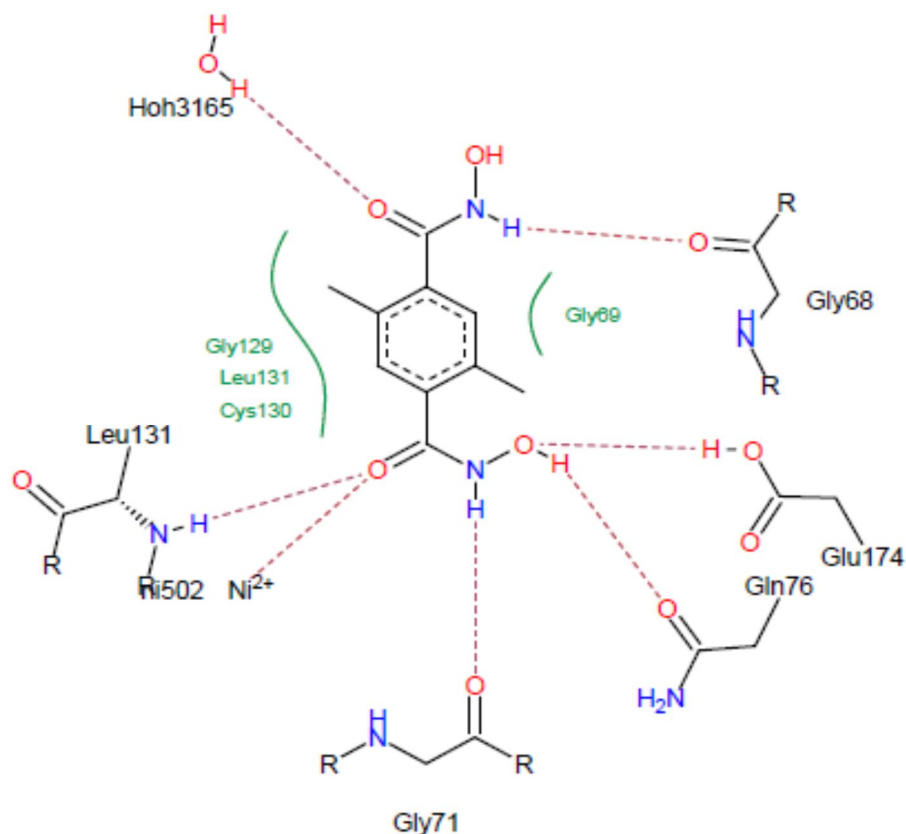


Figure V.9 Mode d'interaction du ZINC00344344 dans le site actif de la PDF de *S. pneumoniae*

III.6. Complexe *S. pneumoniae* PDF-ZINC00039650

Le composé ZINC00039650 n'a qu'un seul groupe hydrophile qui est l'hydroxamate. Les figures V.10 et V.11 montrent que le composé ZINC00039650 pénètre bien dans la poche de liaison du *S. pneumoniae* PDF, formant différentes interactions avec les acides aminés du site actif (Tableau V.9),

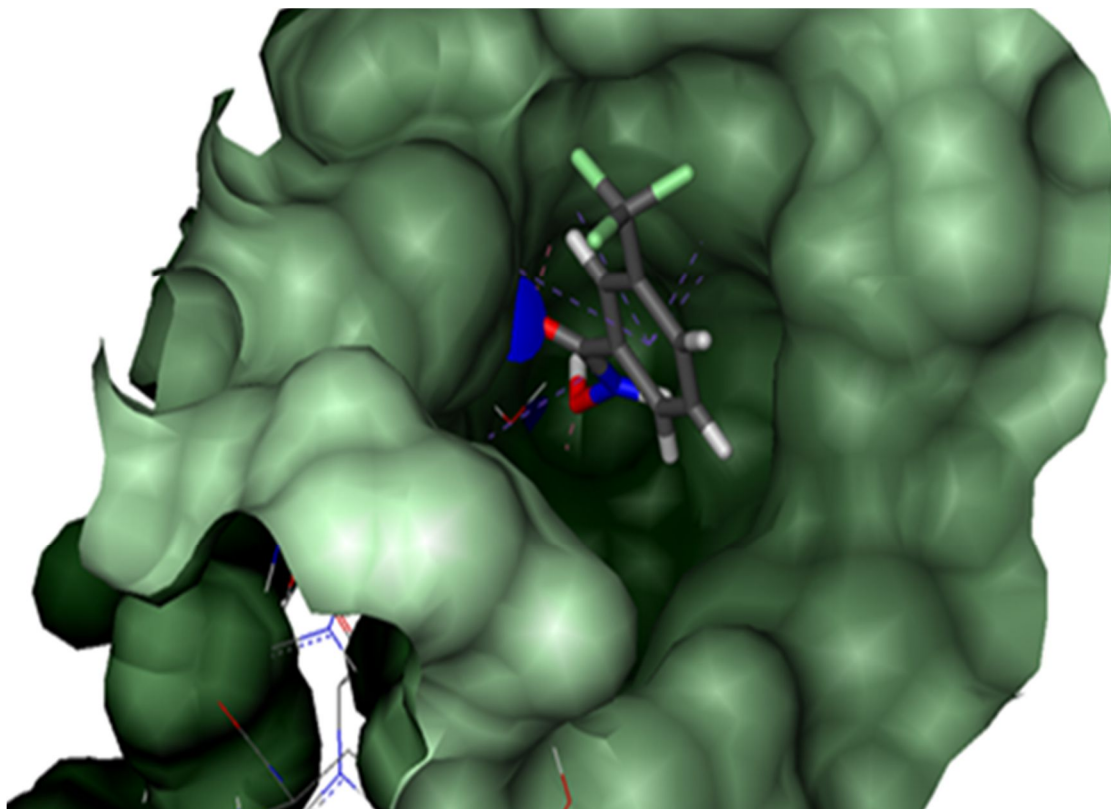


Figure V.10 Illustration du positionnement de l'inhibiteur ZINC00039650 dans le site actif de la PDF de *S. pneumoniae*.

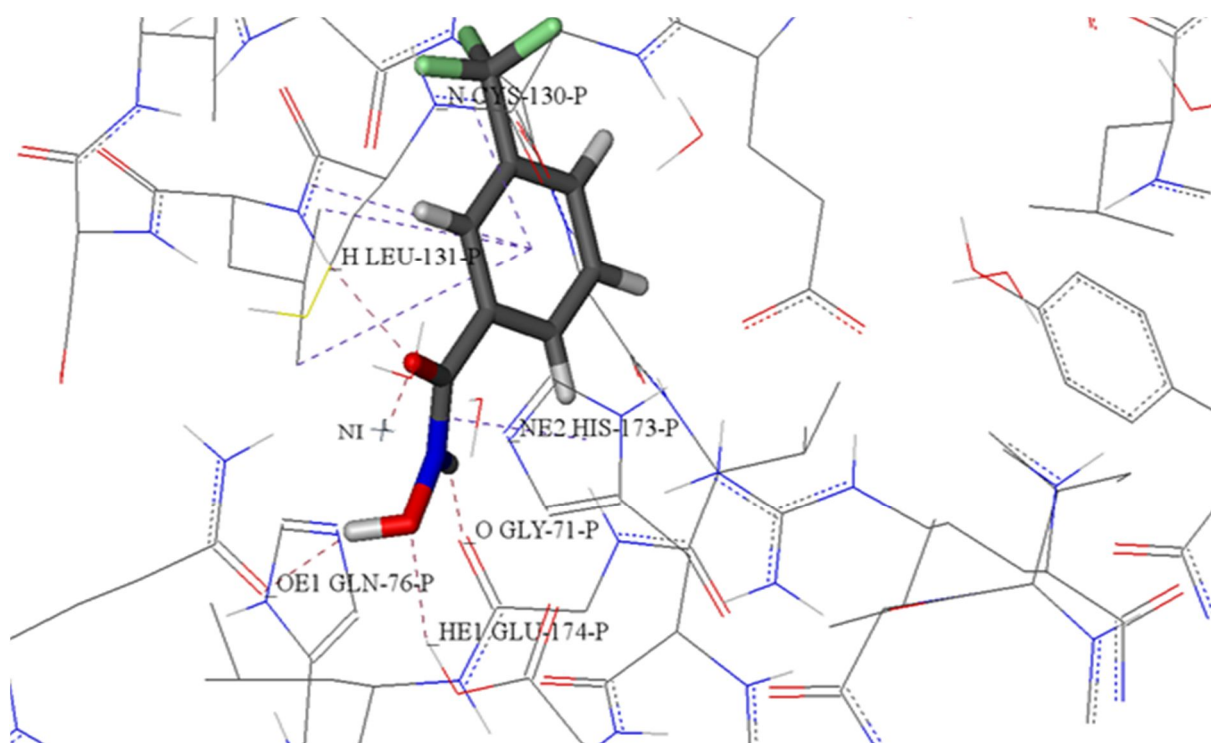


Figure V.11 Le mode d'interaction de composé ZINC00039650 avec le site actif de la PDF de *S. pneumoniae*.

Tableau V.9 Les liaisons hydrogènes formées par les différents atomes du ligand ZINC00039650

Liaisons Hydrogène	Atomes du ligand ZINC00039650	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
1	O12	Ni ²⁺	1.88A
2	O12	HN-Leu131	2.23
3	N13-H	O-Gly71	1.79
4	O14	HE1-Glu174	1.92
5	O14-H	OE1-Gln76	1.74

La stabilité du complexe formé à partir de ce composé est gouvernée aussi par des interactions hydrophobiques entre son groupement trifluorométhyl benzène et les acides aminés Cys130 et Leu131 comme représentées dans la figure V.11.

III.7. Complexe *E. coli* PDF-composé ZINC01428769

Parmi les ligands testés, le composé ZINC01428769 et ZINC01393372 ont montré les scores de docking les plus bas, suivis des composés ZINC01187537, ZINC0034434 et ZINC00500969. Ils forment les complexes *E. coli* PDF-inhibiteurs les plus stables.

Le composé ZINC01428769 dont le nom chimique 3-pyrrolidinobenzene carbohydroxamic-acid, et le composé ZINC01393372 avec les plus faibles valeurs d'énergie d'interaction, -31.6889 kJ/mol et -31.5692 kJ/mol respectivement, sont considérés comme les meilleurs inhibiteurs de la PDF d'*E. coli*. Les interactions clés de la liaison entre ZINC01428769 et la PDF d'*E. coli*, suggérées par FlexX, peuvent être identifiées précisément par une inspection visuelle de l'assemblage moléculaire (Figure V.12).

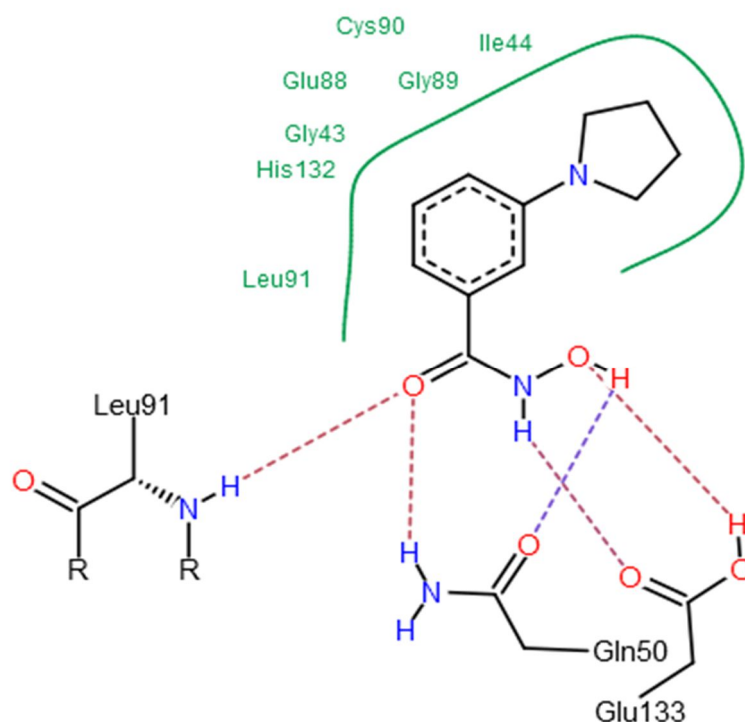


Figure V.12 Représentation des résidus clés du PDF d'*E. coli* en interaction avec ZINC01428769.

La liaison composé ZINC01428769–*E. coli* PDF repose principalement sur des ponts d'hydrogène entre le groupement chélateur de l'inhibiteur et les résidus Gln50, Leu91 et Glu133 (Tableau V.10). Des contacts multiples entre le fragment hydrophobe de ZINC01428769, pyrrolidinobenzène, et les résidus hydrophobes de site actif complètent la liaison (Figure V. 12).

Tableau V.10 Les ponts d'hydrogène formés par le composé ZINC01428769

Liaisons Hydrogène	Atomes du ligand ZINC01428769	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
1	O15-H	OE1-Gln50	1.61
2	O13	HE2-Gln50	1.99
3	O13	H-Leu91	1.79
4	O15	HE1-Glu133	1.75
5	N14-H	OE2-Glu133	1.79

III.8. Complexe *E. faecalis* PDF-composé ZINC01403330

Selon FlexX, les acides aminés du site actif d'*E. faecalis* PDF sont : Leu41, Arg56, Gly57, Gly58, Val59, Gly60, Leu61, Ala62, Gln65, Leu108, Glu110, Gly111, Glu112, Gly113, Cys114, Leu115, Ser116, Arg127, Tyr150, Ile153, Val154, Val155, His157, Glu158, His161 et Leu188.

Parmi les 1671 molécules criblées, 314 composés présentent des valeurs de score supérieures à celle du GSK1322322, l'inhibiteur de référence. Le composé ZINC01403330 ($\Delta G = -32,56$ kJ / mol) et le composé ZINC00039650 ($\Delta G = -31,04$ kJ / mol) avec les meilleurs scores (Tableau V.3) sont les inhibiteurs les plus puissants de la PDF d'*E. Faecalis*.

Le mode d'interaction de composé N-hydroxy-1,2,3-thiadiazole-4-carboxamide (ZINC01403330) avec le site de liaison d'*E. faecalis* PDF est représenté dans la figure V.13.

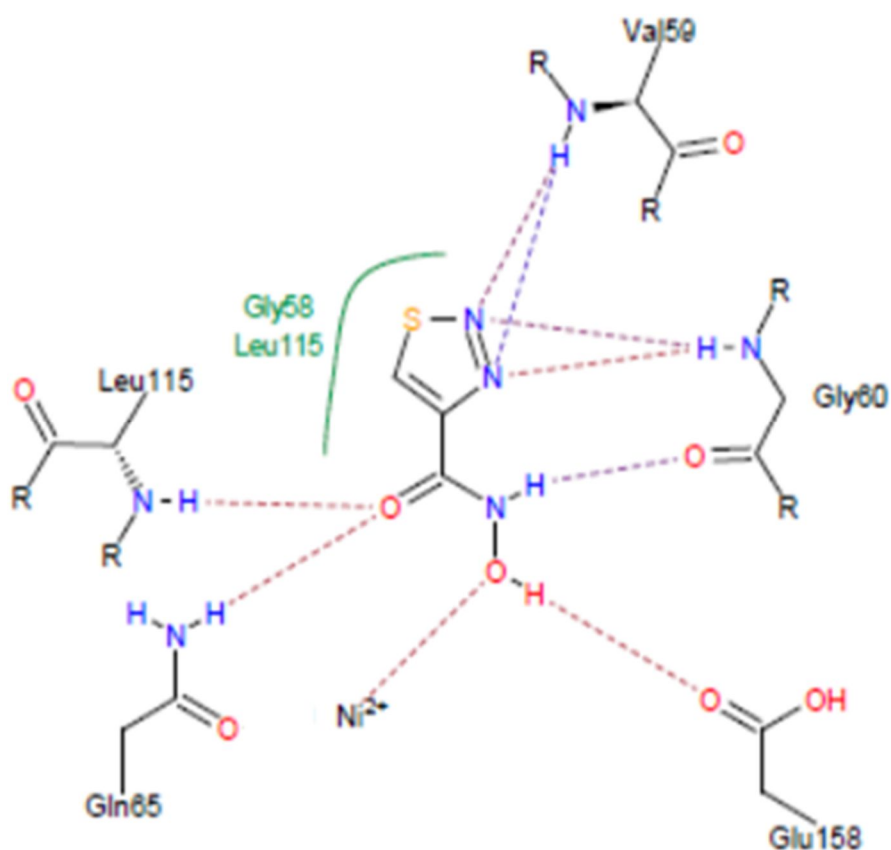


Figure V.13 Docking de composé ZINC01403330 dans le site actif d'*E. faecalis* PDF

La visualisation des résultats de docking montre que le composé ZINC01403330 forme avec le site actif neuf liaisons hydrogène regroupées dans le tableau suivant :

Tableau V.11 les neuf liaisons hydrogène formées par le ligand ZINC01403330

Liaisons Hydrogène	Atomes du ligand ZINC01403330	Atomes et résidus du site actif	Distance
1	N4	HN-Val59	1.55
2	N4	HN-Gly60	2.32
3	N3	HN-Val59	2.47
4	N3	HN-Gly59	2.09
5	O7	HN-Leu115	1.95
6	O7	HE2-Gln65	2.02
7	N8-H	O-Gly60	2.08
8	O9	Ni ⁺²	2.41
9	O9-H	OE1-Glu158	1.76

Il existe des interactions hydrophobes, représentées par des lignes vertes dans la figure V.13, stabilisant le composé Zinc01403330 avec les résidus Gly58 et Leu115.

III.9. Complexe *E. faecalis* PDF-composé ZINC00039650

Les figures V.14 et V.15 montrent le site actif d'*E. faecali* sPDF complexé avec du N-hydroxy-3-(trifluorométhyl) benzamide (ZINC00039650). Le composé est bien centré dans le site actif de l'enzyme. Des interactions intéressantes ont été détectées entre eux avec un nombre élevé de liaisons (12 liaisons) et une forte valeur d'énergie d'interaction (-31,04 kJ / mol).

Plusieurs interactions hydrophobes stabilisent le composé ZINC00039650 ; Elles sont effectuées avec les résidus Val59, Cys114, Leu115 et His157. La figure suivante visualise ces interactions.

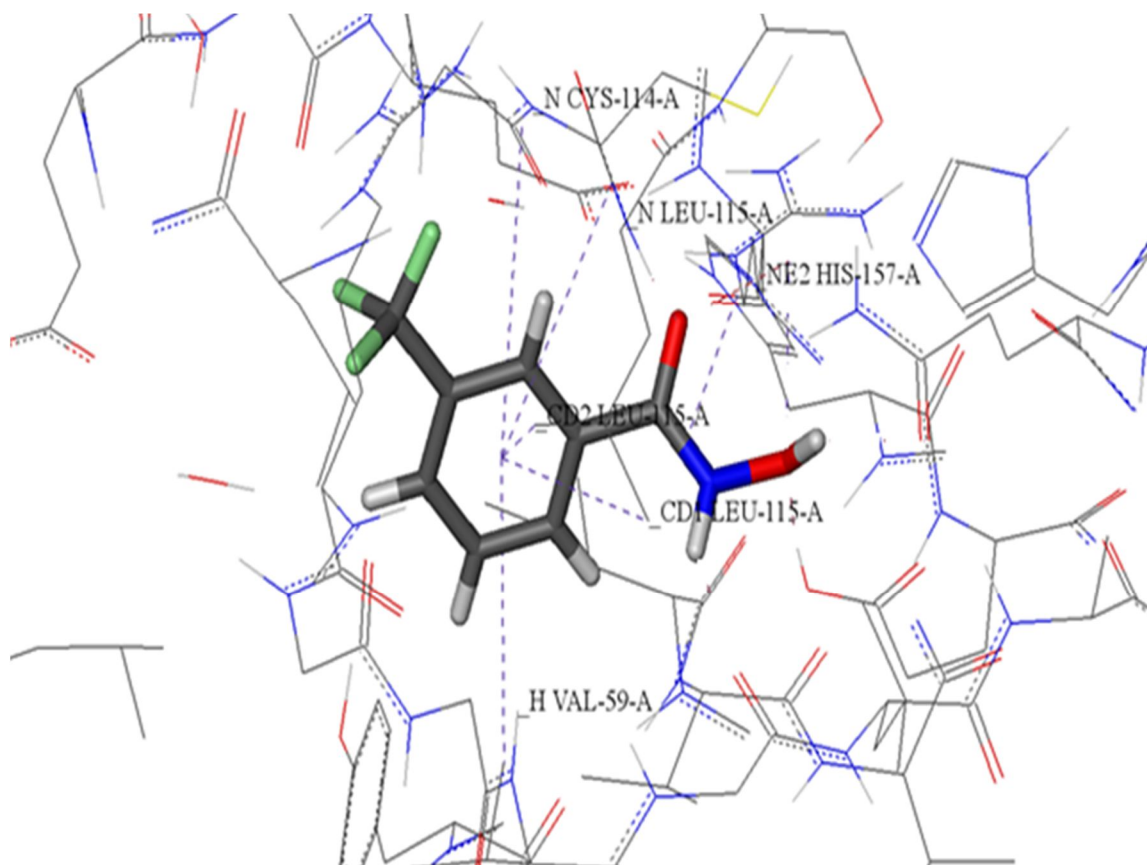


Figure V.15 Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé ZINC00039650 avec la PDF d'*E. faecalis*.

IV. Prédiction de la similarité médicamenteuse

Plusieurs molécules bioactives n'atteignent pas les phases cliniques pour leurs propriétés pharmacocinétiques défavorables. C'est la raison pour laquelle, une étude computationnelle des meilleurs composés prédits par l'amarrage moléculaire en utilisant FlexX a été effectuée pour estimer la solubilité, l'absorption et la perméabilité et les valeurs évaluées sont décrites dans le tableau qui suit.

Tableau V.13 Critères de la règle de Lipinski pour les molécules étudiées.

Composés	Poids moléculaire (g/mol)	Log P	Donneur d'H	Accepteur d'H	Nb de liaisons rotables
ZINC01187537	186.127	-0.5705	5	8	2
ZINC00344344	224.216	1.3232	0	4	3
ZINC00162966	167.164	1.2105	3	4	1
ZINC01430255	234.208	0.5069	2	6	3
ZINC00162979	187.582	1.5555	3	4	1
ZINC00500969	188.186	1.7447	2	4	1
ZINC03872971	298.298	1.6292	2	6	4
ZINC01455730	245.662	1.796	2	5	4
ZINC01428769	206.245	1.8617	2	4	2
ZINC00126407	238.268	1.5238	3	5	2
ZINC01455744	290.113	1.9051	2	5	4
ZINC01428755	248.238	0.897	2	6	4
ZINC01403330	145.143	0.048	2	5	1
ZINC01393372	292.222	3.5593	2	7	4
ZINC00039650	205.135	2.2153	2	3	2

Les résultats ont montrés que les meilleurs composés prédits par l'amarrage moléculaire répondent à la règle de cinq de Lipinski, on a pu observer que les propriétés pharmacocinétiques de tous les composés proposés étaient conformes aux critères de cette règle, en se référant à leurs faibles poids moléculaires et à leur caractère lipophile. Ils avaient de bonnes propriétés qui les rendraient probablement des médicaments actifs par voie oral.

V. Criblage antibactérien

V.1. Activité antibactérienne *in vitro*

L'objectif de la réalisation de l'antibiogramme est d'étudier l'activité antibactérienne des meilleures molécules de l'étude précédente, criblage virtuel de la banque de donnée ZINC, et de mettre en évidence leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des espèces bactériennes pathogènes pour l'être humain.

La méthode d'antibiogramme par diffusion sur milieu solide a permis de déterminer l'action de molécules étudiées sur trois bactéries à Gram négatif *E. coli* (ATCC25922), *K. pneumoniae* (ATCC700603) et *P. aeruginosa* (ATCC27853) et deux bactéries à Gram positif, à savoir *S. aureus* (ATCC25923) et *E. faecalis* (ATCC29212), Le résultat se traduit par l'apparition des halos d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné des molécules testées comme témoins de l'inhibition de la croissance bactérienne dans cette zone.

Les tableaux ci-dessous rapportent les diamètres en mm des zones d'inhibition révélées par les molécules testées sur les différents germes étudiés.

Tableau V.14 Antibiogramme des souches étudiées en présence de différentes molécules testées

Composés testés (30 µg/µl) (150 µg/disque)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)				
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
C1: ZINC01187537	-	6.5 ±0.7	-	-	-
C2: ZINC00034434	-	-	-	-	07±0
C3: ZINC00162966	6.5±0	-	6.5±0	07±0	-
C4: ZINC01430255	-	-	-	-	-
C5: ZINC00162979	6,5±0	07±0	6.5±0	07±0	10±0
C6: ZINC00500969	7±1.4	7.5±0.7	07±1.4	-	11.5 ±0.7
C7 : ZINC01428769	6.5±0	6.5±0	07±0	-	10.5±0.7
C8 : ZINC03872971	16.5±0.7	16.5±0.7	16.5 ±0.7	-	17.5±0.7

C9 : ZINC00039650	15±1.4	11±0	15±1.4	-	16.5±0.7
C10 : ZINC00126407	16.5±0.7	13.5±0.7	16±0	8.5±0.7	17±0
C11 : ZINC01455744	6.5±0.7	6.5±0.7	07±0	-	-
C12 : ZINC01393372	07±0	-	07±0	-	07±0
C13 : ZINC01455730	07±0	12.5±0.7	-	-	-
C14 : ZINC01428755	-	-	-	-	-
C15 : ZINC01403330	-	08±0	-	-	9±1.41
Ciprofloxacine (5 µg/disque)	26.5±0.7	31±1.4	26.5±0.7	33±1.4	33.5±0.7

Les valeurs représentent la moyenne ± écart type, - Indique aucune zone d'inhibition, Le contrôle négatif (DMSO) n'a montré aucune activité.

Le pouvoir inhibiteur diffère d'une souche bactérienne à une autre, d'une molécule testée à une autre. Les diamètres des halos d'inhibition à la concentration de 30 µg/µl sont compris entre 6.5 et 16.5 mm pour *E. coli*, *S. aureus* et *K. pneumoniae* et de 7 à 8.5 mm pour *P. aeruginosa*. Des zones d'inhibition plus importantes comprises entre 07 et 17,5 mm ont été enregistrées pour la souche *E. faecalis* (Tableau V.14).

Comme le montre le tableau V.14, les composés ZINC03872971, ZINC00039650 et ZINC00126407 se présentent comme les agents antibactériens les plus efficaces par rapport aux autres composés testés. Les diamètres d'inhibition sont compris entre 11 et 17.5 mm.

D'après les figures ci-dessous, on remarque que les cinq différentes souches réagissent différemment aux composés étudiés (Figures V.16a et V.16b), les produits ZINC03872971 (C8), ZINC00039650 (C9) et ZINC00126407 (C10) semblent jouir d'une activité inhibitrice particulièrement large sur les différentes bactéries testées excepté pour *P. aeruginosa*.

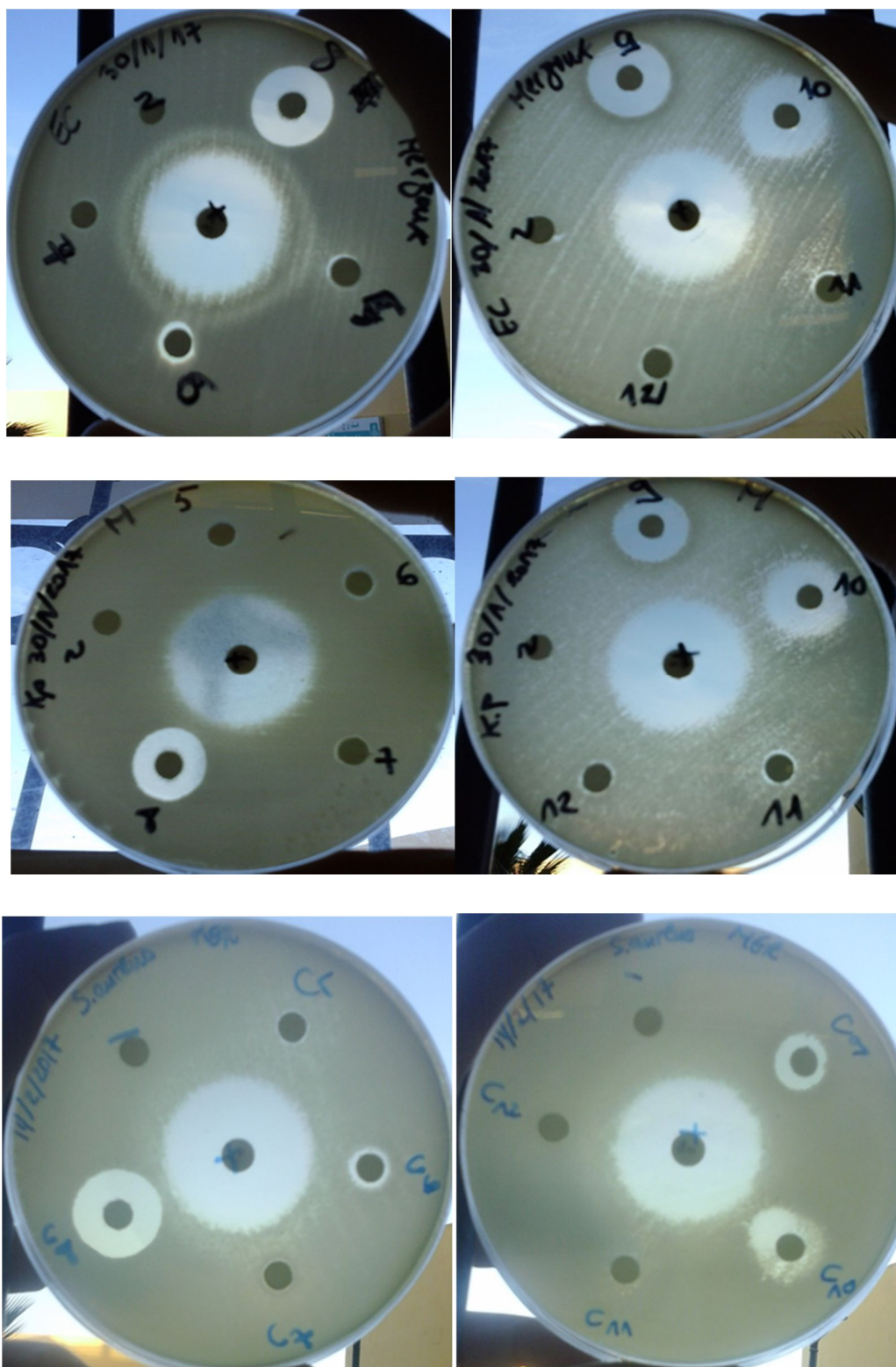


Figure V.16a. Photographies des zones inhibitrices des composés ZINC03872971 (C8), ZINC00039650 (C9) et ZINC00126407 (C10) sur les souches *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. aureus*

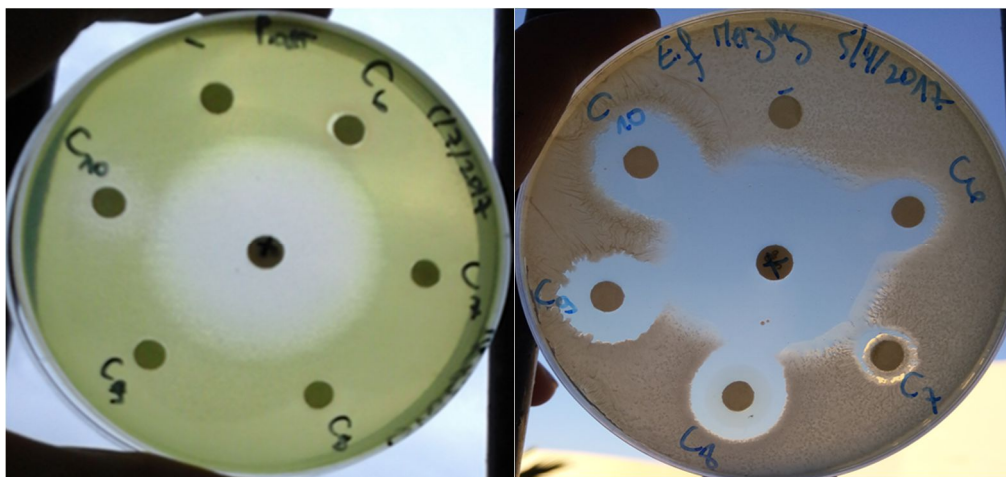


Figure V.16b Photographies des zones inhibitrices des composés ZINC03872971 (C8), ZINC00039650 (C9) et ZINC00126407 (C10) sur les souches bactériennes *P. aeruginosa* et *E. faecalis*.

Des valeurs similaires ont été notées avec les composés ZINC03872971 (C8), ZINC00039650 (C9) et ZINC00126407 (C10) pour les souches *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. faecalis*. Le composé ZINC03872971 a montré l'activité inhibitrice la plus élevée contre *S. aureus* ($16,5 \pm 0,7$ mm) suivi par le composé ZINC00126407 et ZINC01455730 avec des zones d'inhibition de $13,5 \pm 0,7$ mm et $12,5 \pm 0,7$ mm respectivement (Tableau V.14).

Tableau V.15a Diamètres des zones d'inhibition des bactéries *E. coli* et *K. pneumoniae* obtenus par la méthode de diffusion en utilisant différentes concentrations

Composés testés	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)											
	<i>E. coli</i>						<i>K. pneumoniae</i>					
	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46
C8 : ZINC03872971	16.5 ± 0.7	15.5 ± 0.7	13 ± 0	11.5 ± 0.7	11 ± 0	9.5 ± 0.7	16	14.5 ± 0.7	13 ± 0	11 ± 0	10 ± 0	8.5 ± 0.7
C9 : ZINC00039650	14.5 \pm 0.7	12 \pm 1.4	11 ± 0	09 ± 0	7.5 ± 0.7	-	13 $\pm 1.$ 4	10 ± 0	08 $\pm 1.$ 4	07 ± 0	6.5 ± 0	-
C10 : ZINC00126407	16 ± 0	13.5 ± 0.7	12 ± 0	10 \pm 1.4	9.5 \pm 0.7	8.5 \pm 0.7	14 ± 0	12.5 \pm 0.7	12 ± 0	9.5 \pm 0.7	07 ± 0	-

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart type, - Indique aucune zone d'inhibition

Tableau V.15b Diamètres des zones d'inhibition des bactéries *S. aureus* et *E. faecalis* obtenus par la méthode de diffusion en utilisant différentes concentrations

Composés testés	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)											
	<i>S. aureus</i>						<i>E. faecalis</i>					
	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46
C8 : ZINC03872971	16 \pm 0	15 \pm 0	13.5 \pm 0.7	11 \pm 1.4	10.5 \pm 0.7	9 \pm 0	15.5 \pm 0.7	14 \pm 0	12.5 \pm 0.7	11 \pm 0	9.5 \pm 0.7	8 \pm 0
C9 : ZINC00039650	13.5 \pm 0.7	9.5 \pm 0.7	08 \pm 0	7.5 \pm 0.7	-	-	14.5 \pm 0.7	13 \pm 0	11 \pm 0	8.5 \pm 0.7	07 \pm 0	-
C10 : ZINC00126407	12 \pm 0	10.5 \pm 0.7	08.5 \pm 0.7	07 \pm 0	-	-	15.5 \pm 0.7	14 \pm 0	12.5 \pm 0.7	11 \pm 0	10 \pm 0	08 \pm 1.4

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart type, - Indique aucune zone d'inhibition

D'après les résultats des tableaux V.15a et V.15b, le composé ZINC03872971 (C8) montre un effet inhibiteur sur *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* et *K. pneumoniae* à toutes les concentrations utilisées.

Tableau V.15c Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion en utilisant la concentration de 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Composés testés	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
C1: ZINC01187537	/	08	/	/
C2: ZINC00034434	/	/	/	/
C3: ZINC00162966	15	/	18.5 \pm 0.7	10
C4: ZINC01430255	/	/	/	/
C5: ZINC00162979	13.5 \pm 0.7	08	15.5 \pm 0.7	9.5 \pm 0.7
C6: ZINC00500969	17	/	17.5 \pm 0.7	/
C7 : ZINC01428769	/	6.5 \pm 0.7	/	/
C8 : ZINC03872971	/	/	/	/
C9 : ZINC00039650	/	/	/	/
C10 : ZINC00126407	/	/	/	/
C11 : ZINC01455744	13.5 \pm 0.7	13.5 \pm 0.7	15	/
C12 : ZINC01393372	10	/	10	07

C13 : ZINC01455730	13.5 ±0.7	/	14.5 ±0.7	/
C14 : ZINC01428755	/	/	/	/
C15 : ZINC01403330	/	/	/	/

Les valeurs représentent la moyenne ± écart type, / Indique non fait.

Les souches testées semblent résistantes aux molécules ZINC00162966 (C3), ZINC00162979 (C5), ZINC00500969 (C6), ZINC01455744 (C11), ZINC01393372 (C12) et ZINC01455730 (C13) à la concentration 30 µg/µl mais plus sensibles à la forte concentration (Tableau V.15c et Figure V.17).

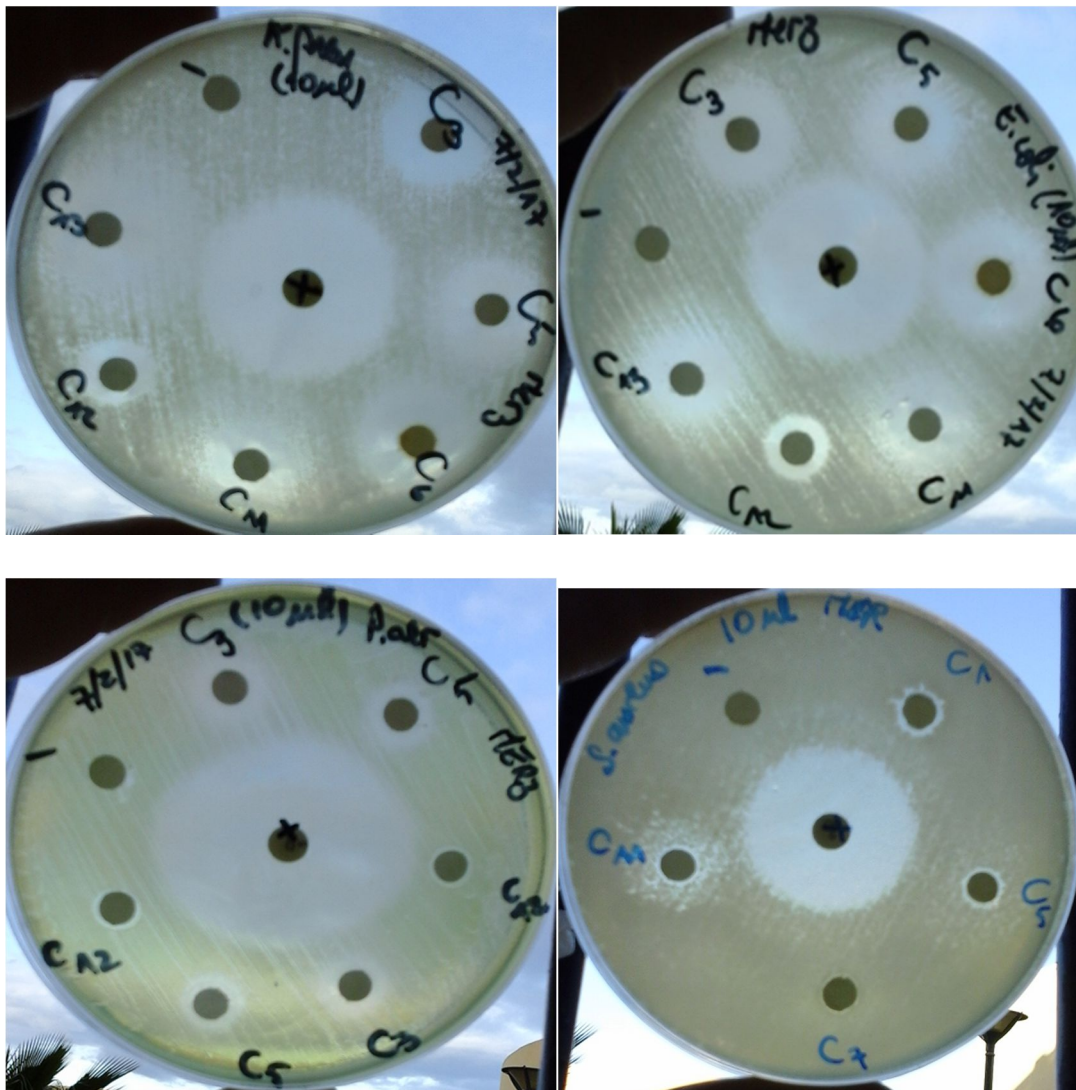


Figure V.17 Photographies des zones inhibitrices des souches bactériennes *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* à la concentration de 60 µg/µl.

La souche *P. aeruginosa* s'avère la plus résistante de toutes les souches. Les diamètres des halos d'inhibition ne dépassent pas les 8.5 mm à la faible concentration (30 µg/µl), et 10 mm à la forte concentration (60 µg/µl) (Tableau V.15c), elle se révèle la plus résistante pour tous les composés testés, cette résistance peut être attribuée à des pompes d'efflux dans son biofilm, expulsant activement les produits antibactériens (De Kievit *et al*, 2001 ; Poole, 2001 ; Aeschlimann, 2003).

V.2. Détermination de la CMI

Les MIC des produits actifs, obtenus par la méthode de diffusion sur disque de papier, pour chaque souche bactérienne sont présentés dans le tableau V.16.

Tableau V.16 CMI des meilleurs produits

Composés	Concentration Minimale Inhibitrice (µg/ml)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>
C6: ZINC00500969	/	/	/	/	128
C8: ZINC03872971	32	32	64	/	64
C9: ZINC00039650	128	>256	256	/	128
C10:ZINC00126407	64	256	128	>256	64
C13:ZINC01455730	/	>256	/	/	/

/ Indique non fait.

La CMI a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide pour les différentes souches bactériennes (Tableau V.16), La souche d'*E. coli* a été la plus sensible pour les produits testés avec des CMI de 32 µg/ml pour le composé ZINC03872971 et 64 µg/ml pour ZINC00126407 et 128 µg/ml pour ZINC00039650, tandis que les autres souches semblent plus résistantes que la souche d'*E. coli*.

Pour le composé ZINC03872971 (C8), les CMI sont comprises entre 32 et 64 µg/ml pour les souches testées; *E. coli* et *S. aureus* possèdent la valeur la plus faible, *K. pneumoniae* et *E. faecalis* s'agravent autour d'une même valeur de 64 µg/ml. Dans le cas des composés 9 et 10, ils ont montré une activité variant de 128 à >256 et de 64 à 256 µg/ml respectivement.

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition sont corrélées avec les valeurs de CMI recherchées, plus les diamètres des zones d'inhibition augmentent plus les CMI diminuent.

Les résultats des MICs obtenus ont confirmé ceux obtenus par la méthode de diffusion sur disque en papier.

Une analyse des résultats de l'activité antibactérienne a révélé que la présence de certains éléments et fragments chimiques comme le trifluorométhyle dans le composé ZINC00039650, le cycle isoquinoléine dans le composé ZINC03872971 et le cycle benzothiazine dans le composé ZINC00126407 ont amélioré leur activité biologique.

Les composés ZINC00162966, ZINC00162979, ZINC01428769, ZINC00039650, ZINC01455744 et ZINC01455730 ont montré une activité antibactérienne variée en fonction des divers substituants présents sur le noyau benzénique. Les données d'activité suggèrent que le composé ZINC00039650 avec un substituant trifluorométhyle sur le noyau benzénique présentent une meilleure activité antibactérienne que les composés avec d'autres substituants.

Le remplacement du substituant 3-trifluorométhyle par la 3-pyrrolidine dans ZINC01428769 a conduit à une diminution de l'activité antibactérienne. L'échange du brome dans ZINC01455744 en chlore dans ZINC1455730 a amélioré l'activité antibactérienne.

De plus, l'introduction de groupes 2-dihydroxy-5-méthyle ou 2-hydroxy-4-chloro sur le cycle benzénique dans les composés ZINC00162966 et ZINC00162979 a conduit respectivement à des composés moins actifs.

Nous avons également analysé l'effet du remplacement du cycle benzénique par quelques hétérocycles comme la benzothiazine et l'isoquinoléine sur l'activité antibactérienne. Le composé ZINC03872971 avec un cycle isoquinoléine a montré une augmentation de l'activité antibactérienne par rapport au composé ZINC00039650. Le remplacement du cycle benzénique par la benzothiazine comme dans ZINC00126407 a conduit à l'un des composés étudiés les plus actifs.

Ces résultats sont en accord avec nos observations *in silico*. Les composés actifs *in vitro* ont montré de bonnes interactions avec le site actif de l'enzyme PDF. D'après l'étude computationnelle résumée aux figures V.4 à V.15, des groupes comme le trifluorométhyle benzène, le fluorobenzène, la benzo-isoquinoléine ou le pyrrolidino benzène étaient plus favorables aux interactions hydrophobes avec le site actif par rapport à d'autres groupes. Le groupe benzo-isoquinoléine du composé le plus actif, ZINC03872971, s'introduit bien dans la poche hydrophobe de site actif, qui est le site de liaison de la chaîne latérale de la méthionine du substrat (Smith *et al*, 2001).

Nos résultats ont montré que les composés ZINC00039650, ZINC03872971 et ZINC00126407 sont des agents intéressants qui méritent d'être étudiés de manière plus approfondie notamment pour leur activité inhibitrice contre d'autres microorganismes pathogènes.

Les résultats obtenus dans notre étude concordent avec ceux d'autres auteurs, comme Hackbarth *et al.*, (2002) ; Robert (2011) ; Sanjay *et al.*, (2011) ; Lee *et al.* (2012) et O'Dwyer *et al.* (2013) qui ont trouvé que les composés contenant un groupe hydroxamate ou N-formyl hydroxylamine peuvent être de puissants agents antibactériens en utilisant la PDF comme cible.

De nombreuses substances bioactives ont été développées à travers les processus de criblage virtuels, tels que l'identification de nouveaux antituberculeux à l'aide d'une stratégie combinant la prédiction de la similarité médicamenteuse, les méthodes utilisant des pharmacophores et les études d'amarrage moléculaire (Renet *al.*, 2015), l'identification des inhibiteurs naturels contre le PDF en utilisant un criblage virtuel basé sur la structure de la cible de 452 ligands phytochimiques (Gupta et Sahu, 2015), le développement de six nouveaux anti-diabétiques par le criblage *in silico* de 1888 composés collectés à partir de la banque de données ZINC contre la glycogène phosphorylase (Parmenopoulou, 2014) ou l'identification de six nouveaux composés comme candidats possibles pour la conception d'inhibiteurs puissants et sélectifs de la phosphodiesterase 4 grâce à la modélisation des pharmacophores à base de ligand et à l'approche d'amarrage moléculaire (Ganugapati et Swarna, 2014). Ces processus sont des techniques bioinformatique qui permettent une identification rapide de substances thérapeutiques.

Auparavant, de nouveaux inhibiteurs de la PDF en tant que médicaments antibactériens (Gao *et al.*, 2016) et antituberculeux (Puniaet *al.*, 2014) ont été identifiés par des approches basées sur la structure de la cible et de ligands provenant de la banque de données ZINC.

Dans notre étude, nous avons identifié trois nouveaux antibactériens à partir de la banque de données ZINC en appliquant une stratégie combinant la méthode de criblage virtuel et les tests microbiologiques. Ainsi, cette étude a confirmé l'efficacité des méthodes de criblage dans l'identification des produits chimiques thérapeutiques non seulement contre les infections bactériennes, mais aussi contre d'autres maladies.

CONCLUSION

L'objectif de ce travail a été la découverte de meilleurs inhibiteurs de la peptide déformylase bactérienne en tant que nouveaux agents antibactériens en appliquant une stratégie qui combine la méthode du criblage virtuel basé sur la structure de la cible et les tests microbiologiques.

Avant de procéder au criblage virtuel des composés chimiques contenus dans la banque de données ZINC vis-à-vis de la peptide déformylase de certaines espèces bactériennes pathogènes à l'aide du programme de docking FlexX (2.1.8, 2014), nous avons essayé de tester la capacité de ce programme à prédire l'emplacement correct d'un ligand au niveau de son récepteur. Les tests utilisés dans cette étude de fiabilité, le test RMSD, l'analyse visuelle et l'étude de la corrélation entre l'activité expérimentale et l'affinité prédite par le docking ont permis de conclure que FlexX est un programme hautement performant.

Afin de réduire la taille de la banque de données ZINC et de ne retenir que les composés destinés à être analysés virtuellement par docking moléculaire, nous avons pris en compte la présence d'un groupement hydroxamate ou N-formyl-N-hydroxylamine comme critère de choix. La chimiothèque ZINC nous propose, parmi les millions de molécules disponibles, une collection de plus de 1600 structures chimiques possédant un de ces deux groupements comme sous structure. 21.88 % des composés criblés ont une énergie d'interaction inférieure à celle de l'inhibiteur de référence, le GSK1322322. Les résultats du docking montrent que les composés sélectionnés ont des orientations différentes dans les poches de liaison des PDFs bactériennes en raison de leur diversité du point de vue de leur composition atomique et par conséquent de leurs propriétés physico-chimiques.

L'analyse des résultats a montré que les composés étudiés pénètrent bien dans les sites de liaison de l'enzyme en formant plusieurs liaisons hydrogène ainsi que des interactions hydrophobes, et que la plupart des liaisons hydrogène étaient formées par le groupement chélateur, ce qui est très similaire à l'inhibiteur GSK1322322.

Les 15 meilleurs composés ont été achetés pour évaluer *in vitro* leur activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* par les différentes techniques d'antibiogramme. Les tests biologiques effectués *in vitro* ont montré que les cinq souches testées réagissent

différemment aux composés étudiés et que les produits ZINC03872971, ZINC00039650 et ZINC00126407 semblent détenir une activité inhibitrice particulièrement large sur les différentes bactéries testées exceptée sur *P. aeruginosa*.

Les résultats ont révélé que la présence de certains éléments comme le trifluorométhyle dans le composé ZINC00039650, le cycle isoquinoléine dans le composé ZINC03872971 et le cycle benzothiazine dans le composé ZINC00126407 ont contribué à améliorer leur activité biologique. Ces résultats sont en accord avec nos observations *in silico*. Les composés actifs *in vitro* ont établi de bonnes interactions avec le site actif de l'enzyme PDF, le trifluorométhylbenzène, le fluorobenzène et la benzo-isoquinoléine étaient plus favorables aux interactions avec la poche hydrophobe de site actif, qui constitue le site de liaison de la chaîne latérale de la méthionine du substrat.

Pour de meilleurs résultats et dans le prolongement de ce travail il conviendrait de réaliser une étude similaire en utilisant deux ou trois programmes de docking parmi les plus récents et les plus performants, ceux-ci ne cessant d'être améliorés.

Il serait également très intéressant de poursuivre ce travail préliminaire en testant *in vitro* l'activité inhibitrice de ces composés proposés vis-à-vis de la peptidase bactérienne et d'essayer d'optimiser la structure de ces composés afin d'améliorer leur affinité et leur activité.

BIBLIOGRAPHIE

Acar J.F., Moulin G. 2012. Antimicrobial resistance: a complex issue. *Rev sci tech Off int Epiz.* **31**, 23-31.

Adams J.M. 1968. Isoxazoles as peptide deformylase inhibitors. *J Mol Biol.* **33**, 571-589.

Adrein B., Carmela G., Sylvain P., Yann D., Rodolphe A.S., Valery L., Thierry C., Frederic D., Isabelle A., Thierry M. 2007. Discovery and refinement of a new structural class of potent peptide deformylase inhibitors. *J Med Chem.* **50**, 10-20.

Aeschlimann J.R. 2003. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy.* **23**, 916-924.

Alexander K.B., Qingfeng Y., Steven Y.Q., Manas K.H., Srivastava D.K. 2010. Solvent-assisted slow conversion of a dithiazole derivative produces a competitive inhibitor of peptide deformylase. *Biochim Biophys Acta.* **1804**, 704-713.

Aminov R.I. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol.* **11**, 2970–2988.

Anderson A.C. 2003. The process of structure-based drug design. *Chem Biol.* **10**, 787-97.

Apfel C., Banner D.W., Bur D., Dietz M., Hirata T., Hubschwerlen C., Locher H., Page M.G., Pirson W., Rosse G., Specklin J.L. 2000. Hydroxamic acid derivatives as potent peptide deformylase inhibitors and antibacterial agents. *J Med Chem.* **43**, 2324-31.

Apfel C., Banner D.W., Bur D., Dietz M., Hubschwerlen C., Locher H., Marlin F., Masciadri R., Pirson W., Stalder H. 2001. 2-(2-oxo-1,4-dihydro-2Hquinazolin-3-yl)- and 2-(2,2-dioxo-1,4-dihydro-2H-2λ6-benzo[1,2,6]thiadiazin-3-yl)-N-hydroxy-acetamides as potent and selective peptide deformylase inhibitors. *J Med Chem.* **44**, 1847–1852.

Archambaud M., Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse, 2010, [en ligne], www.cismed-inov.org/IMG/pdf/Bacterio_2010_20et_2011pdf_1_.pdf. (Consultez le 15 Mars 2015).

Arrault A. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de Doctorat en Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. France : Université d'Orléans, 2007, 191 p.

Aubart K.M., Christensen S.B., Briand J., Cummings M.D, Peptide deformylase inhibitors. U.S. Patent 6,806,369, October 19, 2004.

Azoulay-Dupuis E., Mohler J., Bédos J.P. 2004. Efficacy of BB-83698, a Novel peptide deformylase inhibitor, in a mouse model of pneumococcal pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 80–85.

Bajorath J. 2002. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat RevDrug Discovery.* **1**, 882-894.

Baldwin E.T., Harris M.S., Yem A.W., Wolfe C.L., Vosters A.F., Curry K.A., Murray R.W., Bock J.H., Marshall V.P., Cialdella J.I., Merchant M.H., Choi G., Deibel M.R. 2002. Crystal structure of type II peptide deformylase from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* **277**, 31163–31171.

Barbara G.G., Jeffrey H.T., John W.K., Stephan K.G. 2000. Inhibition of bacterial peptide deformylase by biaryl acid analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 355-358.

Barbault F. Molecular docking and virtual screening. <https://fr.slideshare.net/FlorentBarbault/molecular-docking-andvirtualsecreening>. (Consultez le 25 Mai 2015).

Becker A., Schlichting I., Kabsch W., Groche D., Schultz S., Wagner A.F. 1998. Iron center, substrate recognition and mechanism of peptide deformylase. *Nat Struct Biol.* **5**, 1053-1058.

Becker A., Schlichting I., Kabsch W., Schultz S., Wagner A.F. 1998. Structure of peptide deformylase and identification of the substrate binding site. *J Biol Chem.* **273**, 11413-11416.

Böhm H.J. 1992. LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J Comput Aided Mol Des.* **6**, 593-606.

Böhm H.J. 1992. The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors. *J Comput Aided Mol Des.* **6**, 61-78.

Böhm H.J. 1998. Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *J Comput Aided Mol Des.* **12**, 309-323.

Boucherit H., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Hioual K.S., Mokrani E.H. 2014. Theoretical study of the interactions involved in the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase by several molecules. *Computational Biology and Bioinformatics.* **2**, 63-73.

Boularot A., Giglione C., Petit S., Duroc Y., Alves de Sousa R., Larue V., Cresteil T., Dardel F., Artaud I., Meinnel T. 2007. Discovery and refinement of a new structural class of potent peptide deformylase inhibitors. *J Med Chem.* **50**, 10–20

Bressi J.C., Verlinde C.L., Aronov A.M., Shaw M.L., Shin S.S., Nguyen L.N., Suresh S., Buckner F.S., Van Voorhis W.C., Kuntz I.D., Hol W.G., Gelb M.H. 2001. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae via structure-based drug design. *J Med Chem.* **44**, 2080-2093.

Butcher E.C., Berg E.L., Kunkel E.J. 2004. Systems biology in drug discovery. *Nat Biotechnol.* **22**, 1253-9.

Butler D., Chen D., O'Dwyer K., Lewandowski T., Aubart K., Zalacain M. 2014. Potent Sub-MIC Effect of GSK1322322 and Other Peptide Deformylase Inhibitors on In Vitro Growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**, 290–296.

Chae P.S., M.S. Kim C.S. Jeung S.D. Lee H. Park S. Lee J. 2005. Suh, Peptide-cleaving catalyst selective for Peptide deformylase. *J Am Chem Soc.* **127**, 2396–2397.

Chakraborti K. A., Thilagavathi R. 2003. Computer-aided design of non sulphonyl COX-2 inhibitors: An improved comparative molecular field analysis incorporating additional descriptors and comparative molecular similarity indices analysis of 1,3-diarylisindole derivatives. *Bioorg Med Chem.* **11**, 3989-3996.

Chan M.K., Gong W., Rajagopalan P.T.R., Hao B., Tsai C.M., Pei, D.1997. Crystal structure of the *Escherichia coli* peptide deformylase. *Biochemistry.* **36**, 13904-13909.

ChemBank, <http://chembank.broad.harvard.edu>. (Consultez en Mars 2015).

Chemical Abstracts Service .<http://www.cas.org/>. (Consultez le 12/10/2016).

ChemNavigator. <http://www.chemnavigator.com/cnc/products/iRL.asp>. (Consultez le 12/10/2016).

Chen D., Hackbarth C., Ni Z.J., Wu C., Wang W., Jain R., He Y., Bracken K., Weidmann B., Patel D.V., Trias J., White R.J., Yuan Z. 2004. Peptide deformylase inhibitors as antibacterial agents: identification of VRC3375, a proline-3-alkylsuccinyl hydroxamate derivative, by using an integrated combinatorial and medicinal chemistry approach. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 250-261.

Chen D.Z., Patel D.V., Hackbarth C.J., Wang W., Dreyer G., Young D.C. 2000. Actinonin, a naturally occurring antibacterial agent, is a potent deformylase inhibitor. *Biochemistry.* **39**, 1256-1262.

Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase substances antibactériennes à l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. Thèse de Doctorat en microbiologie. Algérie : Université Mentouri Constantine, 2007, 126 p.

Chikhi A., Bensegueni A. 2008. Docking Efficiency Comparison of Surfex, a commercial package and Arguslab, a Licensable Freeware. *J Comput Sci Syst Biol.* **1**, 81-86.

Chikhi A., Bensegueni A. 2008. In Silico Study of the Selective Inhibition of Bacterial Peptide Deformylases by Several Drugs. *J Proteomics Bioinform.* **1**, 161-165.

Chikhi A., Bensegueni A., Boulahrouf A., Bencharif M. 2006. Theoretical study of *Escherichia coli* peptide deformylase inhibition by several drugs. *In Silico Biology.* **6**, 459-466.

Christian A., David W.B., Daniel B., Michel D., Christian H., Hans L., Frederic M., Raffaello M., Wolfgang P., Henri S. 2001. 2-(2-Oxo-1,4-dihydro-2H-quinazolin-3-yl)- and 2-(2,2-Dioxo-1,4-dihydro-2H-2λ⁶-benzo[1,2,6]thiadiazin-3-yl)-N-hydroxyacetamides as potent and selective peptide deformylase inhibitors. *J Med Chem.* **44**, 1847-1852.

Clark R.D., Webster-Clark D.J. 2008. Managing bias in ROC curves. *J Comput Aided Mol Des.* **22**, 141-146.

Clements J.M., Beckett R.P., Brown A., Catlin G., Lobell M., Palan S., Thomas W., Whittaker M., Wood S., Salama S., Baker P.J., Rodgers H.F., Barynin V., Rice D.W., Hunter

M.G. 2001. Antibiotic activity and characterization of BB-3497, a novel peptide deformylase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 563-570.

Corinne J.H., Dawn Z.C., Jason G.L., Kirk C., James B.M., Jeffrey A.C. Peter S.M., Wen W., Jim K., Charlotte W., Lopez S., George W.I., Helen G., Elina D., Kulathia R., Shi-Hao P., Wilma L.P., Jeff J., Joaquim T., Dinesh V.P., Beat W., Richard J.W., Zhengyu Y. 2002. N-alkyl urea hydroxamic acids as a new class of peptide deformylase inhibitors with antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**, 2752-2764.

Cummings M.D., Des Jarlais R.L., Gibbs A.C., Mohan V., Jaeger E.P. 2005. Comparison of automated docking programs as virtual screening tools. *J Med Chem.* **48**, 962-976.

Cynamon M.H., Alvarez-Freites E., Yeo A.E.T. 2004. BB-3497, a peptide deformylase inhibitor, is active against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* **53**, 403–405.

D'Agata E.M.C., 2004. Rapidly rising prevalence of nosocomial multidrug-resistant Gram-negative bacilli: a 9-year surveillance study. *Infect. Control Hosp Epidemiol.* **25**, 842-846.

Daniel J.D. Barbara G.G., John F.O. Stephan K.G. 1999. Peptide aldehyde inhibitors of bacterial peptide deformylases. *Arch Biochem Biophys.* **367**, 297-302.

Database System Comparisons, <http://cdb.ics.uci.edu/CHEM/Web/cgibin/supplement/Comparison.py>. (Consultez en Mars 2015).

Davies J.W., Glick M., Jenkins J.L. 2006. Streamlining lead discovery by aligning in silico and high-throughput screening. *Curr Opin Chem Biol.* **10**, 343-351.

Davies S.J., Ayscough A.P., Beckett R.P., Bragg R.A., Clements J.M., Doel S., Grew C., Launchbury S.B., Perkins G.M., Pratt L.M., Smith H.K., Spavold Z.M., Thomas S.W., Todd R.S., Whittaker M. 2003. Structure-activity relationships of the peptide deformylase inhibitor BB-3497: modification of the methylene spacer and the P1' side chain. *Bioorg Med Chem Lett.* **13**, 2709–2713.

De Kievit T.R., Parkins M.D., Gillis R.J., Srikumar R., Ceri H., Poole K., Iglewski B.H., Storey D.G. 2001. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**, 1761-1770.

Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R. Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson, 2007, 631 p.

Dias R., de Azevedo W.F.J. 2008. Molecular docking algorithms. *Curr Drug Targets*. **9**, 1040-1047.

Dickson M., Gagnon J.P. 2004. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. **3**, 417–429.

DiMasi J.A., Hansen R.W., Grabowski H.G. 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ*. **22**, 151-185.

Dobson C.M. 2004. Chemical space and biology. *Nature*. **432**, 824- 8.

Doman T.N., McGovern S.L., Witherbee B.J., Kasten T.P., Kurumbail R., Stallings W.C., Connolly D.T., Shoichet B.K. 2002. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J Med Chem*. **45**, 2213-2221.

Douguet D. Chemoinformatique et Bioinformatique Structurale : Conception de Drogues assistée par Ordinateur. <http://bioinfo.ipmc.cnrs.fr>. (Consultez le 15 Mars 2015).

Drlica K., Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*. **61**, 377–92.

Elam C., Lape M., Deye J., Zultowsky J., Stanton D.T., Paula S. 2011. Discovery of novel SERCA inhibitors by virtual screening of a large compound library. *Eur J Med Chem*. **46**, 1512-1523.

Enyedy I.J., Ling Y., Nacro K., Tomita Y., Wu X., Cao Y., Guo R., Li B., Zhu X., Huang Y., Long Y.Q., Roller P.P., Yang D., Wang S. 2001. Discovery of small-molecule inhibitors of Bcl-2 through structure-based computer screening. *J Med Chem*. **44**, 4313-4324.

Escobar A.S., Goldgur Y., Yang G., Ouerfelli O., Li Y., Scheinberg D.A. 2009. Structure and activity of human mitochondrial peptide deformylase, a novel cancer Target. *J Mol Biol*. **387**, 1211–1228.

Fischer E. 1894. Einfluss der Configuration auf die wirkung der Enzyme. *Ber*. **27**, 2985–2993.

- Foloppe N., Chen I.J., Davis B., Hold A., Morley D., Howes R. 2004. A structure-base strategy to identify new molecular scaffolds targeting the bacterial ribosome A-site. *Bioorg Med Chem.* **12**, 935-947.
- Forino M., Jung D., Easton J. B., Houghton P. J., Pellicchia M. 2005. Virtual docking approaches to protein kinase B inhibition. *J Med Chem.* **48**, 2278-2281.
- Fox W. Statistiques Sociales. 3^{ème} édition. France : De Boeck, 1999, 374 p.
- Fritsche T., Sader H., Cleeland R., Jones R. 2005. Comparative antimicrobial characterization of LBM415 (NVP PDF-713), a new peptide deformylase inhibitor of clinical importance. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 1468–1476.
- Gang S., Jinge Z., Anthony M.S., Dehua P. 2008. Design and synthesis of macrocyclic peptidyl hydroxamates as peptide deformylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **18**, 3060-3063.
- Gangwal R.P., Damre M.V., Das N.R., Dhoke G.V., A. Bhadauriya, Varikoti R.A., Sharma S.S., Sangamwar A.T. 2015. Structure based virtual screening to identify selective phosphodiesterase 4B inhibitors. *J Mol Graph Model.* **57**, 89-98.
- Ganugapati J., Swarna S. 2014. Molecular docking studies of antidiabetic activity of cinnamon compounds. *Asian J Pharm Clin Res.* **7**, 31-34.
- Gao J., Wang T., Qiu S., Zhu Y., Liang L., Zheng Y. 2016. Structure-based drug design of small molecule peptide deformylase inhibitors to treat cancer. *Molecules.* **21**, 396.
- Gaynes R., Edwards J.R. 2005. National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* **41**, 848-854.
- Ghosh S., Nie A., An J., Huang Z. 2006. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* **10**, 194-202.
- Giglione C., Boularot A., Meinnel T. 2004. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol Life Sci.* **61**, 1455–1474.
- Giglione C., Fieulaine S., Meinnel, T. 2015. N-terminal protein modifications: Bringing back into play the ribosome. *Qual. Control. Protein Synth.* **114**, 134–146

Giglione C., Pierre M., Meinnel T. 2000. Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol Microbiol.* **36**, 1197–1205.

Giglione C., Vallon O., Meinnel T. 2003. Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. *EMBO J.* **22**, 13-23

Gohlk H., Klebe G. 2002. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew Chem Int Ed Engl.* **41**, 2644-2676.

Gordon J.J., Kelly B.K., Miller G.A. 1962. Actinonin: an antibiotic substance produced by an actinomycete. *Nature.* **195**, 701–702.

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

Grüneberg S., Wendt B., Klebe G. 2001. Subnanomolar inhibitors from computer screening : a model study using human carbonic anhydrase II. *Angew Chem Int Ed Engl.* **40**, 389-393

Guilloteau J.P., Mathieu M., Giglione C., Blanc V., Dupuy A., Chevrier M., Gil P., Famechon A., Meinnel T., Mikol V. 2002. The crystal structures of four peptide deformylases bound to the antibiotic actinonin reveal two distinct types: A platform for the structure-based design of antibacterial agents. *J Mol Biol.* **320**, 951–962.

Gupta P.K.P., Sahu B. 2015. Identification of natural compound inhibitors against peptide deformylase using virtual screening and molecular docking techniques. *Bull Env Pharmacol Life Sci.* **4**, 70-80.

Hackbarth C.J., Chen D.Z., Lewis J.G., Clark K., Mangold J.B., Cramer J.A., Margolis P.S., Wang W., Koehn J., Wu C., Lopez S., Withers III G., Gu H., Dunn E., Kulathila R., Pan S.H., Porter W.L., Jacobs J., Trias J., Patel D.V., Weidmann B., White R.J., Yuan Z. 2002. N-Alkyl urea hydroxamic acids as a new class of peptide deformylase inhibitors with antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**, 2752-2764.

Hamlaoui I., Boulfefel S.E., Krid A., Bencharif M. 2011. Binding affinities and protein ligand complex geometries of some quinolylaryl α,β -unsaturated ketones. *J Health Sci.* **57**, 397-400

Han B., Ma X., Zhao R., Zhang J., Wei X., Liu X., Liu X., Zhang C., Tan C., Jiang Y., Chen Y. 2012. Development and experimental test of support vector machines virtual screening method for searching Src inhibitors from large compound libraries. *Chem Cent J.* **6**, 139. 1-14.

Hao B., Gong W., Rajagopalan P.T., Zhou Y., Pei D., Chan M. K. 1999. Structural basis for the design of antibiotics targeting peptide deformylase. *Biochemistry.* **38**. 4712-4719.

Helgren T.R., Chen C., Wangtrakuldee P., Edwards T.E., Staker B.L., Abendroth J., Sankaran B., Housley N.A., Myler P.J., Audia J.P., Horn J.R., Hagen T.J. 2017. *Rickettsia prowazekii* Methionine Aminopeptidase as a Promising Target for the Development of Antibacterial Agents. *Bioorgan Med Chem.* **25**, 813-824.

Hioual K.S., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Boucherit H., Mokrani E.H., Teniou S., Merabti B. 2004. Successful challenge: A key step in infectious diseases treatment using computer-aided drug design. *Int J Biol Sci.* **1**, 11-14.

Howard M.H., Cenizal T., Gutteridge S., Hanna W.S., Tao Y., Totrov M., Wittenbach V.A., Zheng Y.J. 2004. A novel class of inhibitors of peptide deformylase discovered through high-throughput screening and virtual ligand screening. *J Med Chem.* **47**, 6669–6672.

<http://www.clinicaltrials.gov>. (Consultez le 16/05/2015).

Hu Y., Rajagopalan P.T.R., Pei, D. 1998. H-Phosphonate derivatives as novel peptide deformylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **8**, 2479–2482.

Hu Y., Wei Y., Zhou Y., Rajagopalan P.T.R., Pei D. 1999. Determination of substrate specificity for peptide deformylase through the screening of a combinatorial peptide library. *Biochemistry.* **38**, 643–650.

Huang S.Y., Zou. X. 2010. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int J Mol Sci.* **11**, 3016-3030.

Huntington K.M., Yi T., Wei Y., Pei D. 2000. Synthesis and antibacterial activity of peptide deformylase inhibitors. *Biochemistry.* **39**, 4543–4551

Institut Pasteur, Résistance aux antibiotiques, [en ligne]. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/resistance-aux-antibiotiques>. (Consultez le 06 mars 2017).

- Islam M.A., Pillay T.S. 2014. Exploration of the structural requirements of HIV-protease inhibitors using pharmacophore, virtual screening and molecular docking approaches for lead identification, *J Mol Graph Model*. **56**, 20-30.
- Jaiprakash N.S., Firoz A.K.K., Devanand B.S. 2015. Peptide Deformylase: A New target in antibacterial, antimalarial and anticancer drug discovery. *Curr Med Chem*. **22**, 214-236.
- Jayasekera M.M.K., Kendall A., Shamma R., Dermeyer M., Tomala M., Shapiro M.A., Holler T.P. 2000. Novel nonpeptidic inhibitors of peptide deformylase, *Arch Biochem Biophys*. **381**, 313–316.
- Jones R.N., Fritsche T.R., Sader H.S. 2004. Antimicrobial spectrum and activity of NVP PDF-713, a novel peptide deformylase inhibitor, tested against 1837 recent Gram-positive clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **49**, 63–65.
- Jones R.N., Rhomberg P.R. 2003. Comparative spectrum and activity of NVP-PDF386 (VRC4887), a new peptide deformylase inhibitor. *J Antimicrob Chemother*. **51**, 157–161.
- Jones R.N., Sader H.S., Fritsche T.R. 2005. Antimicrobial activity of LBM415 (NVP PDF-713) tested against pathogenic *Neisseria spp.* (*Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*). *Diagn Microbiol Infect Dis*. **51**, 139–141.
- Karen O., Meredith H., Sarah H., Daryl H., Samuel B., Donghui Q., Kelly A., Magdalena Z., Deborah B. 2013. Comparative analysis of the antibacterial activity of a novel peptide deformylase inhibitor, GSK1322322. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**, 2333-2342.
- Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D. 2004. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins: Struct Funct Bioinf*. **57**, 225-242.
- Khan F.A., Patil R.H., Shinde D.B., Sangshetti J.N. 2016. Design and synthesis of 4'-((5-benzylidene-2,4-dioxothiazolidin-3-yl)methyl)biphenyl-2-carbonitrile analogs as bacterial peptide deformylase inhibitors. *Chem Biol Drug Des*. **88**, 938-944.
- Kim E.E., Kim K.H., Moon J.H., Choi K., Lee H.K., Park H.S. 2008. Structures of actinonin bound peptide deformylases from *E. faecalis* and *S. pyogenes*. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2OS1>. (Consultez le 17 Janvier 2014).

- Know Y.J., Sohn M.J., Zheng C., Kim W.G. 2010. Isolation and identification of FR198248, a hydroxylated 1,3-dihydroisobenzofuran *Aspergillus flavipes* as an inhibitor of peptide deformylase. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**, 90565-90568.
- Kokkonen P., Kokkola T., Suuronen T., Poso A., Jarho E., Lahtela-Kakkonen M. 2015. Virtual screening approach of sirtuin inhibitors results in two new scaffolds. *Eur J Pharm Sci.* **76**, 27-32.
- Koseki Y., Kinjo T., Kobayashi M., Aoki S. 2013. Identification of novel antimycobacterial chemical agents through the in silico multi-conformational structure-based drug screening of a large-scale chemical library. *Eur J Med Chem.* **60**, 333-339.
- Kramer B., Rarey M., Lengauer T. 1999. Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein–ligand docking. *Proteins.* **37**, 228–241.
- Kraemer O., Hazmann I., Podjarny A.D., Klebe G. 2004. Virtual screening for inhibitors of human aldose reductase. *Proteins.* **55**, 814-823.
- Kristi M.H., Tian Y., Yaoming W., Dehua P. 2000. Synthesis and antibacterial activity of peptide deformylase inhibitors. *Biochemistry.* **39**, 4543-4551.
- Kunqiang C., Weiqiang L., Lili Z., Xu S., Jin H. 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis inhibits *Helicobacter pylori* peptide deformylase activity. *Biochem Biophys Res.* **435**, 289-294.
- Kuntz I.D. 1992. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science.* **257**, 1078-1082.
- Kwon Y.J., Sohn M.J., Zheng C.J., Kim W.G. 2007. Fumimycin: a peptide deformylase inhibitor with an unusual skeletal produced by *Aspergillus fumisynnematus*. *Org Lett.* **9**, 2449-2451.
- Leach A.R., Gillet V.J. An introduction to chemoinformatics. Netherlands: Springer, 2007, 255.
- Lee S.J., Lee S.J., Lee S.K., Yoon H.J., Lee H.H., Kim K.K., Lee B.J., Lee B.I., Suh S.W. 2012. Structures of *Staphylococcus aureus* peptide deformylase in complex with two classes of new inhibitors. *Acta Crystallogr.* **68**, 784-793.

Lengauer T., Lemmen C., Rarey M., Zimmermann M. 2004. Novel technologies for virtual screening. *Drug Discov Today*. **9**, 27-34.

Ii K., Ichikawa S., Al-Dabhaigh B., Bouhss A., Matsuda A. 2010. Function-oriented synthesis of simplified caprazamycins: discovery of oxazolidine-containing uridine derivatives as antibacterial agents against drug-resistant bacteria. *J Med Chem*. **53**, 3793- 3813.

Lindsay M.A. 2005. Finding new drug targets in the 21st century. *Drug Discov Today*. **10**, 1683-1687.

Ling Y., Wei-Ren X., Zhi-Guo W., Da-Tong Z., Jiong J., Yan- Qing G., Yan L., Jian-Wu W. 2010. Synthesis and antimicrobial activities of novel peptide deformylase inhibitors. *ARKIVOC*. **9**, 196-205.

Lipinski C.A., Hopkins A. 2004. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature*. **432**, 855-61.

Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. **46**, 3-26.

Lofland D., Difuntorum S., Waller A., Clements J.M., Weaver M.K., Karlowsky J.A., Johnson K. 2004. In vitro antibacterial activity of the peptide deformylase inhibitor BB-83698. *J Antimicrob Chemother*. **53**, 664-668.

Lyne P.D. 2002. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov Today*. **7**, 1047-1055.

Maithri M.K.J., Ann K., Ramy S., Michael D., Mathew T., Martin A.S., Tod P.H. 2000. Novel nonpeptidic inhibitors of peptide deformylase. *Arch Biochem Biophys*. **381**, 313-316.

Manuel C., Lucas C., Charlton L, Responsabilités dans le traitement des maladies infectieuses, [en ligne], <http://etab.acmontpellier.fr/0341386x/collegelotrentanel/file/enseignement/20072008/svt/MaldinfectieusesCCC.pdf>. (Consultez le 12 Mars 2015).

Maréchal Y. The Water Molecule in (Bio) Macromolecules. **In** : The hydrogen bond and the water molecule. 1st Edition. Elsevier Science& Technology, 2007, 249-275.

- Mason J.S., Good A.C., Martin E.J. 2001. 3-D pharmacophores in drug discovery. *Curr Pharm Des.* **7**, 567- 597.
- Meinzel T. 2000. Peptide deformylase of eukaryotic protists: a target for new antiparasitic agents. *Parasitol Today.* **16**, 165-168.
- Meinzel T., Blanquet S. 1993. Evidence that peptide deformylase and methionyltRNA (fMet) formyltransferase are encoded within the same operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **175**, 7737-7740.
- Meinzel T., Lazennec C., Blanquet S. 1995. Mapping of the active site zinc ligands of peptide deformylase. *J Mol Biol.* **254**, 175-183.
- Meinzel T., Lazennec C., Villoing S., Blanquet S. 1997. Structure-function relationships within the peptide deformylase family. Evidence for a conserved architecture of the active site involving three conserved motifs and a metal ion. *J Mol Biol.* **267**, 749–761.
- Meinzel T., Patiny L., Ragusa S., Blanquet S. 1999. Design and synthesis of substrate analogue inhibitors of peptide deformylase. *Biochemistry.* **38**, 4287–4295.
- Merzoug A., Mermoum S., Khaled S., Chikhi A., Bensegueni A., Boucherit H. 2015. Theoretical study of the interactions involved in the inhibition of *Staphylococcus aureus* peptide deformylase by GSK1322322 derivatives. *Journal Academica.* **5**, 16-29.
- Molteni V., He X., Nabakka J., Yang K., Kreusch A., Gordon P., Bursulaya B., Warner I., Shin T., Biorac T., Ryder N.S., Goldberg R., Doughty J., He Y. 2004. Identification of novel potent bicyclic peptide deformylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **14**, 1477-1481
- Muegge I., Oloff S. 2006. Advances in virtual screening. *Drug DiscovToday.* **3**, 405-411.
- Nakanishi I., Murata K., Nagata N., Kurono M., Kinoshita T., Yasue M., Miyazaki T., Takei Y., Nakamura S., Sakurai A., Iwamoto N., Nishiwaki K., Nakaniwa T., Sekiguchi Y., Hirasawa A., Tsujimoto G., Kitaura K. 2015. Identification of protein kinase CK2 inhibitors using solvent dipole ordering virtual screening. *Eur J Med Chem.* **96**, 396-404.
- Nguyen K.T., Mechanism, function and inhibition of peptide deformylase. Thèse de doctorat en philosophie, Columbus: Graduate School of The Ohio State University. École doctorale de l'Université d'Ohio State, 2005., 169p.

Nguyen K.T., Hu X., Colton C., Chakrabarti R., Zhu M.X., Pei D. 2003. Characterization of a human peptide deformylase: Implications for antibacterial drug design. *Biochemistry*. **42**, 9952–9958.

Nikolovska-Coleska Z., Xu L., Hu Z., Tomita Y., Li P., Roller P.P., Wang R., Fang X., Guo R., Zhang M., Lippman M.E., Yang D., Wang S. 2004. Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three dimensional structure database. *J Med Chem*. **47**, 2430-2440.

Novak K.M. Drug Facts and Comparisons. 56th edition. St. Louis, Missouri, Wolters Kluwer Health, 2002. 619 p.

O'Dwyer K., Hackel M., Hightower S., Hoban D., Bouchillon S., Qin D., Aubart K., Zalacain M., Butlera D. 2013. Comparative analysis of the antibacterial activity of a novel peptide deformylase inhibitor, GSK1322322. *Antimicrob Agents Chemother*. **57**, 2333–2342.

OMS, Community strategy against antimicrobial resistance and WHO global strategy for containment of antibiotic resistance, [en ligne], http://europa.eu/int/comm/health/ph/others/antimicrob_resist/. (Consultez le 15 October 2017).

OMS, 2015, Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens, [en ligne], <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/249548/1/9789242509762-fre.pdf>. (Consultez le 02 Février 2016).

OMS, 2017, Antibacterial agents in clinical development : an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis, [en ligne], http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/antibacterial_agents_clinical_development/en/ (Consultez le 25 Octobre 2017).

OMS, 2017, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, [en ligne], <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> (Consultez le 25 Octobre 2017).

Oprea T.I., Matter H. 2004. Integrating virtual screening in lead discovery. *Curr Opin Chem Biol*. **8**, 349-358.

Parmenopoulou V., Kantsadi A. L., Tsirkone V. G., Chatzileontiadou D. S. M., Manta S., Zographos S. E., Kollatos N., Archontis G., Agius L., Hayes J. M., Leonidas D. D., Komiotis D. 2014. Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase b. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel N-acyl- β -d-glucopyranosylamines. *Bioorg Med Chem.* **22**, 4810-4825.

Patrick B., Jean L., Michel S. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{er} édition. Paris : Médecine –Sciences Flammarion. 1988, 660 p.

Patrizia C., Lars N., Seema M., Anders H. 2004. Isoxazole-3- hydroxamic acid derivatives as peptide deformylase inhibitors and potential antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* **14**, 5997-6000.

PDB Current Holdings Breakdown. <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do> (consultez le 28/07/2017).

Peng H., Huang N., Qi J., Xie P., Xu C., Wang J., Wang C. 2003. Identification of novel inhibitors of BCRABL tyrosine kinase via virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett.* **13**, 3693-3699.

Petersen G.O., Saxena S., Renuka J., Soni V., Yogeewari P., Santos D.S., Bizarro C.V., Sriram D. 2015. Structure-based virtual screening as a tool for the identification of novel inhibitors against Mycobacterium tuberculosis 3- dehydroquinate dehydratase, *J Mol Graph Model.* **60**, 124-131.

Peng B., Zhang X., Cao F., Wang Y., Xu L., Cao L., Yang C., Li M., Uzan G., Zhang D.D. 2014. Peptide deformylase inhibitor actinonin reduces celastrol's HSP70 induction while synergizing proliferation inhibition in tumor cells. *BMC Cancer.* **14**, 146.

Poole K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**, 255-264.

Powers R.A., Morandi F., Shoichet B.K. 2002. Structure-based discovery of a novel, non covalent inhibitor of AmpC beta-lactamase. *Structure.* **10**, 1013-1023.

Protein Data Bank, <http://www.pdb.org>. (Consultez en Janvier 2014).

PubMed, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Consultez en Mars 2015).

- Punia P., Singh S., Raj T., Raguvaran R., Chopra M., Dahiya V. 2014. Docking based pharmacophore model for *Mycobacterium tuberculosis* peptide deformylase inhibitors and its application in drug designing. *Int J Pharm Pharm Sci.* **6**, 329-331.
- Ragusa S., Blanquet S., Meinnel T. 1998. Control of peptide deformylase activity by metal cations. *J Mol Biol.* **280**, 515-523.
- Ragusa S., Mouchet P., Lazennec C., Dive V., Meinnel T. 1999. Substrate recognition and selectivity of peptide deformylase. Similarities and differences with metzincins and thermolysin. *J Mol Biol.* **289**, 1445-1457.
- Rajagopalan P.T.R., Grimme S., Pei, D. 2000. Characterization of cobalt(II)-substituted peptide deformylase: Function of the metal ion and the catalytic residue Glu-133. *Biochemistry.* **39**, 779–790.
- Rajagopalan P.T.R., Pei D. 1998. Oxygen-mediated inactivation of peptide deformylase. *J Biol Chem.* **273**, 22305-22310.
- Rajagopalan P.T.R., Yu X.C., Pei, D. 1997. Peptide deformylase: a new type of mononuclear iron protein. *J Am Chem Soc.* **119**, 12418–12419.
- Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. 1996. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *J Mol Biol.* **261**, 470-489.
- Ren J.X., Qian H.L., Huang Y.X., Zhu N.Y., Si S.Y., Xie Y. 2015. Virtual screening for the identification of novel inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: Inhibitor targeting RmlB and RmlC. *Comput Biol Med.* **58**, 110-117.
- Rice L.B. 2006. Antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Am J Infect Control.* **34**, 11-19.
- Richard C., Kiredjian M., Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucelle, Bordetella.* 2^{ème} édition. Paris : Institut Pasteur. 1995, 319 p.
- Robert C.M. 2011. Discovering new antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents.* **37**, 2–9.

Ross J.E., Scangarella-Oman N.E., Miller L.A., Sader H.S., Jones R.N. 2011. Determination of disk diffusion and mic quality control ranges for GSK1322322, a novel peptide deformylase inhibitor. *J Clin Microbiol.* **49**, 3928–3930.

Rowe-Magnus D., Mazel D. The evolution of antibiotic resistance. **In** : Evolution of microbial pathogens. Washington: H.S. Seifert & V.J. Dirita Editions, 2006, 221–241.

Ryan K.J., Ray C.G. Sherris Medical Microbiology. 4th edition. McGraw Hill, 2004, 992 p.

Samal H.B., Das J.K., Mahapatra R.K., Suar M. 2015. Molecular modeling, simulation and virtual screening of MurD ligase protein from *Salmonella Typhimurium* LT2. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **73**, 34-41.

Sanjay K.V., Jat R.K., Narendra N., Rajkumar S., Vineet S., Sanjay P., Kuldeep B. 2011. A novel antibacterial target: peptide deformylase. *Pharmacophore.* **2**, 114-123.

Sarangi A.N., Lohani M., Aggarwa R. 2015. Proteome mining for drug target identification in *Listeria monocytogenes* EGD-e and structure based virtual screening of a candidate drug target penicillin binding protein 4. *J Microbiol Methods.* **111**, 9-18.

Serero A., Caractérisation des enzymes impliquées dans la voie d'excision de la première méthionine des protéines synthétisées dans les mitochondries et les plastes. Thèse de Doctorat en Biochimie – Biologie Moléculaire. France : université de Paris XI-Orsay, 2004, 164 p.

Shoichet B.K. 2004. Virtual screening of chemical libraries. *Nature.* **432**, 862-865.

Smith H.K., Beckett R.P., Clements J.M., Doel S., East S.P., Launchbury S.B., Pratt L.M., Spavold Z.M., Thomas W., Todd R.S., Whittaker, M. 2002. Structure-activity relationships of the peptide deformylase inhibitor BB-3497: modification of the metal binding group. *Bioorg Med Chem Lett.* **12**, 3595–3599.

Smith K.J., Petit C.M., Aubart K., Smyth M., Mcmanus E., Jones J., Fosberry A., Lewis C., Lonetto M., Christensen S.B. 2003. Structural variation and inhibitor binding in polypeptide deformylase from four different bacterial species. *Protein Sci.* **12**, 349–360.

Solbiati J., Chapman-Smith A., Miller J.L., Miller C.G., Cronan J.E. 1999. Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal. *J Mol Biol.* **290**, 607–614.

Stahura F.L., Bajorath J. 2004. Virtual screening methods that complement HTS. *Comb Chem.* **7**, 259-269.

Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale : médecine humaine et vétérinaire. 2011, 6^{ème} édition, 192 pages. [en ligne]. <http://www.sante.dz/aarn>. (Consultez le 15 Juin 2015).

Steven P., Rachel C., Martha E., Paul H., Jane S., Peter W.J. Microbiology of waterborne diseases. Elsevier Academic Press, 2004, 480 p.

Stoermer M.J. 2006. Current status of virtual screening as analysed by target class. *Me Chem.* **2**, 89-112.

Sylvain P., Yann D., Valery L., Carmela G., Carole L., Coralie S., Alexis D., Frederic D., Thierry M., Isabelle A. 2009. Structure activity relationship analysis of the peptide deformylase inhibitor 5-bromo-1H-indole-3-acetohydroxamic acid. *Chem Med Chem.* **4**, 261-275.

Thiriot E., Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. Thèse de Doctorat en Chimie Informatique et Théorique. France : Université Henri Poincaré – Nancy I, 2009, 287 p.

Todeschini R., Consonni V. Handbook of Molecular Descriptors. New York : Wiley-VCH. 2000, 667p.

Tuccinardi T. 2009. Docking-based virtual screening: recent developments. *Comb Chem High Throughput Screen.* **12**, 303-314.

Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug Candidates. *J Med Chem.* **45**, 2615-2623.

Vieth M., Hirst J.D., Kolinski A., Brooks C.L. 1998. Assessing energy functions for flexible docking. *J Comput Chem.* **19**, 1612-1622.

Walters W.P., Stahl M.T., Murcko M A. 1998. Virtual screening - an overview. *Drug Discov Today.* **3**, 160- 178.

Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A.M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S.F., Senger S., Tedesco G., Wall I.D., Woolven J.M., Peishoff E.C., Head M.S. 2006. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem.* **49**, 5912-5931.

Waszkowycz B., Perkins T.D.J., Sykes R.A., Li J. 2001. Large-scale virtual screening for discovering leads in the postgenomic era. *IBM Sys J.* **40**, 360-376.

Wataru T., Yoshihisa S., Yusuke S., Emi N., Shuhei F., Kanako S., Jun I. 2003. Synthesis and PDF inhibitory activities of novel benzothiazolylidene hydroxamic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* **13**, 3273-3276.

Wei S., Haikun M., Yuejiao D., Kelly A., Yuhong F., Rimma Z., Liping Y., Wenhao H. 2011. Design, synthesis and antibacterial activity of 3-methylenepyrrolidine formyl hydroxyamino derivatives as novel peptide deformylase inhibitors. *Bioorg. Med Chem Lett.* **21**, 1060-1063.

Wei S., Yuejiao D., Yu Q., Ming L., Liping Y., Wenhao H. 2010. Design, synthesis and antibacterial activity of 2,5-dihydropyrrole formyl hydroxyamino derivatives as novel peptide deformylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **20**, 3592-3595.

Wei Y., Yi T., Huntington K.M., Chaudhury C., Pei D. 2000. Identification of potent peptide deformylase inhibitors from a rationally designed combinatorial library. *J Comb Chem.* **2**, 650-657.

Wenzel R.P., Edmond M.B. 2000. Managing antibiotic resistance. *N Engl J Med.* **343**, 1961-1963.

Wise R., Andrews J.M., Ashby J. 2002. In vitro activities of peptide deformylase inhibitors against Gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**, 1117-1118,

Yaoming W., Tian Y., Kristi M.H., Chaity C., Dehua P. 2000. Identification of a potent peptide deformylase inhibitor from a rationally designed combinatorial library. *J Comb Chem.* **2**, 650-657.

Yoo J.S., Zheng C.J., Lee S., Kwak J.H., Kim W.G. 2006. Macrolactin N, a new peptide deformylase inhibitor produced by *Bacillus subtilis*. *Bioorgan Med Chem.* **16**, 4889-4892.

Yuan Z., Trias J., White R.J. 2001. Deformylase as a novel antibacterial target. *Drug Discov Today.* **6**, 954-961.

Yuriev E., Agostino M., Ramsland P.A. 2011. Challenges and advances in computational docking. *J Mol Recognit.* **24**, 149-164

Yves P., Elisabetta L., Hongliang Z., Christophe M. 2010. DNA Topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology.* **17**, 421–33.

Zega A. 2005. Azapeptides as pharmacological agents. *Curr Med Chem.* **12**, 589-597.

Zhi-wang Z., Wei-Chao L., Yu H., Bin W., Gang R., Li-Hua F. 2013. Synthesis of the intermediate for fumimycin: a natural peptide deformylase inhibitor. *Res Chem Intermediat* **39**, 3049-3054.

ZINC database. <http://zinc.docking.org/>. (Consultez en 2014).

Annexe. Énergies prédites (kJ/mol) des 1671 composés sélectionnés avec différentes PDFs bactériennes

Compound	2AIE	3U7K	2A18	1S17	2OS1
GSK1322322	-23.2952	-31.8904	-26.6049	-21.7993	-23.2557
ZINC00000012	-29.6482	-31.0287	-20.7649	-28.6765	-27.2392
ZINC 00000381	-20.4993	-17.6685	-15.1236	-16.3359	-17.6884
ZINC 00000463	-11.7092	-13.3646	-19.3027	-18.3107	-14.9734
ZINC 00000710	-11.0424	-16.8312	-15.9703	-19.3864	-14.2115
ZINC 00000996	-13.5491	-12.1869	-12.6226	-18.4386	-17.9305
ZINC 00001008	-19.6121	-14.9204	-16.1523	-18.0922	-26.6705
ZINC 00004067	-16.4708	-15.0468	-17.7118	-17.4162	-15.7330
ZINC00004223	-23.6443	-28.1389	-29.3888	-28.8948	-23.7059
ZINC00004337	-18.2517	-22.2956	-16.3845	-19.7899	-23.9870
ZINC 00004356	-16.6382	-20.5860	-16.8444	-19.4518	-20.0492
ZINC 00004823	-12.7484	-13.3038	-13.3146	-11.2587	-15.4898
ZINC 00004888	-18.5808	-23.2157	-13.1076	-19.1216	-16.2319
ZINC00009129	-23.4529	-19.5643	-24.8333	-25.1007	-22.7479
ZINC00010359	-21.9127	-31.1638	-23.6731	-20.6699	-23.9942
ZINC00011022	-21.0369	-21.0782	-27.4632	-21.5984	-20.1974
ZINC00015683	-26.6300	-25.0101	-27.7809	-28.0223	-23.9050
ZINC00018577	-22.6892	-23.2420	-24.8378	-23.8141	-24.7259
ZINC00026458	-22.5697	-24.1216	-23.0833	-27.2656	-24.6001
ZINC00032876	-21.7995	-28.4020	-22.5655	-23.6906	-29.4895
ZINC00032879	-21.7057	-26.6471	-23.7016	-24.4603	-28.6547
ZINC00033163	-15.0673	-20.1176	-17.9153	-25.2420	-16.4483
ZINC00033597	-22.8101	-24.0998	-18.4645	-23.7314	-21.5888
ZINC00033598	-22.8446	-25.4924	-20.5725	-22.6744	-21.3816
ZINC00033599	-21.4819	-27.0082	-20.2493	-24.3971	-21.4331
ZINC00033600	-21.4473	-25.6750	-23.2219	-24.1549	-21.2760
ZINC00037900	-15.6417	-20.7751	-17.5585	-19.0202	-18.3797
ZINC00039047	-22.8545	-30.4422	-24.0316	-20.6439	-29.5294
ZINC00039223	-18.7273	-23.6721	-21.1111	-22.9098	-18.9013
ZINC00039226	-18.2810	-18.1778	-22.3031	-23.0213	-21.3709
ZINC00039424	-16.9591	-16.2632	-16.5292	-11.3845	-19.9399
ZINC00039650	-27.5980	-26.7776	-26.4851	-28.6427	-31.0492
ZINC00039687	-17.1257	-17.0617	-14.8660	-14.2209	-18.3950
ZINC00039704	-17.2001	-19.4899	-18.7425	-17.9234	-19.6704
ZINC00040159	-16.2603	-16.2132	-12.9522	-13.5970	-15.8595
ZINC00040600	-12.4286	-19.9741	-13.6530	-16.8978	-14.8221
ZINC00040601	-10.6695	-12.7300	-13.0312	-15.9353	-14.7432
ZINC00040608	-14.8288	-13.7696	-16.2432	-17.7943	-15.9553
ZINC00040609	-14.2283	-13.0357	-14.5355	-15.6250	-14.7812
ZINC00040943	-12.7250	-11.9715	-14.1538	-17.1387	-12.9898
ZINC00040944	-14.6624	-12.0469	-17.2030	-16.8560	-15.9981
ZINC00041310	-17.1391	-18.8693	-17.4212	-14.5779	-15.9001
ZINC00041395	-17.2048	-19.2873	-22.7165	-19.2711	-14.6009
ZINC00042125	-18.9012	-16.1543	-19.0343	-16.8759	-19.0367
ZINC00042126	-16.4155	-20.7791	-16.7050	-18.4802	-16.3501
ZINC00045237	-20.3192	-26.3187	-19.2406	-17.8155	-16.9158
ZINC00047416	-15.5511	-22.8904	-14.5171	-20.3731	-16.5570
ZINC00047417	-11.7578	-18.3376	-15.5621	-28.8323	-22.2084
ZINC00047418	-10.5920	-14.7258	-14.3204	-20.0743	-16.2233
ZINC00050560	-18.3103	-23.5775	-17.4877	-19.2738	-24.8060
ZINC00050649	-10.7891	-15.5137	-14.1967	-12.4573	-18.4911
ZINC00050650	-9.7726	-18.7506	-18.4272	-19.7889	-17.9740
ZINC00051436	-15.7395	-20.5065	-18.6949	-20.6246	-18.0160

ZINC00051520	-12.4027	-13.4575	-14.5341	-13.5332	-13.6162
ZINC00051944	-15.2481	-17.2421	-18.6922	-19.5531	-17.8776
ZINC00051945	-12.4250	-14.6902	-19.8746	-22.9305	-17.7047
ZINC00052390	-17.6214	-21.2195	-17.9176	-16.7605	-21.5802
ZINC00052392	-16.5733	-23.3133	-13.8140	-18.1863	-20.2720
ZINC00053572	-27.7325	-26.6504	-26.4501	-23.5692	-24.8841
ZINC00053573	-28.5090	-25.4317	-25.5336	-22.6438	-22.3673
ZINC00053695	-22.8298	-28.7927	-25.9086	-23.9306	-29.4076
ZINC00053696	-23.8653	-24.9195	-25.6338	-25.2281	-28.0476
ZINC00053697	-22.3858	-24.7342	-23.1897	-24.9002	-27.3979
ZINC00053698	-23.2373	-28.6741	-23.4911	-24.8801	-28.9079
ZINC00053699	-20.6700	-26.4822	-25.6515	-22.0027	-22.8813
ZINC00053700	-23.8893	-25.7522	-24.2242	-24.8601	-25.9291
ZINC00053701	-21.2591	-22.5196	-27.0773	-28.7031	-22.4221
ZINC00053702	-20.2457	-23.7128	-22.1013	-21.1790	-23.1063
ZINC00057053	-8.8805	-16.9872	-16.8292	-15.7145	-13.6384
ZINC00057054	-10.0300	-17.5764	-12.1999	-15.8468	-14.2529
ZINC00057484	-24.6117	-24.3079	-17.9988	-23.7322	-21.9208
ZINC00057487	-23.8715	-20.8433	-17.4757	-15.8150	-18.5945
ZINC00057539	-22.2408	-21.0509	-20.0311	-20.2566	-19.4746
ZINC00060620	-17.0114	-19.4882	-19.2734	-21.3701	-18.6477
ZINC00060622	-18.6499	-21.3870	-16.4872	-23.5465	-17.8820
ZINC00062079	-20.7550	-16.6601	-16.1161	-16.1354	-19.1172
ZINC00063750	-22.9634	-25.5793	-17.2642	-18.4905	-16.9164
ZINC00063753	-21.6770	-217498	-16.1700	-16.1088	-19.3846
ZINC00070522	-16.8451	-20.5453	-19.0260	-26.3779	-17.0135
ZINC00071419	-20.7475	-23.4157	-21.5615	-22.8159	-20.7572
ZINC00073321	-16.0557	-16.0480	-19.2726	-20.9495	-16.8060
ZINC00075844	-6.3540	-5.4999	-2.5935	-1.2783	-7.2944
ZINC00075848	-8.2907	-8.7816	-4.1882	-12.0645	-2.9283
ZINC00077859	-19.1974	-20.1315	-15.5773	-23.5116	-21.6921
ZINC00078331	-13.6434	13.3224	-13.5276	-16.1078	-15.5568
ZINC00078600	-21.5685	-20.5896	-21.0972	-24.6377	-21.5631
ZINC00078604	-21.9264	-20.4972	-19.7196	-22.2041	-21.0668
ZINC00078609	-19.5830	-21.6719	-23.9104	-27.3800	-21.2976
ZINC00078612	-18.8046	-22.3004	-20.9837	-24.5325	-20.4816
ZINC00079902	-21.7017	-25.2999	-19.5067	-17.7437	-21.0917
ZINC00079907	-23.5666	-24.3666	-21.8677	-16.6969	-23.6351
ZINC00079915	-16.7227	-28.9321	-20.0338	-18.0414	-16.8383
ZINC00079918	-18.8052	-18.3117	-22.4145	-15.7021	-19.2386
ZINC00079925	-20.6853	-26.0524	-20.4562	-21.2420	-19.4922
ZINC00079928	-23.6401	-27.9473	-18.1254	-20.8498	-23.2122
ZINC00079934	-19.1809	-18.6147	-15.3113	-16.3898	-14.8149
ZINC00079935	-17.8030	-17.5899	-16.0280	-17.9407	-22.9599
ZINC00079936	-15.6682	-21.8530	-14.3733	-17.5448	-16.9033
ZINC00079939	-17.4068	-17.2722	-17.0001	-15.5522	-17.6167
ZINC00079945	-19.2232	-30.0814	-21.8045	-24.6386	-29.0633
ZINC00079951	-23.8122	-27.2999	-26.0773	-23.4758	-27.3423
ZINC00081745	-17.7568	-17.7260	-16.3899	-16.9903	-16.7806
ZINC00081746	-20.9581	-17.9127	-17.8057	-20.2682	-16.6988
ZINC00081750	-16.7544	-16.2936	-21.3566	-21.2360	-15.5495
ZINC00081751	-15.0738	-16.9896	-19.6045	-18.3543	-17.4701
ZINC00081756	-19.6053	-16.8669	-19.4565	-20.2121	-18.9794
ZINC00081757	-18.4088	-16.7030	-20.3687	-22.8589	-20.9795
ZINC00081761	-19.5822	-18.2269	-22.1058	-19.5093	-18.3837
ZINC00081764	-14.4180	-18.1045	-21.4880	-18.1685	-18.4422
ZINC00082976	-23.0431	-20.8662	-19.3457	-22.9194	-23.3693
ZINC00084002	-22.1608	-27.9101	-26.3413	-23.7267	-18.7250

ZINC00084050	-15.6680	-17.2876	-22.4529	-22.5633	-16.6064
ZINC00084864	-20.9921	-28.0111	-28.8190	-22.4846	-26.6489
ZINC00084869	-22.5908	-27.9474	-28.6511	-24.4084	-22.1645
ZINC00084874	-26.9342	-22.8084	-26.8903	-24.6119	-25.3123
ZINC00086090	-24.3553	-24.4825	-22.7610	-23.0301	-21.9247
ZINC00086093	-24.3516	-22.2292	-22.9426	-24.1765	-21.5107
ZINC00086095	-18.8881	-24.7166	-23.3992	-25.8375	-24.7123
ZINC00086098	-18.3404	-21.0012	-26.0542	-19.8933	-22.8935
ZINC00087949	-23.9869	-30.0930	-24.1904	-21.8200	-29.3230
ZINC00087954	-25.6734	-22.8418	-25.1332	-24.4991	-26.0387
ZINC00087956	-22.2864	-22.6932	-25.0145	-21.5416	-28.5317
ZINC00089144	-18.6796	-23.0272	-16.2970	-17.7882	-18.4187
ZINC00089147	-15.9568	-23.5202	-19.7340	-15.6811	-19.0354
ZINC00089149	-19.5633	-18.8899	-21.4708	-26.1007	-18.0947
ZINC00093515	-24.2569	-28.2798	-25.6670	-23.4006	-26.3442
ZINC00093521	-24.9927	-27.7312	-25.8716	-24.9789	-29.0392
ZINC00093534	-26.1853	-24.7258	-24.7406	-24.4716	-28.8737
ZINC00093541	-25.9204	-28.3940	-26.2062	-24.5444	-29.0030
ZINC00096313	-27.2761	-27.1813	-26.2123	-28.5245	-25.2654
ZINC00096973	-18.7589	-23.6452	-19.6421	-21.3886	-21.7726
ZINC00096989	-15.9017	-16.4059	-16.1673	-20.4974	-16.7438
ZINC00097016	-18.9680	-21.2887	-20.5638	-25.5245	-19.6293
ZINC00097588	-18.7850	-24.5456	-21.0826	-20.0793	-20.6378
ZINC00098179	-22.0796	-17.1314	-18.1786	-16.6731	-20.0237
ZINC00099313	-20.6368	-25.9752	-21.6908	-19.5237	-26.7043
ZINC00112230	-14.5851	-16.4041	-15.9542	-14.4619	-17.1131
ZINC00112232	-14.1164	-17.9280	-14.5669	-16.5564	-15.4632
ZINC00114139	-19.7577	-24.7278	-18.6624	-19.3757	-19.2102
ZINC00114150	-15.4164	-21.0012	-20.1554	-21.7402	-21.1810
ZINC00114154	-21.5909	-20.7458	-24.7187	-16.1696	-21.2552
ZINC00114814	-21.2963	-28.5757	-24.2672	-23.0812	-24.6087
ZINC00114879	-19.1288	-19.6713	-22.6685	-19.3343	-20.3967
ZINC00116823	-13.3032	-15.7263	-15.3765	-16.5054	-13.8263
ZINC00116836	-15.9424	-18.3326	-18.4528	-20.6200	-16.6113
ZINC00120281	-17.7930	-18.4651	-21.5429	-13.8125	-21.7967
ZINC00120307	-22.7469	-26.9127	-24.1073	-21.1575	-27.7869
ZINC00122412	-24.0261	-23.1355	-23.9421	-22.2178	-20.7088
ZINC00126407	-28.6770	-31.2996	-26.6786	-32.9272	-30.6362
ZINC00128884	-18.6910	-14.6208	-16.9411	-26.9918	-21.1282
ZINC00129390	-18.0759	-13.7333	-16.1479	-15.8469	-19.0409
ZINC00130669	-15.0362	-19.0839	-16.9177	-17.9711	-19.5597
ZINC00132809	-18.5854	-15.1407	-20.3102	-19.0841	-15.3799
ZINC00133431	-23.3759	-26.5399	-26.3991	-27.2341	-25.8363
ZINC00133644	-20.6076	-21.2898	-18.9074	-25.6969	-22.9381
ZINC00134618	-19.2028	-21.4380	-22.3346	-22.3883	-22.4601
ZINC00134622	-20.3413	-22.8258	-16.2471	-27.1148	-19.3595
ZINC00135789	-11.3011	-18.1071	-12.0953	-18.6147	-17.1747
ZINC00136260	-20.8547	-23.9458	-21.1118	-21.9180	-18.3729
ZINC00136305	-20.2929	-23.6600	-19.4783	-20.5430	-18.0963
ZINC00137801	-22.1606	-25.4301	-25.7035	-21.4881	-22.9991
ZINC00138717	-26.7099	-30.4260	-25.1632	-26.1329	-24.5507
ZINC00138961	-19.6246	-23.5022	-17.9740	-25.5694	-23.6186
ZINC00141694	-15.4443	-18.2002	-16.4348	-19.5541	-18.2517
ZINC00150973	-19.0844	-22.9058	-26.8761	-28.5813	-21.3005
ZINC00150977	-24.7082	-23.8769	-23.0049	-24.4811	-21.7906
ZINC00153395	-14.5356	-12.7732	-15.2188	-10.8042	-14.6245
ZINC00154918	-12.1198	-12.4386	-7.0869	-16.4506	-13.5334
ZINC00155424	-13.0981	-17.4749	-10.4189	-10.9534	-12.8812

ZINC00155937	-9.0340	-11.9258	-17.6004	-11.1911	-11.7733
ZINC00156024	-15.5289	-15.3016	-15.9885	-19.9020	-17.2761
ZINC00156070	-14.8197	-22.2549	-19.1948	-18.7440	-18.6517
ZINC00156777	-11.7560	-14.4825	-15.3642	-16.9890	-13.4956
ZINC00156805	-17.5515	-20.5569	-17.8635	-20.1806	-19.4513
ZINC00160893	-13.4703	-16.2337	-14.7795	-16.5192	-14.6976
ZINC00160896	-17.0943	-18.8182	-18.2936	-16.7204	-20.2415
ZINC00160897	-13.8897	-18.3744	-12.3113	-9.6573	-17.4122
ZINC00160898	-13.8331	-19.8916	-18.5041	-18.0797	-19.8431
ZINC00160900	-13.6986	-13.1234	-17.3947	-18.1877	-14.5430
ZINC00160960	-21.2967	-26.0226	-20.9578	-16.0064	-21.0822
ZINC00160961	-16.5676	-24.8455	-18.6342	-16.0931	-19.8350
ZINC00160962	-16.0719	-21.3238	-23.0273	-19.3864	-21.3303
ZINC00161805	-20.5173	-27.1651	-23.6494	-20.9128	-21.7121
ZINC00162589	-20.2221	-20.7016	-22.2477	-19.2263	-19.9666
ZINC00162595	-17.4499	-23.2104	-17.5096	-17.2849	-16.9556
ZINC00162966	-27.3023	-30.0906	-27.8499	-24.3264	-30.4427
ZINC00162976	-27.3527	-29.5821	-26.3754	-24.9984	-25.0712
ZINC00162979	-26.7422	-31.1300	-27.4461	-27.9988	-27.8743
ZINC00164361	-14.3268	-13.2307	-14.4171	-16.6819	-13.8760
ZINC00166241	-17.8627	-16.0595	-17.4229	-23.6783	-18.9374
ZINC00166439	-14.4804	-21.6641	-20.4061	-25.9365	-20.8015
ZINC00167847	-11.6585	-15.6859	-12.5806	-17.3160	-16.2377
ZINC00169061	-23.3891	-22.6976	-27.8161	-27.4530	-27.3302
ZINC00169064	-23.1503	-25.0361	-28.6415	-24.4095	-25.6555
ZINC00169306	-24.8681	-29.7417	-26.7687	-27.6905	-24.7558
ZINC00169627	-24.4183	-29.5652	-21.6755	-24.4182	-19.6986
ZINC00169629	-24.9757	-30.1674	-22.2699	-23.6133	-24.2948
ZINC00169929	-12.4675	-13.1610	-15.2016	-11.8176	-20.9551
ZINC00169989	-25.1522	-28.9702	-23.5961	-23.4613	-28.4836
ZINC00170019	-15.5631	-13.2464	-13.4848	-13.2915	-15.1153
ZINC00170198	-12.3263	-17.4987	-12.6244	-18.3915	-16.5215
ZINC00171261	-20.4636	-26.3041	-19.9302	-21.1826	-18.3681
ZINC00180114	-15.9134	-17.4401	-13.8831	-17.6871	-17.8163
ZINC00184188	-19.6664	-17.6577	-15.7141	-23.0180	-18.6149
ZINC00187456	-22.3508	-30.0626	-23.1242	-21.7751	-25.6947
ZINC00188196	-13.8132	-18.0324	-14.8944	-14.6885	-14.8948
ZINC00188387	-20.1016	-16.0908	-22.4381	-17.7224	-16.5369
ZINC00188389	-16.6581	-22.6475	-18.2978	-16.8980	-16.8377
ZINC00188882	-17.2402	-22.0546	-18.6080	-23.7976	-17.6679
ZINC00193272	-24.1830	-20.1496	-20.0552	-21.7317	-18.6069
ZINC00194075	-12.2579	-15.4782	-13.0450	-21.2266	-17.4272
ZINC00194792	-14.4460	-14.3835	-17.5511	-18.9874	-16.6146
ZINC00194796	-13.5054	-13.9098	-16.2855	-16.9307	-16.3260
ZINC00195954	-25.1390	-25.9923	-26.2535	-24.3724	-21.1368
ZINC00195957	-26.4256	-20.4286	-22.1318	-19.3286	-19.4035
ZINC00196092	-22.1175	-28.5412	-22.5069	-20.5223	-20.9297
ZINC00196109	-15.5073	-21.7380	-12.2033	-15.0129	-13.9144
ZINC00196115	-18.2402	-15.3972	-12.7224	-16.4440	-16.9443
ZINC00196122	-15.7532	-18.9900	-11.3406	-12.7091	-14.0954
ZINC00196126	-19.0749	-15.7262	-12.2376	-11.7086	-16.5730
ZINC00196129	-14.2432	-16.1729	-12.7725	-18.5572	-14.5159
ZINC00196131	-8.3941	-9.0954	-0.7111	-10.0915	-10.4597
ZINC00196134	-15.0595	-16.7727	-10.1688	-20.8411	-15.8725
ZINC00196136	-14.6020	-17.9732	-13.7117	-19.8277	-15.6663
ZINC00197839	-14.8791	-15.5091	-16.2628	-20.2118	-16.9128
ZINC00197841	-14.6769	-15.5888	-16.6959	-18.8526	-15.6182
ZINC00204059	-32.4418	-35.7764	-32.2572	-31.8719	-28.4354

ZINC00204445	-22.8495	-21.1625	-18.2789	-14.1922	-16.6804
ZINC00204448	-16.5857	-24.4404	-21.8666	-18.0199	-22.6454
ZINC00204590	-16.7531	-17.1770	-19.7587	-20.1972	-20.3445
ZINC00204592	-13.9691	-26.9910	-21.4888	-19.4860	-22.6258
ZINC00204668	-22.9176	-27.4675	-15.2899	-25.1397	-22.1381
ZINC00204671	-20.8954	-25.2618	-17.9508	-21.7049	-26.3593
ZINC00205489	-11.7401	-11.6256	-14.6397	-12.5819	-28.4108
ZINC00206900	-9.4377	-20.1615	-7.5872	-12.1622	-14.3633
ZINC00206907	-11.4697	-14.8482	-7.2762	-11.6376	-17.1687
ZINC00208286	-26.3300	-31.8595	-26.9909	-28.2447	-28.9642
ZINC00212973	-13.1171	-16.3867	-14.8837	-15.2871	-13.9261
ZINC00212975	-17.5157	-25.1592	-21.1386	-16.9955	-20.7331
ZINC00212979	-22.4712	-16.1207	-20.5306	-18.2496	-16.4056
ZINC00212983	-16.1983	-22.5842	-20.1935	-16.1959	-18.2455
ZINC00213001	-20.1956	-16.0660	-21.5582	-17.7253	-15.9787
ZINC00213007	-16.5386	-22.6895	-18.2080	-16.8474	-15.9973
ZINC00213011	-24.3309	-25.9787	-19.1687	-21.2296	-20.4035
ZINC00213014	-10.6218	-15.7523	-15.9635	-21.1054	-22.7650
ZINC00213018	-11.6381	-15.7744	-15.4148	-18.0554	-22.6782
ZINC00213098	-16.6124	-19.1713	-19.4572	-17.8213	-18.3994
ZINC00213102	-17.2094	-15.7825	-19.5116	-23.1036	-16.2929
ZINC00213925	-19.0828	-17.3990	-10.9318	-13.1255	-15.3937
ZINC00213931	-17.1146	-15.1001	12.1273	-11.4693	-17.5318
ZINC00227896	-17.9340	-22.8095	-22.7731	-20.9613	-21.2574
ZINC00243316	-11.4026	-18.0838	-10.8437	-17.8433	-18.6776
ZINC00244149	-17.5270	-19.5076	-15.1756	-12.9144	-19.9400
ZINC00244154	-13.4520	-18.7750	-13.9225	-13.5880	-14.5800
ZINC00247030	-24.2489	-26.2165	-26.6482	-24.9102	-22.0736
ZINC00251314	-15.7107	-18.6513	-18.3354	-18.5261	-16.3889
ZINC00257229	-12.3825	-17.4852	-23.0821	-19.2272	-24.5754
ZINC00257233	-15.7669	-16.0691	-20.7357	-18.9032	-20.0765
ZINC00257952	-12.1973	-17.0018	-16.5519	-17.6765	-21.8086
ZINC00257953	-13.9956	-25.6111	-19.2835	-20.7310	-19.0484
ZINC00257957	-11.7640	-17.4178	-14.5154	-12.8636	-19.9053
ZINC00257959	-11.7503	-16.5627	-17.2169	-21.2384	-14.7367
ZINC00260866	-15.9147	-14.0579	-19.5238	-17.2927	-14.1390
ZINC00262386	-16.2855	-21.3903	-9.0930	-12.5614	-20.9267
ZINC00262387	-19.0286	-21.1250	-19.8938	-17.5189	-20.7962
ZINC00264912	-9.9146	-13.0070	-8.6727	-9.5835	-13.9908
ZINC00264917	-7.6638	-11.5323	-9.6992	-11.4567	-11.8753
ZINC00265617	-20.3676	-27.0156	-20.4583	-21.0647	-19.9986
ZINC00267946	-19.5661	-24.7870	-23.7191	-21.0691	-22.6816
ZINC00268751	-24.7347	-28.3658	-20.9473	-22.8496	-20.4511
ZINC00268755	-19.2247	-28.4734	-21.3190	-23.5671	-22.9212
ZINC00268756	-20.3367	-21.5531	-21.7991	-24.0101	-21.0217
ZINC00268757	-18.1282	-19.5395	-20.4460	-21.7445	-24.0005
ZINC00269030	-19.8750	-18.6763	-20.4482	-22.4769	-24.1144
ZINC00269031	-20.1464	-19.7503	-18.4871	-21.2120	-20.8811
ZINC00275270	-22.7652	-23.5302	-22.3874	-23.1183	-23.7387
ZINC00275272	-22.2773	-22.0970	-21.8166	-20.7745	-20.0061
ZINC00276121	-14.6374	-12.650	-13.7023	-19.0591	-15.9804
ZINC00280090	-17.5739	-16.0340	-14.1032	-14.6204	-16.5326
ZINC00281711	-18.4307	-18.8519	-19.3674	-19.5657	-19.1055
ZINC00282331	-15.9790	-20.9684	-11.1169	-15.5660	-16.6650
ZINC00282335	-19.1649	-20.2188	-16.2355	-20.5880	-16.3610
ZINC00283822	-22.7752	-24.8992	-23.5056	-20.7361	-22.6700
ZINC00293931	-16.5641	-21.8098	-17.8171	-18.3772	-15.4297
ZINC00295646	-17.5981	-18.9262	-18.6208	-16.1052	-17.8592

ZINC00296169	-19.7595	-22.0353	-21.1853	-20.0290	-20.9002
ZINC00296171	-20.6853	-20.7860	-19.8862	-19.9402	-20.6289
ZINC00296665	-12.5707	-16.2024	-12.0569	-9.9249	-11.3288
ZINC00296668	-13.2593	-16.3684	-21.8140	-9.8148	-15.5461
ZINC00296672	-13.3658	-13.9081	-11.4187	-10.9356	-12.2613
ZINC00296759	-18.0463	-24.3606	-22.2748	-21.3232	-26.2053
ZINC00302981	-11.6418	-15.7109	-13.3706	-13.1082	-16.4481
ZINC00302982	-13.7098	-20.6216	-15.7579	-14.2838	-15.3647
ZINC00307844	-20.8518	-28.3763	-21.2785	-23.4744	-26.1146
ZINC00307965	-23.8549	-24.2595	-26.0760	-25.0970	-20.8169
ZINC00315120	-16.0019	-20.1387	-22.7641	-24.7115	-20.2807
ZINC00315121	-23.2385	-29.5690	-29.4278	-24.3441	-29.0728
ZINC00321315	-25.3125	-25.0504	-26.0876	-24.2446	-22.2111
ZINC00322790	-18.0249	-26.3679	-21.3413	-19.0229	-19.8195
ZINC00332044	-25.5402	-22.2593	-30.5671	-26.1574	-29.0991
ZINC00335854	-22.9337	-28.1964	-29.7107	-22.2783	-28.1958
ZINC00337834	-5.2733	-10.6410	-4.6566	-13.9055	-9.8799
ZINC00340343	-17.4492	-20.8151	-21.3759	-20.5986	-18.0178
ZINC00340468	-17.8679	-20.5065	-18.7658	-16.7038	-17.8603
ZINC00342360	-14.9088	-23.3224	-18.5100	-18.0355	-19.8496
ZINC00342361	-23.6864	-18.0067	-18.6000	-24.0994	-16.7192
ZINC00344344	-32.0422	-29.7140	-30.8880	-27.4118	-29.9632
ZINC00349008	-14.4526	-20.3811	-19.7104	-23.1824	-16.9315
ZINC00354162	-13.8165	-17.0790	-10.4908	-12.9809	-16.0235
ZINC00354166	-10.4550	-18.3427	-9.4255	-14.9480	-17.4820
ZINC00361166	-15.9518	-18.8461	-11.6143	-20.7068	-19.7434
ZINC00361171	-21.4557	-18.8857	-12.1531	-15.7029	-19.8876
ZINC00361173	-11.7721	-17.8000	-11.5181	-11.9192	-16.2241
ZINC00361180	-11.0565	-16.6660	-7.8503	-14.8689	-12.1120
ZINC00363872	-15.7795	-17.6164	-16.9938	-13.9316	-18.7154
ZINC00363874	-12.6763	-15.7940	-8.6441	-15.7446	-15.3412
ZINC00365045	-18.8378	-22.0423	-22.7810	-23.5670	-19.4926
ZINC00365049	-21.4123	-24.1329	-22.4253	-22.2463	-21.9513
ZINC00354162	-13.8165	-17.0790	-10.4908	-12.9809	-16.0235
ZINC00354166	-10.4550	-18.3427	-9.4255	-14.9480	-17.4820
ZINC00361166	-15.9518	-18.8461	-11.6143	-20.7068	-19.7434
ZINC00361171	-21.4557	-18.8857	-12.1531	-15.7029	-19.8876
ZINC00361173	-11.7721	-17.8000	-11.5181	-11.9192	-16.2241
ZINC00361180	-11.0565	-16.6660	-7.8503	-14.8689	-12.1120
ZINC00363872	-15.7795	-17.6164	-16.9938	-13.9316	-18.7154
ZINC00363874	-12.6763	-15.7940	-8.6441	-15.7446	-15.3412
ZINC00354162	-13.8165	-17.0790	-10.4908	-12.9809	-16.0235
ZINC00354166	-10.4550	-18.3427	-9.4255	-14.9480	-17.4820
ZINC00361166	-15.9518	-18.8461	-11.6143	-20.7068	-19.7434
ZINC00374361	-23.9323	-26.7876	-18.3407	-20.5259	-19.1705
ZINC00374649	-14.8996	-12.6307	-10.6901	-11.8929	-16.8180
ZINC00374652	-15.5920	-15.5023	-12.6825	-12.6399	-16.3292
ZINC00374659	-19.4594	-16.8952	-16.8161	-16.6813	-14.1421
ZINC00374661	-18.4505	-17.8194	-11.3827	-11.9201	-15.6302
ZINC00374682	-15.9492	-22.8117	-13.3469	-20.4750	-14.2161
ZINC00374685	-16.7240	-16.0604	-15.9766	-13.3976	-20.5545
ZINC00374719	-22.0122	-28.1686	-17.1363	-19.2727	-18.3703
ZINC00374722	-22.2736	-20.7802	-15.7575	-17.9891	-21.0637
ZINC00374743	-24.8390	-27.0639	-22.0414	-17.2327	-21.6391
ZINC00374744	-18.9474	-26.1103	-28.3556	-17.6711	-24.8121
ZINC00374745	-15.3849	-11.9150	-12.2370	-14.0316	-10.5236
ZINC00374748	-16.3522	-12.3012	-12.2865	-10.7562	-18.5367
ZINC00374774	-11.0857	-21.4959	-11.5700	-12.7506	-14.3899

ZINC00374776	-23.3731	-21.1765	-12.4772	-13.0291	-17.5018
ZINC00374786	-22.5731	-25.5361	-15.0661	-17.8157	-20.8118
ZINC00374790	-17.7182	-15.7181	-13.6709	-14.6296	-17.7836
ZINC00374792	-18.1838	-20.4397	-20.5700	-23.4463	-22.9051
ZINC00374793	-16.2075	-20.9661	-18.0830	-23.4290	-24.8188
ZINC00374815	-23.0889	-26.1859	-16.1867	-18.7519	-23.1523
ZINC00374817	-22.4621	-21.8813	-16.2656	-17.4184	-21.6185
ZINC00374897	-15.2409	-20.2546	-14.7402	-17.7519	-17.2115
ZINC00374899	-21.6392	-16.2633	-15.2577	-14.8137	-18.5222
ZINC00374956	-22.0176	-19.7713	-17.6017	-14.7958	-16.5245
ZINC00374960	-17.0442	-16.6850	-15.2948	-18.9570	-19.6531
ZINC00375047	-13.5685	-23.0984	-13.7400	-17.1288	-17.7056
ZINC00375050	-14.1525	-16.6376	-16.2879	-13.0674	-16.3129
ZINC00375075	-13.5580	-24.0873	-18.6514	-13.9300	-18.4428
ZINC00375077	-17.2761	-25.4716	-22.1338	-19.2459	-22.4885
ZINC00388475	-16.5293	-14.7209	-13.4576	-16.8230	-14.5093
ZINC00388995	-15.2875	-17.8256	-20.5822	-13.4866	-15.7782
ZINC00389485	-19.4321	-23.7772	-19.8526	-19.7430	-17.9296
ZINC00389652	-13.6874	-16.4489	-19.0965	-18.8189	-15.7182
ZINC00389791	-9.7220	-10.3438	-11.6754	-13.7590	-11.8127
ZINC00389890	-13.8238	-14.0804	-11.0864	-14.4962	-12.6181
ZINC00389892	-13.4146	-14.0788	-13.0282	-15.6967	-13.2750
ZINC00391641	-7.6921	-13.1338	-3.9211	-12.1657	-11.9614
ZINC00391931	-16.2517	-18.8852	-13.7936	-16.9937	-15.4683
ZINC00391932	-12.0656	-13.0555	-8.7496	-16.4310	-13.8752
ZINC00392033	-20.7345	-20.6798	-22.8116	-16.9551	-21.3623
ZINC00392329	-15.7778	-19.0810	-13.4398	-18.8426	-14.1796
ZINC00392330	-16.8799	-19.4302	-21.5278	-15.1714	-16.4464
ZINC00393059	-15.4175	-22.5389	-15.9486	-17.2076	-16.6218
ZINC00395038	-17.2974	-20.2553	-18.7075	-19.5387	-19.8120
ZINC00395135	-23.9354	-30.1907	-21.7657	-21.3267	-21.6777
ZINC00395677	-14.4467	-21.6670	-21.3340	-20.9660	-21.2664
ZINC00396715	-20.4971	-24.6204	-21.4681	-20.5472	-21.0672
ZINC00396718	-21.8156	-26.3161	-22.9549	-21.6078	-21.6750
ZINC00396734	-26.2269	-28.0168	-25.4531	-23.6293	-21.6421
ZINC00396739	-23.9715	-30.2277	-21.9466	-20.8734	-21.6838
ZINC00396766	-26.0087	-24.0880	-23.5950	-21.5190	-23.7769
ZINC00396808	-23.6257	-26.1052	-24.3088	-21.3751	-21.3739
ZINC00396961	-14.8467	-16.7989	-17.9124	-14.1205	-14.9774
ZINC00398532	-21.6083	-31.2888	-22.9046	-23.0421	-23.3135
ZINC00398545	-24.5508	-26.2577	-25.5824	-24.1842	-23.0767
ZINC00399233	-20.6745	-20.9684	-21.0973	-17.3983	-21.9363
ZINC00399463	-17.0507	-18.5944	-14.0604	-16.0141	-17.2254
ZINC00399464	-18.0932	-21.1142	-17.4698	-16.1081	-16.2181
ZINC00400486	-13.8967	-15.2261	-16.7060	-13.9367	-13.8927
ZINC00400487	-15.7975	-14.8121	-18.1140	-14.8576	-15.3501
ZINC00400488	-13.1626	-14.3063	-20.3761	-15.4800	-15.1877
ZINC00400490	-14.6075	-14.5051	-17.8574	-13.3933	-13.1939
ZINC00400500	-14.0427	-15.5735	-20.1100	-15.6912	-14.9072
ZINC00400501	-13.7329	-16.5504	-16.7746	-17.8944	-16.1852
ZINC00400502	-13.6267	-14.6430	-19.3300	-17.6363	-15.6335
ZINC00400503	-14.0377	-17.0822	-18.1556	-15.9686	-19.3804
ZINC00400504	-13.9919	-13.1224	-17.4429	-13.6824	-12.8739
ZINC00400507	-13.7229	-14.7740	-18.1121	-15.5935	-15.8567
ZINC00401894	-14.1522	-13.8468	-16.6115	-19.4031	-13.0705
ZINC00401895	-15.0738	-19.1715	-21.5562	-17.7467	-16.8952
ZINC00402703	-15.3509	-20.3888	-17.4540	-17.0172	-15.1057
ZINC00402743	-19.9717	-21.2248	-19.8811	-21.3334	-21.5878

ZINC00403009	-21.0073	-28.0370	-20.5299	-21.4411	-18.6524
ZINC00403095	-20.0951	-26.5738	-21.5869	-20.5723	-19.9049
ZINC00403243	-13.8198	-18.4326	-17.1249	-18.0502	-13.9652
ZINC00403244	-15.2110	-17.9202	-16.8718	-16.5477	-12.2853
ZINC00403322	-15.6051	-18.6733	-14.8682	-17.6406	-14.1732
ZINC00403543	-16.2135	-19.8368	-17.0287	-17.0762	-15.6014
ZINC00403562	-22.9415	-30.2995	-22.6633	-24.6343	-23.2198
ZINC00404843	-12.5202	-14.6108	-11.0109	-15.0640	-12.1912
ZINC00404844	-10.0160	-16.1266	-14.5878	-14.2998	-12.9439
ZINC00404853	-12.6083	-20.0421	-13.1123	-15.9517	-14.9260
ZINC00405355	-27.0383	-29.0633	-26.3124	-24.9181	-24.7449
ZINC00406269	-13.6159	-14.3665	-12.2889	-16.3270	-15.0533
ZINC00406271	-10.1099	-13.0593	-11.1336	-12.7643	-11.7540
ZINC00406813	-6.1982	-6.7720	-8.1783	-10.3294	-8.6427
ZINC00407993	-19.6611	-15.6156	-18.8809	-22.1323	-21.0619
ZINC00408022	-14.5655	-15.8197	-13.9072	-17.3499	-15.3247
ZINC00431966	-16.5715	-12.6508	-5.3895	-16.5917	-10.5705
ZINC00436367	-20.2716	-26.6524	-21.6565	-23.6822	-20.6864
ZINC00436574	-20.0951	-17.9729	-18.2554	-17.8107	-21.8445
ZINC00444803	-26.3132	-29.2079	-29.1932	-26.0477	-24.7688
ZINC00444843	-24.8609	-26.2311	-20.7253	-19.5157	-24.6560
ZINC00444844	-20.0342	-26.4471	-26.5363	-21.1924	-23.5730
ZINC00445000	-13.6218	-10.1764	-5.9518	-9.4175	-8.7567
ZINC00445005	-24.0101	-28.8404	-25.5506	-26.4429	-27.6854
ZINC00445006	-25.3707	-28.9376	-26.0017	-25.5313	-24.3726
ZINC00450280	-21.2245	-27.4522	-16.6961	-17.1823	-16.5935
ZINC00452640	-14.2025	-12.7928	-13.3373	-13.6676	-14.3368
ZINC00452648	-12.4353	-14.7694	-9.2985	-10.1224	-13.7454
ZINC00457072	-14.9507	-14.2996	-9.1589	-15.0366	-14.0013
ZINC00466763	-21.4203	-27.3433	-24.7586	-25.9194	-27.2558
ZINC00450280	-21.2245	-27.4522	-16.6961	-17.1823	-16.5935
ZINC00452640	-14.2025	-12.7928	-13.3373	-13.6676	-14.3368
ZINC00452648	-12.4353	-14.7694	-9.2985	-10.1224	-13.7454
ZINC00457072	-14.9507	-14.2996	-9.1589	-15.0366	-14.0013
ZINC00450280	-21.2245	-27.4522	-16.6961	-17.1823	-16.5935
ZINC00452640	-14.2025	-12.7928	-13.3373	-13.6676	-14.3368
ZINC00452648	-12.4353	-14.7694	-9.2985	-10.1224	-13.7454
ZINC00457072	-14.9507	-14.2996	-9.1589	-15.0366	-14.0013
ZINC00450280	-21.2245	-27.4522	-16.6961	-17.1823	-16.5935
ZINC00452640	-14.2025	-12.7928	-13.3373	-13.6676	-14.3368
ZINC00452648	-12.4353	-14.7694	-9.2985	-10.1224	-13.7454
ZINC00457072	-14.9507	-14.2996	-9.1589	-15.0366	-14.0013
ZINC00450280	-21.2245	-27.4522	-16.6961	-17.1823	-16.5935
ZINC00452640	-14.2025	-12.7928	-13.3373	-13.6676	-14.3368
ZINC00500969	-29.3124	-28.3234	-30.8043	-26.8256	-28.9592
ZINC00450280	-21.2245	-27.4522	-16.6961	-17.1823	-16.5935
ZINC00452640	-14.2025	-12.7928	-13.3373	-13.6676	-14.3368
ZINC00452648	-12.4353	-14.7694	-9.2985	-10.1224	-13.7454
ZINC00507434	-24.0443	-17.7123	-21.2024	-23.1374	-23.5295
ZINC00519078	-19.7404	-23.0219	-21.7850	-21.5515	-20.2354
ZINC00519079	-19.5314	-22.3723	-25.1421	-14.1601	-20.0503
ZINC00527738	-19.0658	-26.0717	-15.2965	-14.0726	-16.0323
ZINC00532285	-22.2658	-20.0633	-24.8264	-21.2509	-22.8388
ZINC00532286	-16.1060	-18.5826	-20.5077	-18.5887	-17.0760
ZINC00533102	-18.9700	-18.4455	-23.0075	-21.1833	-20.0251
ZINC00533103	-11.9910	-16.1287	-19.1795	-19.2306	-15.3483
ZINC00533286	-21.9020	-18.8475	-23.5191	-21.0927	-20.5754
ZINC00533287	-14.3461	-16.1933	-21.1119	-19.6483	-15.2621

ZINC00543653	-17.0219	-22.3178	-16.8268	-22.6171	-22.6933
ZINC00546931	-10.9109	-15.2429	-11.3927	-14.3947	-15.1672
ZINC00546932	-6.8451	-17.8738	-7.5123	-12.8548	-15.5217
ZINC00549419	-6.5929	-18.0822	-6.2492	-12.6499	-15.9269
ZINC00549420	-10.2996	-13.9533	-10.9290	-13.2898	-15.4410
ZINC00570998	-20.4464	-22.9577	-18.1340	-23.5229	-21.8215
ZINC00580328	-14.6842	-17.8470	-10.3009	-12.8164	-15.8666
ZINC00543342	-17.7482	-18.0487	-20.7481	-14.1002	-16.3760
ZINC00586164	-13.8631	-12.1953	-12.8722	-18.0514	-21.2312
ZINC00598479	-21.2583	-26.0078	-14.6401	-20.1968	-22.6532
ZINC00600699	-9.2044	-12.2942	-11.0110	-9.5706	-9.1189
ZINC00607214	-20.4160	-20.5841	-19.2062	-17.4685	-22.8376
ZINC00608008	-19.5369	-22.2769	-19.2203	-23.6842	-27.9093
ZINC00615331	-19.3327	-21.9808	-20.0301	-21.6166	-17.0105
ZINC00615332	-15.8539	-27.6764	-23.5413	-23.0244	-19.2373
ZINC00615333	-19.8961	-18.9253	-16.9697	-16.2876	-13.9372
ZINC00619883	-15.4541	-18.9303	-16.0467	-21.4626	-19.4669
ZINC00619956	-23.6140	-30.2827	-29.6416	-23.3437	-28.3796
ZINC00620127	-14.4851	-17.3897	-17.9911	-24.1525	-15.6319
ZINC00620274	-19.2363	-18.3290	-16.9231	-15.7971	-18.7076
ZINC00620452	-23.6094	-18.6902	-25.3784	-25.5376	-23.7403
ZINC00621185	-16.3387	-17.1511	-18.3743	-17.7486	-19.2104
ZINC00638168	-13.6180	-14.1628	-8.9596	-9.8843	-16.1811
ZINC00641304	-15.4853	-14.7579	-11.9290	-15.0646	-19.5896
ZINC00641305	-13.3037	-13.0535	-19.5876	-10.4026	-16.3219
ZINC00641307	-15.0059	-11.5291	-17.6990	-12.7318	-15.7910
ZINC00641308	-8.8387	-13.8979	-16.7687	-13.4961	-16.3792
ZINC00641883	-18.9947	-20.5538	-20.9298	-13.6669	-21.1186
ZINC00650551	-19.9705	-25.0911	-22.9520	-13.3667	-17.2182
ZINC00650552	-19.0536	-19.2030	-18.7682	-15.7881	-24.3750
ZINC00650590	-19.3147	-22.5547	-20.6424	-16.5150	-18.7118
ZINC00650591	-20.4776	-18.2445	-18.6658	-14.6831	-17.9804
ZINC00651342	-15.7744	-26.3227	-15.2137	-8.7473	-15.4264
ZINC00651344	-16.9553	-16.0979	-14.8976	-14.9532	-21.9438
ZINC00651709	-22.2392	-30.5179	-24.0422	-23.1121	-23.9727
ZINC00651712	-27.6738	-29.4810	-20.9353	-22.0147	-25.9423
ZINC00653743	-22.9256	-28.2591	-12.5746	-25.3574	-27.7216
ZINC00653745	-20.4419	-30.5709	-17.9704	-22.7134	-27.7057
ZINC00653780	-15.3900	-15.8098	-15.9068	-5.0384	-18.1951
ZINC00653783	-11.8856	-20.3325	-12.6437	-11.5412	-17.1036
ZINC00653917	-20.5017	-25.7941	-15.7006	-12.5159	-16.2482
ZINC00653919	-17.0407	-21.1824	-15.0452	-10.2007	-17.9445
ZINC00654234	-11.7362	-24.0552	-15.4937	-12.1829	-15.7415
ZINC00654240	-17.5141	-19.5032	-17.9746	-8.7148	-18.8732
ZINC00655429	-16.5114	-25.9199	-19.0083	-12.6664	-17.4479
ZINC00655432	-21.3831	-16.8870	-16.6913	-10.6269	-17.9110
ZINC00655438	-11.5635	-16.4167	-9.7726	-0.0725	-15.6840
ZINC00655612	-20.8144	-28.1752	-23.3632	-18.7395	-21.9806
ZINC00704982	-12.5257	-19.6758	-14.7864	-16.7943	-18.7948
ZINC00704983	-13.0773	-18.9293	-19.6092	-20.8938	-19.3043
ZINC00705328	-18.1444	-22.8923	-18.8501	-22.1180	-23.6204
ZINC00708789	-22.7921	-19.8233	-23.5141	-26.6996	-23.5535
ZINC00708790	-23.2994	-20.3324	-23.6793	-26.1701	-24.2822
ZINC00708791	-23.7691	-21.1975	-25.4775	-25.0553	-24.6617
ZINC00708792	-23.2387	-19.3603	-22.2222	-25.0740	-22.7761
ZINC00709994	-15.0942	-17.3204	-19.9766	-19.9203	-19.5179
ZINC00709995	-16.8385	-25.0396	-16.3518	-19.5383	-19.1647
ZINC00709996	-16.9522	-20.0291	-25.0147	-22.8636	-18.4224

ZINC00709997	-20.7656	-23.1414	-25.1906	-21.0388	-18.7747
ZINC00709998	-20.3692	-19.7623	-18.2425	-20.7401	-24.1830
ZINC00709999	-20.0031	-20.4874	-19.5046	-18.1535	-21.1040
ZINC00710000	-22.3958	-20.9243	-19.5003	-20.2883	-22.7060
ZINC00710001	-21.5634	-18.4476	-19.9646	-25.0380	-22.6905
ZINC00710002	-16.7218	-24.6721	-26.7180	-20.3222	-22.5782
ZINC00710003	-22.7332	-21.2575	-24.4576	-18.8399	-22.8732
ZINC00710004	-16.1921	-22.8369	-23.4863	-21.4024	-23.1104
ZINC00710005	-20.0635	-23.2555	-26.2259	-25.4589	-19.8932
ZINC00710006	-14.7170	-18.4308	-20.9560	-15.1837	-18.2559
ZINC00710007	-16.8153	-19.5287	-16.1765	-18.0703	-16.4311
ZINC00710008	-14.8959	-17.8232	-25.2050	-21.0856	-18.7621
ZINC00710009	-18.6051	-17.4067	-14.8538	-15.5878	-15.9958
ZINC00710011	-19.0812	-25.9025	-23.9571	-24.4424	-21.7946
ZINC00710012	-17.9919	-20.5712	-25.1367	-24.7027	-22.8858
ZINC00710014	-17.1638	-23.4490	-19.5243	-21.0927	-21.1370
ZINC00710015	-18.1949	-28.8260	-23.6019	-21.5701	-19.8757
ZINC00710016	-17.5668	-22.1729	-22.6304	-18.3570	-18.3894
ZINC00710017	-23.7107	-22.6318	-16.0806	-18.6551	-21.8145
ZINC00710018	-21.5662	-23.1334	-23.8489	-16.8495	-27.6469
ZINC00710019	-25.9163	-30.7930	-24.9109	-21.6743	-29.9608
ZINC00710020	-20.9171	-23.1760	-25.4437	-23.5219	-24.6195
ZINC00710021	-25.5531	-23.2948	-20.9245	-19.9088	-24.1747
ZINC00710022	-12.0494	-15.7332	-16.1892	-17.6981	-15.9147
ZINC00710434	-2.8854	-15.8450	-9.0372	-11.9075	-14.0863
ZINC00710435	-3.4234	-17.6675	-13.7599	-12.5412	-14.8937
ZINC00710436	-10.0808	-19.5076	-10.6905	-19.7913	-21.3610
ZINC00711765	-13.7078	-13.2467	-2.7250	-7.1543	-11.2770
ZINC00711768	-7.4443	-17.1763	-8.9460	-11.1227	-12.9389
ZINC00719003	-25.6498	-28.6571	-20.5395	-21.5668	-27.5791
ZINC00719004	-22.8362	-28.3210	-21.9072	-22.9928	-28.3416
ZINC00719005	-21.9871	-25.1760	-22.5408	-24.6386	-26.4465
ZINC00719006	-21.6831	-25.3654	-20.6542	-25.5199	-26.9885
ZINC00720387	-27.6143	-26.0330	-23.9271	-24.0398	-25.9047
ZINC00720388	-24.3983	-30.3818	-25.4105	-27.3546	-28.6744
ZINC00720389	-27.2662	-28.7101	-23.7456	-27.3905	-28.1322
ZINC00723563	-21.0286	-25.0999	-19.7298	-18.6989	-21.6267
ZINC00728356	-15.2449	-12.7736	-9.8850	-3.9243	-22.1510
ZINC00799130	-20.8196	-21.1761	-12.9239	-21.4287	-20.1418
ZINC00799131	-16.2777	-16.3975	-16.6275	-19.6760	-16.9482
ZINC00799132	-10.6209	-18.8531	-13.0947	-15.3447	-19.9428
ZINC00828419	-25.6737	-23.4686	-26.4104	-14.2934	-21.0431
ZINC00863095	-8.9051	-15.4475	-11.3966	-6.5234	-13.8518
ZINC00850723	-13.8028	-13.9229	-10.6182	-11.3399	-14.5720
ZINC00850724	-10.2659	-19.6379	-12.4309	-21.5351	-13.1417
ZINC00850725	-8.3048	-17.1709	-10.6381	-15.2597	-18.2125
ZINC00850727	-10.0260	-15.3579	-9.4220	-11.9830	-14.5917
ZINC00850728	-15.5304	-14.8603	-12.3447	-11.7156	-18.5033
ZINC00850729	-2.2156	-14.7154	-5.2633	-11.3752	-12.2085
ZINC00850730	-11.7874	-14.9935	-8.6104	-10.0091	-13.4231
ZINC00850731	-4.7565	-14.6111	-4.5714	-9.9869	-9.9987
ZINC00850732	-6.4546	-11.2497	-5.0087	-5.7925	-9.5291
ZINC00850736	-6.3547	-17.4691	-3.7960	-6.1123	-10.5060
ZINC00850739	-10.6638	-19.3940	-5.9652	-9.8625	-14.7940
ZINC00850741	-15.0651	-17.1007	-10.7684	-8.6127	-12.9021
ZINC00850742	-12.7441	-18.0128	-10.7498	-3.7739	-14.5826
ZINC00863152	-6.4661	-10.0486	-2.1383	-5.3753	-7.5858
ZINC00863153	-6.5330	-18.9325	-10.7564	-3.9571	-17.2583

ZINC00865057	-4.2426	-14.6340	-8.7642	-8.2677	-11.5986
ZINC00900693	-14.5796	-13.4914	-16.5578	-18.0633	-15.1495
ZINC00900696	-14.4867	-21.7193	-16.3617	-18.0804	-14.3169
ZINC00900785	-12.9768	-11.7587	-9.9717	-13.1082	-13.3856
ZINC00973664	-13.0792	-13.6078	-11.5027	-12.9464	-17.1656
ZINC00973665	-11.0784	-14.7565	-8.6055	-12.7400	-13.0629
ZINC00980079	-18.6031	-18.2226	-16.4925	-20.3408	-15.5799
ZINC00980080	-19.3067	-17.1820	-20.1345	-24.0909	-19.7269
ZINC00983981	-17.0433	-17.1783	-21.4266	-18.5061	-15.3809
ZINC00985023	-9.6255	-10.3234	-5.0093	-5.5264	-13.3241
ZINC00988139	-21.2132	-16.6919	-14.4484	-17.6573	-19.3223
ZINC00988140	-18.9913	-18.6039	-14.1091	-16.4663	-18.7912
ZINC00988210	-16.9272	-19.7663	-20.8447	-21.0782	-20.8361
ZINC00988211	-18.6409	-19.0174	-19.3689	-23.0957	-19.4406
ZINC00983981	-17.0433	-17.1783	-21.4266	-18.5061	-15.3809
ZINC00985023	-9.6255	-10.3234	-5.0093	-5.5264	-13.3241
ZINC00988139	-21.2132	-16.6919	-14.4484	-17.6573	-19.3223
ZINC00988140	-18.9913	-18.6039	-14.1091	-16.4663	-18.7912
ZINC00988210	-16.9272	-19.7663	-20.8447	-21.0782	-20.8361
ZINC00983981	-17.0433	-17.1783	-21.4266	-18.5061	-15.3809
ZINC00985023	-9.6255	-10.3234	-5.0093	-5.5264	-13.3241
ZINC00988139	-21.2132	-16.6919	-14.4484	-17.6573	-19.3223
ZINC00988140	-18.9913	-18.6039	-14.1091	-16.4663	-18.7912
ZINC00988210	-16.9272	-19.7663	-20.8447	-21.0782	-20.8361
ZINC01025504	-18.4313	-25.4449	-25.8339	-23.4126	-22.8983
ZINC01025505	-22.9984	-24.1806	-24.3129	-23.5722	-20.5072
ZINC00983981	-17.0433	-17.1783	-21.4266	-18.5061	-15.3809
ZINC00985023	-9.6255	-10.3234	-5.0093	-5.5264	-13.3241
ZINC00988139	-21.2132	-16.6919	-14.4484	-17.6573	-19.3223
ZINC00988140	-18.9913	-18.6039	-14.1091	-16.4663	-18.7912
ZINC00988210	-16.9272	-19.7663	-20.8447	-21.0782	-20.8361
ZINC00983981	-17.0433	-17.1783	-21.4266	-18.5061	-15.3809
ZINC00985023	-9.6255	-10.3234	-5.0093	-5.5264	-13.3241
ZINC00988139	-21.2132	-16.6919	-14.4484	-17.6573	-19.3223
ZINC01027085	-18.9885	-20.8669	-26.0010	-23.8121	-23.0811
ZINC01027088	-17.7221	-25.8153	-23.6501	-22.4180	-22.6166
ZINC01027090	-18.9269	-21.6366	-28.2943	-24.2087	-23.1693
ZINC01027093	-24.3795	-22.5018	-26.4882	-25.6594	-22.0379
ZINC01030555	-16.5384	-16.9543	-13.2082	-11.9979	-15.4689
ZINC01030560	-10.9974	-14.1752	-1.3918	-10.6181	-15.4515
ZINC01030562	-7.7873	-15.0413	-8.1188	-6.4121	-17.3343
ZINC01030933	-21.4124	-30.0100	-26.6427	-20.9859	-29.3299
ZINC01036358	-20.3741	-20.4949	-25.7796	-18.9021	-21.6527
ZINC01038244	-20.5142	-26.6070	-19.2130	-21.6190	-22.7055
ZINC01038245	-25.1378	-24.9604	-19.5512	-24.9852	-26.5329
ZINC01038272	-23.1162	-26.3891	-24.2733	-25.0692	-20.4197
ZINC01038273	-19.6792	-26.2144	-20.5228	-21.3092	-23.5235
ZINC01038274	-20.6182	-27.2134	-21.4606	-21.6607	-26.6514
ZINC01038275	-21.7582	-26.8672	-22.5566	-25.6160	-24.1669
ZINC01038852	-23.1735	-23.0112	-17.3112	-22.8857	-19.6100
ZINC01038853	-17.8647	-20.7182	-22.1382	-26.8244	-20.0742
ZINC01039283	-24.6387	-22.4917	-22.2117	-21.1381	-19.7559
ZINC01040591	-27.4447	-30.8735	-30.2435	-28.3226	-26.5584
ZINC01042671	-23.8724	-22.4803	-27.3626	-26.9764	-25.7065
ZINC01042672	-23.7468	-26.7771	-28.0278	-26.1404	-26.3733
ZINC01042725	-19.9355	-25.9244	-19.3612	-20.5657	-22.5871
ZINC01048120	-18.3662	-23.5721	-22.3401	-20.2662	-22.4272
ZINC01048653	-20.2375	-21.6913	-18.2261	-15.4632	-19.7579

ZINC01048663	-16.6800	-23.9037	-19.8011	-19.6986	-20.1659
ZINC01048665	-21.3199	-24.3492	-28.0193	-19.3420	-26.0111
ZINC01048674	-15.6030	-16.6286	-16.0828	-16.5602	-16.5284
ZINC01048675	-18.1011	-26.3184	-17.4631	-21.6546	-21.1681
ZINC01048676	-21.0228	-20.3654	-21.0121	-11.4218	-24.8201
ZINC01048677	-21.7810	-25.4313	-19.8258	-21.3126	-21.9582
ZINC01048679	-21.5438	-28.2494	-19.7928	-27.9218	-25.1558
ZINC01048681	-21.3901	-23.9544	-17.6650	-19.3373	-20.3285
ZINC01048682	-18.0928	-19.8078	-14.9930	-17.6303	-19.2744
ZINC01048757	-15.6140	-25.7216	-15.6403	-17.2294	-20.3706
ZINC01054998	-21.9088	-19.8010	-16.8733	-24.8395	-18.8148
ZINC01055005	-15.1277	-22.5052	-15.5441	-27.3555	-21.5658
ZINC01055010	-14.9645	-15.8131	-12.7064	-12.5723	-20.3257
ZINC01055016	-12.6328	-16.5622	-13.5752	-15.3745	-18.1880
ZINC01055024	-15.5823	-19.8251	-15.9326	-14.6255	-16.8791
ZINC01055029	-8.0418	-23.4069	-12.8068	-15.6928	-18.9487
ZINC01055037	-17.7756	-14.7187	-8.0928	-8.9872	-11.1477
ZINC01055045	-12.0941	-18.2336	-16.2437	-19.4695	-21.6815
ZINC01055065	-15.9036	-22.8050	-13.7602	-26.9094	-21.1781
ZINC01055218	-10.4266	-14.8537	-11.8475	-11.4492	-20.8656
ZINC01055224	-13.9855	-15.5344	-12.8819	-18.5197	-15.9864
ZINC01058754	-22.0266	-25.8905	-24.6613	-25.1894	-25.5121
ZINC01060282	-19.9895	-30.3003	-23.1691	-23.2984	-27.7513
ZINC01061818	-9.7250	-18.3293	-17.0387	-16.6686	-16.7136
ZINC01061824	-9.5940	-19.7163	-18.0718	-25.2168	-21.8792
ZINC01066357	-20.7545	-22.3970	-18.8306	-16.2441	-19.9745
ZINC01066359	-14.5847	-16.6967	-14.6078	-20.4144	-20.2839
ZINC01066360	-20.4520	-21.7686	-16.3757	-21.3821	-20.1369
ZINC01066362	-15.5797	-20.0545	-18.7765	-23.1791	-19.6639
ZINC01071400	-16.6462	-29.8117	-20.3856	-22.4949	-19.0730
ZINC01072369	-16.2354	-16.6118	-22.9193	-13.7823	-16.2070
ZINC01075122	-19.8541	-27.3378	-15.9168	-16.1569	-18.3196
ZINC01078866	-10.1918	-23.9852	-17.0098	-21.0739	-18.9014
ZINC01078868	-10.9626	-16.2693	-17.8168	-18.9523	-22.8221
ZINC01081557	-20.0445	-25.0270	-24.2106	-23.2241	-19.9745
ZINC01083113	-15.9453	-17.5223	-15.4379	-17.6495	-21.1167
ZINC01083114	-13.0132	-15.5426	-18.6055	-20.4799	-18.6394
ZINC01101499	-16.6147	-18.0213	-21.2645	-21.1173	-21.0263
ZINC01101500	-15.8213	-19.0536	-21.8321	-21.7773	-19.4212
ZINC01101994	-27.9033	-30.8740	-25.9317	-30.7627	-24.6603
ZINC01111305	-4.3445	-21.8512	-12.3334	-11.5671	-22.1999
ZINC01112829	-23.6454	-30.0723	-26.3111	-24.1948	-25.8076
ZINC01115927	-21.0027	-19.9841	-18.3648	-21.1019	-21.6494
ZINC01147607	-26.5730	-29.7515	-21.7813	-20.2621	-28.4470
ZINC01147608	-26.9876	-25.9042	-19.6168	-18.0990	-28.2534
ZINC01167725	-14.7542	-14.6710	-18.6223	-15.6461	-13.8518
ZINC01169722	-15.4327	-11.0488	-20.3971	-15.2455	-12.9972
ZINC01186119	-18.7924	-25.0611	-18.9254	-19.0738	-18.2547
ZINC01187537	-31.1087	-32.4642	-30.9474	-28.7659	-30.2911
ZINC01197896	-18.4075	-23.1245	-19.2233	-18.2348	-20.6106
ZINC01216906	-18.8582	-15.6596	-16.0875	-11.6475	-21.6502
ZINC01216840	-18.3025	-16.9987	-20.6663	-15.9854	-19.5746
ZINC01220271	-18.1085	-18.2714	-18.9439	-15.9102	-16.7046
ZINC01228862	-11.8843	-16.5605	-14.3407	-13.8859	-11.2233
ZINC01230163	-14.9351	-14.6294	-19.1227	-23.0341	-17.3695
ZINC01231909	-15.5686	-22.9660	-18.9215	-19.3681	-21.5909

ZINC01231910	-23.8143	-26.6060	-21.4423	-18.6277	-28.0498
ZINC01231968	-17.8041	-30.1811	-14.0450	-20.5428	-20.1244
ZINC01231969	-17.2564	-28.9819	-9.7611	-19.1697	-26.4077
ZINC01232421	-17.9323	-21.9798	-17.8442	-23.3958	-19.1541
ZINC01232549	-19.5746	-21.9818	-28.0029	-20.1746	-20.9240
ZINC01241711	-23.0561	-21.4161	-21.2215	-18.5514	-22.4617
ZINC01241713	-19.3504	-20.1901	-20.6366	-22.8607	-26.7315
ZINC01243769	-15.7996	-19.6566	-18.4649	-12.3674	-19.5681
ZINC01243771	-21.0533	-19.7229	-20.0801	-11.1284	-19.1992
ZINC01244650	-14.3512	-17.0513	-16.7759	-14.6031	-15.4989
ZINC01251682	-7.2881	-8.2049	-4.1347	-7.6541	-13.6224
ZINC01252927	-5.5033	-17.2408	-9.1603	-5.3551	-22.4622
ZINC01252928	-12.4968	-18.5112	-8.3854	-13.0151	-22.1749
ZINC01257628	-7.0056	-7.8984	-2.6078	-8.5702	-9.9039
ZINC01272981	-18.9393	-23.9793	-15.5017	-13.9274	-20.0184
ZINC01272982	-22.1996	-24.9502	-17.3750	-17.5134	-22.4532
ZINC01275507	-7.6839	-14.1818	-8.1709	-13.3720	-19.9725
ZINC01275508	-16.3569	-15.0169	-8.9783	-14.7642	-15.6825
ZINC01277703	-19.1812	-21.4060	-13.2713	-20.4483	-16.6049
ZINC01277704	-19.4406	-23.7725	-11.7208	-19.5927	-19.4067
ZINC01278391	-13.2616	-16.5463	-11.6197	-11.2522	-18.4967
ZINC01278762	-13.4816	-15.4848	-13.1539	-11.5087	-18.8270
ZINC01278763	-12.4897	-19.3660	-9.9234	-20.9049	-18.7548
ZINC01279108	-9.9764	-16.3829	-6.4389	-10.8284	-15.1887
ZINC01279109	-10.2543	-12.4083	-6.7010	-11.4581	-16.9404
ZINC01280545	-13.5408	-18.1221	-5.3837	-13.9449	-11.9392
ZINC01280546	-9.4982	-11.5488	-6.7461	-7.7703	-12.3523
ZINC01305588	-9.3825	-17.7384	-13.6029	-12.6354	-15.9472
ZINC01305590	-13.6425	-17.3557	-13.5654	-14.0873	-14.3922
ZINC01317994	-16.8341	-15.7962	-18.0398	-16.4879	-16.1930
ZINC01382576	-10.2455	-18.8416	-15.0522	-17.7695	-15.2766
ZINC01382598	-13.4569	-18.3268	-13.5879	-13.6593	-17.2531
ZINC01383920	-13.6029	-15.7636	-6.8750	-9.2654	-15.3837
ZINC01383923	-5.1291	-4.1151	-11.9697	-16.8373	-13.1784
ZINC01383949	-14.0221	-16.4025	-6.8763	-11.0913	-16.3460
ZINC01383952	-11.1737	-7.0020	-13.3720	-20.7672	-13.7494
ZINC01383964	-11.0623	-11.7829	-11.6168	-10.5134	-16.4734
ZINC01383966	-11.0698	-9.9009	-10.2957	-19.1494	-13.7834
ZINC01383967	-7.4654	-10.2948	-11.9853	-12.8508	-12.7220
ZINC01383970	-11.3122	-10.3684	-10.8187	-20.1904	-13.6586
ZINC01383971	-7.7392	-12.3144	-10.6766	-14.4633	-13.1873
ZINC01384839	-23.0535	-26.8544	-26.7206	-27.6159	-19.8024
ZINC01385401	-15.5089	-17.6007	-13.7097	-16.8048	-14.8270
ZINC01385449	-20.4253	-23.8374	-23.2237	-22.9455	-20.7558
ZINC01385608	-19.3762	-22.2946	-24.1364	-23.6346	-22.4469
ZINC01385609	-17.7221	-22.3061	-19.6636	-13.3032	-22.5924
ZINC01385825	-14.2721	-21.7175	-16.2762	-15.1800	-15.3684
ZINC01388017	-6.9053	-14.6423	-10.4262	-2.3716	-12.2304
ZINC01388022	-16.4691	-21.8537	-19.9450	-19.2957	-22.2312
ZINC01388030	-15.2830	-17.5508	-13.4002	-18.1365	-20.2051
ZINC01388031	-17.6363	-15.3537	-15.3412	-16.1987	-21.6057
ZINC01388414	-14.7500	-16.8969	-15.9902	-22.5784	-16.2108
ZINC01388415	-15.4221	-16.7969	-15.1842	-25.3000	-16.2246
ZINC01388463	-14.3652	-15.0836	-16.6267	-10.9842	-16.2483
ZINC01388693	-11.6876	-19.1955	-14.8032	-11.8230	-15.8111
ZINC01388694	-12.6300	-17.6447	-17.0684	-12.2985	-15.4052
ZINC01388695	-15.7497	-19.4019	-17.8528	-12.6410	-17.4394
ZINC01388696	-13.6506	-19.4896	-17.3954	-16.4460	-17.4959

ZINC01388963	-15.1186	-10.9961	-13.9741	-16.6088	-14.8101
ZINC01389434	-15.1671	-13.4399	-15.6049	-15.9501	-16.9250
ZINC01389926	-19.3274	-19.6432	-13.7474	-18.9282	-19.4231
ZINC01389927	-16.7705	-20.5666	-19.5548	-17.4819	-21.6482
ZINC01390733	-17.0239	-20.5898	-23.1781	-18.2769	-21.5094
ZINC01391252	-22.7334	-28.7347	-25.6603	-24.0590	-19.2131
ZINC01391548	-18.1425	-20.1556	-21.9673	-23.2083	-20.6784
ZINC01393250	-14.8412	-12.1501	-14.3315	-16.6233	-15.9188
ZINC01393372	-30.2228	-32.8282	-31.5692	-29.5150	-30.5342
ZINC01393456	-6.1252	-28.2951	-13.5691	-11.7288	-17.1241
ZINC01393457	-9.5233	-18.3386	-17.4149	-14.6540	-10.9536
ZINC01394435	-15.8707	-13.8845	-21.5727	-11.2824	-18.9259
ZINC01394436	-13.4146	-16.5650	-13.0281	-14.8334	-18.0939
ZINC01394437	-7.6448	-10.0932	-12.3644	-7.7833	-11.7333
ZINC01394438	-10.4351	-10.6779	-13.4315	-11.6078	-13.1803
ZINC01395528	-16.9727	-21.8027	-14.5919	-17.3223	-16.8414
ZINC01395530	-16.0512	-22.1145	-18.2073	-18.5214	-13.2316
ZINC01395531	-17.6010	-22.5077	-17.3997	-18.8784	-16.3728
ZINC01395532	-16.2280	-23.0531	-17.3935	-19.4687	-17.3419
ZINC01395533	-14.3887	-18.4751	-16.8279	-20.3325	-17.7204
ZINC01395534	-14.4224	-18.6391	-17.1151	-20.8086	-15.5484
ZINC01395706	-19.0850	-23.5622	-20.6680	-16.5526	-17.1799
ZINC01396437	-19.7801	-19.4324	-19.7905	-18.6658	-20.2585
ZINC01397142	-15.5877	-15.0135	-13.6560	-17.7984	-14.3922
ZINC01397148	-14.3783	-15.1264	-12.6239	-17.2740	-13.9585
ZINC01397319	-17.6538	-19.2399	-22.1623	-18.5635	-19.9252
ZINC01397320	-15.2012	-14.8937	-15.0889	-15.4447	-13.7729
ZINC01397321	-15.5753	-14.3254	-13.6962	-12.8999	-16.1483
ZINC01397322	-15.6671	-13.8998	-14.7038	-15.1426	-15.4476
ZINC01397323	-11.2434	-11.5025	-14.4136	-15.5605	-14.0709
ZINC01397332	-15.3971	-14.2220	-16.5635	-16.9837	-16.9117
ZINC01397333	-15.5233	-18.2944	-14.9808	-14.8343	-16.8359
ZINC01397341	-13.5169	-16.4363	-14.7164	-12.9898	-13.8843
ZINC01397452	-16.0397	-18.5371	-17.0755	-22.2726	-20.6277
ZINC01397453	-15.9403	-16.6173	-20.7836	-19.5246	-19.3976
ZINC01397454	-17.6884	-23.6281	-28.5683	-25.5573	-23.3694
ZINC01397455	-19.7740	-20.0831	-22.3386	-23.2715	-20.5524
ZINC01398065	-12.3869	-12.4358	-14.0371	-15.8637	-15.0217
ZINC01398289	-24.2875	-27.5144	-26.6511	-24.6146	-19.9315
ZINC01398290	-22.5650	-27.5823	-27.7373	-23.7588	-21.0193
ZINC01398291	-22.6957	-27.1685	-27.1169	-25.2736	-18.2417
ZINC01398292	-22.3798	-27.3282	-24.4042	-24.2233	-21.0918
ZINC01398331	-19.2992	-21.2372	-18.0185	-16.8217	-16.6748
ZINC01398720	-17.0436	-16.3690	-18.0368	-16.5761	-19.4882
ZINC01400251	-16.9925	-22.8195	-16.9560	-16.5419	-16.3525
ZINC01400423	-14.9988	-21.5123	-15.4609	-12.0045	-16.4552
ZINC01400455	-12.2874	-12.8235	-11.9069	-13.1553	-18.1618
ZINC01400586	-12.7360	-11.7850	-10.0345	-6.3483	-13.9515
ZINC01400753	-13.9740	-17.0016	-10.5018	-16.4419	-19.2007
ZINC01400755	-14.6538	-17.5340	-14.9794	-15.2482	-15.2511
ZINC01400756	-15.4698	-12.6840	-16.3675	-15.736	-15.5075
ZINC01401048	-15.4738	-17.7831	-14.7818	-19.0022	-16.0430
ZINC01401812	-13.0395	-12.1694	-10.5253	-14.5994	-15.3823
ZINC01401966	-23.0676	-28.0725	-26.8423	-25.6414	-17.4100
ZINC01403330	-28.8472	-30.1374	-29.1806	-29.2132	-32.5696
ZINC01406295	-17.5348	-18.2309	-18.6722	-21.9160	-16.5332
ZINC01406304	-12.3063	-14.2535	-12.0103	-14.5989	-13.6304
ZINC01406305	-11.2148	-12.1374	-14.1996	-9.0688	-16.0367

ZINC01406307	-19.0152	-18.0737	-19.3464	-25.0020	-18.6754
ZINC01406317	-10.3064	-14.0130	-13.1839	-11.9483	-13.7754
ZINC01406318	-10.3965	-16.3147	-14.4454	-10.5906	-15.9682
ZINC01427342	-13.4866	-16.0447	-16.8744	-17.5759	-18.1846
ZINC01428755	-25.64	-24.44	-23.5473	-28.1613	-28.7596
ZINC01428769	-30.38	-29.03	-31.6889	-30.1684	-29.7004
ZINC01430255	-24.36	-30.22	-24.9182	-28.4578	-27.2496
ZINC01430524	-22.04	-19.26	-18.2584	-22.1022	-21.2497
ZINC01430525	-21.47	-23.43	-15.0615	-27.8898	-20.6809
ZINC01432265	-23.62	-30.59	-29.2946	-23.1885	-21.1069
ZINC01434547	-19.11	-20.92	-17.34	-22.4314	-19.9940
ZINC01435558	-10.50	-21.39	-20.79	-22.0087	-18.0691
ZINC01435559	-16.3862	-23.0738	-17.7543	-17.6707	-21.4523
ZINC01437173	-14.3322	-18.5978	-18.9062	-13.2551	-17.7071
ZINC01439679	-24.7624	-30.0305	-30.4676	-23.9927	-27.2211
ZINC01439680	-27.1640	-27.7731	-27.9801	-26.4012	-28.2157
ZINC01445195	-18.0550	-15.7212	-7.2389	-7.5452	-13.2440
ZINC01445196	-9.7419	-13.0541	-6.0822	-6.3742	-18.1169
ZINC01445197	-12.2138	-19.1832	-12.0917	-18.0368	-20.0685
ZINC01445199	-15.6601	-16.5927	-17.9103	-19.7705	-18.7176
ZINC01445465	-19.1715	-18.7084	-12.5161	-13.3281	-20.0424
ZINC01445466	-8.4680	-20.3316	-19.1095	-9.6288	-17.5228
ZINC01445467	-14.0817	-17.0239	-13.1661	-8.1164	-22.7497
ZINC01445468	-13.2513	-18.9787	-14.8312	-15.6564	-17.8219
ZINC01446435	-19.6424	-15.8257	-14.6337	-17.1767	-16.4371
ZINC01446474	-24.7508	-28.5438	-24.8403	-24.0680	-20.9703
ZINC01455730	-24.8680	-26.8608	-26.6680	-26.9301	-28.1441
ZINC01455744	-23.9066	-26.0579	-26.9704	-26.5919	-30.9264
ZINC01481065	-10.4586	-17.9547	-5.0458	-11.5437	-10.5054
ZINC01482078	-23.6263	-22.2225	-21.6012	-27.8332	-25.0038
ZINC01482803	-12.8903	-13.8898	-14.6034	-17.7248	-12.9089
ZINC01493036	-22.3985	-24.2906	-23.6609	-23.0480	-17.4037
ZINC01494627	-26.3088	-28.4849	-26.4067	-25.0020	-29.4643
ZINC01495582	-16.7339	-17.5574	-18.5025	-24.8906	-18.8228
ZINC01495736	-18.4333	-15.5682	-19.8282	-19.7057	-19.1848
ZINC01495870	-18.4214	-25.4186	-26.7405	-26.9007	-23.6935
ZINC01495954	-14.1076	-22.3969	-17.1932	-15.9671	-17.9629
ZINC01496013	-18.9183	-20.9600	-21.6913	-24.4211	-22.2820
ZINC01496102	-18.0118	-21.7317	-22.6240	-22.0144	-19.9403
ZINC01496183	-10.8827	-11.3301	-10.4788	-14.0283	-11.6289
ZINC01496671	-22.4221	-24.7911	-25.2506	-21.1016	-23.5230
ZINC01498291	-14.6504	-18.0310	-6.4517	-13.7422	-15.1057
ZINC01498293	-14.5432	-18.5876	-18.1358	-15.8597	-16.2773
ZINC01498325	-11.0878	-21.9633	-11.9870	-8.8911	-14.3141
ZINC01498326	-14.0484	-20.7397	-9.9123	-12.5070	-14.7320
ZINC01501228	-15.3446	-19.5503	-22.8232	-18.5474	-13.8440
ZINC01501231	-14.3655	-14.6835	-19.7789	-20.9016	-16.6610
ZINC01501259	-11.7495	-18.6545	-13.5193	-18.1775	-15.7123
ZINC01502024	-17.0559	-14.7990	-14.8563	-17.5203	-17.2587
ZINC01504634	-11.6364	-17.3834	-10.7088	-14.7735	-16.6333
ZINC01504638	-9.1524	-17.5728	-7.8039	-15.1159	-17.4686
ZINC01507020	-16.2631	-17.5680	-14.7845	-17.6789	-16.0811
ZINC01507210	-14.7017	-13.7140	-15.9393	-19.9193	-17.0021
ZINC01507213	-10.1462	-10.1823	-5.8440	-8.2781	-10.4729
ZINC01507216	-7.0566	-10.8082	-4.3406	-5.3635	-9.7567
ZINC01508083	-15.5428	-17.8174	-9.2147	-16.5211	-20.1740
ZINC01508091	-13.7897	-22.0723	-14.2694	-18.4357	-17.9991
ZINC01510765	-6.9993	-16.3215	-5.7273	-8.0292	-9.6678

ZINC01510773	-9.7396	-12.8386	-7.5153	-10.3004	-10.7920
ZINC01513685	-11.5681	-18.4762	-13.7550	-16.2305	-15.9560
ZINC01513690	-11.0286	-19.1843	-9.0856	-13.9632	-16.7846
ZINC01513709	-14.6796	-15.5677	-2.2691	-19.1082	-12.1888
ZINC01514531	-7.3824	-22.3961	-14.2347	-20.8677	-18.4632
ZINC01514535	-15.2069	-14.2435	-12.0696	-13.4948	-17.8696
ZINC01514546	-6.1562	-13.5281	-2.2636	-1.3217	-6.2930
ZINC01514927	-15.1639	-19.7722	-19.5899	-9.3173	-16.2815
ZINC01543873	-23.8871	-24.9217	-23.4859	-28.4297	-21.1658
ZINC01544157	-30.9763	-29.8765	-20.6058	-20.4285	-26.8097
ZINC01555785	-12.6035	-26.5040	-15.8303	-17.2266	-14.6415
ZINC01561186	-16.8363	-13.4968	-16.8649	-15.5935	-19.8467
ZINC01562674	-13.0114	-19.7240	-15.5879	-16.1464	-18.0289
ZINC01563612	-10.4645	-12.6190	-15.1620	-13.2360	-10.6226
ZINC01563613	-17.7254	-12.2552	-14.6212	-11.1058	-10.8806
ZINC01563689	-20.8821	-30.7798	-22.7980	-24.0674	-23.0517
ZINC01563797	-21.9789	-18.9912	-15.8590	-20.8273	-18.9327
ZINC01567829	-16.9989	-16.7069	-15.9044	-18.7826	-16.1992
ZINC01570403	-15.8987	-16.7444	-17.2157	-17.8621	-16.9434
ZINC01570412	-20.7932	-25.1727	-16.8893	-20.6030	-22.2577
ZINC01570413	-21.4080	-24.9267	-27.6039	-23.8683	-24.9996
ZINC01571880	-18.4873	-25.0266	-24.7870	-20.5476	-20.3214
ZINC01572150	-14.6865	-19.4981	-21.5736	-20.3657	-24.1002
ZINC01574036	-15.6208	-15.9706	-15.1338	-19.3995	-16.9089
ZINC01574038	-21.1617	-23.8524	-20.6129	-23.9810	-27.4165
ZINC01574039	-16.7080	-14.0437	-9.8792	-17.0128	-20.7781
ZINC01576245	-15.7276	-14.9528	-19.6244	-17.4598	-14.9055
ZINC01576284	-14.3100	-15.4275	-12.7830	-14.8818	-13.5815
ZINC01576298	-16.4864	-16.4518	-14.6197	-10.4297	-12.1068
ZINC01576320	-17.5227	-18.3419	-17.7532	-18.3354	-16.4485
ZINC01576503	-23.3761	-21.1393	-19.7496	-21.3127	-18.1851
ZINC01576538	-25.1240	-24.7624	-14.4270	-20.9960	-23.7119
ZINC01576653	-15.2182	-20.1744	-10.5791	-22.9466	-15.8777
ZINC01578228	-16.0894	-25.3174	-18.1244	-19.9488	-21.1690
ZINC01578646	-22.3743	-24.5578	-29.5549	-27.0156	-19.9125
ZINC01578647	-25.9362	-25.5031	-22.7001	-20.6021	-23.9348
ZINC01579253	-12.4936	-17.2227	-14.0760	-14.0062	-11.9142
ZINC01579824	-17.0575	-16.0929	-10.7673	-16.3747	-12.8135
ZINC01582376	-17.7971	-17.7134	-13.5528	-14.6515	-16.6512
ZINC01582377	-13.8367	-19.0734	-16.6543	-13.2648	-12.3943
ZINC01582378	-16.1402	-20.6405	-17.4748	-16.6641	-15.1829
ZINC01582624	-13.7404	-13.1983	-13.9281	-13.9085	-11.9663
ZINC01585059	-18.9010	-21.9197	-18.2417	-21.5911	-18.5810
ZINC01585386	-27.2892	-31.9952	-22.6967	-25.6447	-25.2688
ZINC01588713	-17.4476	-11.9494	-13.5590	-10.0799	-16.3075
ZINC01588723	-18.3610	-15.0880	-18.0625	-17.7100	-15.0197
ZINC01590467	-8.8930	-13.0232	-14.2399	-13.5604	-10.1655
ZINC01590468	-11.3812	-15.1060	-15.3139	-14.3730	-12.5591
ZINC01590911	-19.8644	-24.0196	-21.3034	-20.2348	-23.3773
ZINC01596940	-20.3248	-25.4654	-19.9198	-20.6307	-21.9728
ZINC01607219	-22.7809	-26.6560	-25.9236	-24.9291	-19.9470
ZINC01608386	-21.4556	-27.2626	-28.6902	-22.1602	-26.4238
ZINC01608536	-16.8933	-20.2593	-21.3951	-19.4663	-20.0484
ZINC01608537	-17.1712	-18.7233	-18.2440	-21.1769	-17.4813
ZINC01608538	-16.7185	-20.1879	-23.1658	-21.3861	-21.6158
ZINC01611325	-12.3480	-12.0007	-11.7333	-12.2800	-11.0848
ZINC01612409	-12.8155	-12.8445	-18.1259	-18.4778	-12.9841
ZINC01612730	-21.4184	-21.0579	-21.9953	-26.5778	-25.2434

ZINC01612737	-11.1114	-14.3110	-17.3057	-14.5146	-16.9522
ZINC01615911	-10.0244	-9.5820	-19.6087	-14.8313	-15.2911
ZINC01623566	-10.5395	-11.3749	-12.8621	-14.2115	-9.9934
ZINC01624044	-12.4471	-16.5995	-16.6773	-16.4776	-15.1363
ZINC01625457	-12.0811	-14.2518	-17.2275	-12.1692	-15.6947
ZINC01627098	-21.3545	-22.1391	-18.6573	-23.4437	-18.0694
ZINC01629124	-15.3254	-12.2852	-18.1928	-20.8912	-16.3851
ZINC01629976	-15.7680	-21.2845	-22.2819	-21.5502	-15.5684
ZINC01629124	-15.3254	-12.2852	-18.1928	-20.8912	-16.3851
ZINC01629979	-19.7252	-25.3177	-23.6073	-27.6731	-18.1055
ZINC01633430	-21.4407	-15.7290	-18.3442	-20.7453	-18.4168
ZINC01634792	-14.2256	-20.3321	-21.3650	-23.0950	-21.0656
ZINC01634793	-13.8335	-16.5766	-22.0298	-17.9314	-21.0696
ZINC01634795	-15.6938	-15.2970	-18.1611	-18.8794	-17.0180
ZINC01634796	-15.4874	-16.6836	-16.4581	-12.6647	-16.3014
ZINC01636384	-14.7292	-18.3668	-21.6589	-19.3151	-19.0096
ZINC01636394	-15.3514	-18.3882	-18.3005	-19.1145	-17.1497
ZINC01639573	-11.9709	-14.8659	-17.5533	-14.0161	-12.1421
ZINC01639574	-13.8005	-11.7282	-14.8439	-17.2717	-14.8844
ZINC01640078	-18.6232	-21.4839	-16.0933	-14.2999	-18.4285
ZINC01640313	-15.7903	-16.9867	-12.3391	-18.4410	-19.9483
ZINC01645293	-16.7179	-19.5980	-23.1181	-21.0736	-20.3081
ZINC01648068	-22.8020	-20.0202	-16.6406	-10.7687	-17.9991
ZINC01648069	-17.7669	-18.2913	-11.9029	-18.6548	-23.8026
ZINC01653634	-11.9456	-17.6199	-15.9428	-18.5168	-15.4640
ZINC01668138	-12.5739	-17.6572	-13.0491	-12.9439	-17.1915
ZINC01668139	-22.2960	-25.8994	-17.5638	-23.7063	-21.7827
ZINC01668140	-11.4744	-13.1222	-12.7763	-14.0824	-14.8005
ZINC01668141	-12.4693	-12.4750	-13.7603	-13.3980	-13.8535
ZINC01668142	-14.1801	-18.6779	-13.8354	-9.5193	-21.3358
ZINC01674153	-15.4218	-18.2483	-18.4154	-17.9309	-17.7903
ZINC01678213	-15.3607	-18.8032	-21.6307	-20.9084	-21.2092
ZINC01681003	-18.4224	-18.0705	-17.0095	-14.7312	-19.5528
ZINC01682484	-12.4308	-27.3127	-18.0595	-18.9596	-16.5135
ZINC01687363	-21.0416	-20.3811	-17.4216	-18.2492	-17.8124
ZINC01693257	-20.4518	-19.8461	-19.3879	-20.0059	-17.9604
ZINC01694273	-19.5971	-15.7610	-17.0161	-16.3440	-18.0792
ZINC01698055	-13.7847	-18.2732	-26.7633	-26.0610	-18.2428
ZINC01701701	-28.1633	-25.0034	-28.7930	-27.6801	-28.7422
ZINC01702369	-13.5662	-14.0520	-8.8874	-12.0071	-12.0493
ZINC01703974	-2.7035	-14.3258	-13.7115	-11.8102	-14.7422
ZINC01703976	-11.0204	-10.0777	-15.3160	-20.5525	-15.3007
ZINC01703978	-15.5539	-22.1103	-18.4610	-23.3577	-26.8544
ZINC01703981	-10.7334	-9.9597	-15.5306	-20.5737	-15.3859
ZINC01703983	-9.4020	-19.1830	-12.0160	-11.8737	-14.2457
ZINC01705603	-23.8241	-26.7791	-26.9003	-23.8437	-16.1776
ZINC01705670	-15.5485	-15.9005	-14.3452	-14.7526	-16.6484
ZINC01705928	-17.4306	-22.9176	-24.0994	-18.2538	-16.8887
ZINC01706462	-7.8530	-12.0332	-9.8346	-15.5161	-13.3237
ZINC01708396	-12.3867	-15.2397	-12.8283	-14.4482	-14.0414
ZINC01708964	-14.4117	-17.7092	-17.0151	-13.2016	-15.4910
ZINC01715695	-14.4306	-18.7134	-20.4235	-19.8833	-20.5703
ZINC01715696	-15.9763	-16.1097	-16.6251	-20.8900	-15.4902
ZINC01716723	-10.0939	-13.7605	-16.4213	-11.0735	-11.5391
ZINC01716734	-13.8821	-15.8403	-16.1689	-14.9645	-18.1778
ZINC01717505	-20.4678	-22.4731	-21.9346	-17.9940	-22.0167
ZINC01717549	-22.9807	-28.8329	-27.5336	-22.8797	-28.9138
ZINC01717901	-25.1589	-30.0859	-27.4307	-25.8045	-26.0901

ZINC01719306	-16.0064	-19.6837	-18.8801	-16.6523	-14.4770
ZINC01720141	-17.7242	-16.9809	-20.5745	-16.4885	-16.0852
ZINC01722344	-19.1208	-24.5764	-20.3408	-19.8436	-19.6822
ZINC01725309	-17.1574	-18.2006	-18.6762	-18.3993	-21.0666
ZINC01729079	-12.8553	-10.8645	-8.8430	-14.0449	-11.2656
ZINC01731913	-19.4090	-23.1134	-24.9859	-20.5591	-20.5486
ZINC01732514	-24.3985	-31.0009	-26.0364	-21.4398	-25.5200
ZINC01734844	-16.5883	-20.5056	-24.3039	-19.2501	-19.0041
ZINC01736329	-17.4254	-31.3927	-23.2553	-15.7364	-13.7768
ZINC01737080	-23.8173	-28.0404	-25.0086	-25.9053	-26.6263
ZINC01740672	-12.3150	-13.0350	-6.8648	-10.9061	-11.1709
ZINC01740735	-16.7668	-18.9388	-16.9624	-20.4895	-17.0577
ZINC01740811	-8.7784	-15.3850	-18.8874	-7.0818	-15.7577
ZINC01740814	-11.3362	-15.7993	-15.5384	-14.6211	-10.1062
ZINC01741187	-19.7295	-20.6556	-19.5842	-24.9018	-21.2468
ZINC01741531	-18.5839	-17.6365	-17.7861	-17.3810	-15.1975
ZINC01742179	-24.0686	-22.5333	-25.6756	-21.4040	-16.2099
ZINC01742353	-18.4432	-28.7365	-21.8099	-25.8430	-17.9336
ZINC01742466	-13.9271	-18.6622	-19.8212	-18.8452	-18.4854
ZINC01742724	-18.7942	-24.2669	-28.9879	-19.0820	-18.5655
ZINC01742958	-20.8292	-20.8468	-19.5369	-21.0961	-20.6417
ZINC01744001	-23.5756	-25.6968	-24.3783	-25.1687	-26.1158
ZINC01754754	-13.3198	-14.2399	-12.9444	-12.7938	-14.2992
ZINC01757642	-19.3768	-22.0262	-19.4061	-18.6606	-15.2477
ZINC01759149	-16.9580	-17.7513	-22.7174	-20.8278	-20.1818
ZINC01759150	-10.0014	-9.9427	-20.0340	-26.5144	-12.4012
ZINC01761379	-15.3601	-14.0259	-9.5531	-5.4288	-19.9813
ZINC01761727	-16.5457	-8.6429	-4.0012	-11.2457	-22.0392
ZINC01762086	-13.7461	-15.6494	-18.4466	-21.1497	-15.1724
ZINC01762933	-24.0846	-29.4195	-15.6967	-12.2026	-28.6511
ZINC01762940	-19.3964	-28.4527	-21.4972	-9.6319	-28.2861
ZINC01770961	-6.9450	-11.8708	-1.6611	-7.4259	-13.0392
ZINC01790965	-12.6332	-24.7797	-22.0934	-3.0697	-20.8809
ZINC01795820	-16.7049	-19.2135	-21.5954	-18.9735	-16.9899
ZINC01795822	-15.9953	-16.2617	-19.7241	-20.0923	-21.0586
ZINC01795823	-14.7092	-17.2171	-20.9953	-19.2068	-16.1546
ZINC01798668	-7.8375	-10.5977	-9.0415	-2.5822	-9.8418
ZINC01798674	-8.7566	-10.1007	-5.6879	-0.3308	-9.7942
ZINC01813346	-11.5470	-10.7797	-8.9756	-4.6739	-9.1919
ZINC01813349	-7.5068	-10.2258	-4.9348	-4.8172	-12.4886
ZINC01834058	-11.4301	-12.5899	-7.6440	-5.7621	-10.2917
ZINC01834061	-11.1726	-12.6239	-10.2117	-5.9728	-9.3497
ZINC01857827	-12.2518	-11.0806	-19.0647	-14.1428	-15.8765
ZINC01869524	-14.2920	-16.4337	-18.8221	-16.6834	-15.0641
ZINC01869901	-13.9605	-13.4484	-18.6173	-13.6270	-14.1425
ZINC01869939	-15.3921	-16.2676	-18.3710	-16.2012	-15.3151
ZINC01869941	-19.9902	-25.5960	-21.3978	-23.3783	-18.7898
ZINC01869959	-18.1166	-15.7031	-17.7016	-15.1072	-20.1764
ZINC01873104	-14.7044	-19.5033	-15.6557	-18.2394	-13.1412
ZINC01876259	-14.2513	-20.0450	-19.5376	-13.8881	-14.0213
ZINC01884481	-14.3702	-22.1830	-20.1431	-13.4932	-19.1018
ZINC01893102	-13.5873	-18.1033	-9.3541	-11.0105	-12.7186
ZINC01952358	-21.5468	-21.2019	-12.9193	-16.8870	-19.0006
ZINC01999070	-15.2088	-18.6660	-22.4582	-21.1583	-17.7895
ZINC02001102	-14.7699	-19.8514	-13.4959	-15.3533	-14.1144
ZINC02004439	-13.0001	-12.1684	-16.5691	-18.1202	-13.7483
ZINC02011672	-14.0240	-17.2111	-17.6155	-18.7101	-16.7426
ZINC02012446	-15.7257	-17.8527	-16.7712	-17.2906	-16.8728

ZINC02013948	-12.5768	-14.8888	-15.0025	-18.6893	-17.0862
ZINC02015622	-19.0628	-17.5280	-24.9367	-23.5574	-21.6013
ZINC02018620	-23.0774	-22.0924	-23.3874	-23.4093	-20.6637
ZINC02018621	-20.3086	-23.8703	-20.0130	-19.3518	-21.2460
ZINC02028409	-9.0451	-12.6578	-16.0080	-14.0568	-12.9774
ZINC02031583	-16.5211	-23.0930	-17.4368	-17.3445	-19.1448
ZINC02045527	-19.4942	-17.0608	-17.7620	-20.6501	-20.4623
ZINC02046853	-22.7703	-25.2789	-27.5512	-26.2577	-25.2266
ZINC02049108	-21.5045	-28.5868	-21.7107	-20.4801	-19.3650
ZINC02049934	-14.8454	-10.5847	-14.5819	-12.8357	-14.5739
ZINC02065453	-13.2442	-19.4110	-13.7908	-12.0872	-17.4996
ZINC02087803	-12.1746	-16.0383	-13.5914	-20.5563	-15.9195
ZINC02087805	-13.1444	-16.7370	-13.5392	-15.5213	-18.1428
ZINC02124230	-22.5685	-28.5743	-23.5500	-13.4643	-22.7855
ZINC02124232	-21.8728	-28.0290	-23.5595	-17.5374	-22.8116
ZINC02141013	-19.3086	-17.7069	-16.2289	-15.9665	-14.6517
ZINC02141232	-12.7355	-15.1750	-14.8165	-11.9906	-13.3377
ZINC02148021	-18.6593	-20.4568	-17.0893	-15.2294	-17.6762
ZINC02148635	-15.3555	-21.2431	-14.1116	-15.7169	-14.2694
ZINC02149517	-27.0405	-29.5117	-26.8914	-26.9156	-26.6395
ZINC02149594	-14.2332	-14.5574	-11.8772	-15.2152	-12.8595
ZINC02150038	-11.5361	-13.7751	-12.5268	-9.6420	-11.9962
ZINC02150040	-3.8004	-18.7380	-10.4872	-14.8717	-13.6522
ZINC02157636	-16.4585	-19.9598	-24.2036	-21.2217	-15.9554
ZINC02166641	-24.0644	-23.7888	-22.6269	-22.9543	-23.7995
ZINC02166694	-12.4125	-12.5922	-13.7080	-13.6433	-13.8364
ZINC02167929	-27.3514	-30.3141	-29.7803	-25.8330	-24.1253
ZINC02168009	-9.1521	-13.0720	-9.0623	-10.6390	-10.4363
ZINC02172994	-18.8238	-22.7434	-22.5335	-18.5549	-15.9084
ZINC02182084	-17.1039	-16.9298	-11.9369	-14.9172	-21.3338
ZINC02182086	-14.5199	-15.1375	-13.7382	-13.8104	-18.6526
ZINC02182087	-15.8094	-16.2871	-12.1012	-14.2550	-16.9513
ZINC02183227	-3.5035	-8.8943	-2.9470	-11.8039	-9.3067
ZINC02183228	-12.3164	-11.2558	-12.5754	-7.6314	-12.7358
ZINC02220787	-10.3101	-8.8790	-0.1962	-5.0196	-11.4838
ZINC02250676	-10.8917	-11.7811	-14.9963	-18.4594	-12.2707
ZINC02250679	-10.0101	-13.8272	-16.4478	-18.8235	-11.7504
ZINC02255754	-16.6057	-20.5247	-18.0401	-25.4957	-19.9294
ZINC02266546	-21.6738	-20.6328	-18.1626	-22.9085	-22.9248
ZINC02267560	-21.1202	-24.2351	-26.1189	-22.8919	-24.1545
ZINC02268051	-10.5852	-11.9848	-15.1317	-15.1019	-10.1518
ZINC02268054	-9.3149	-12.5699	-15.2215	-19.0942	-12.5018
ZINC02269821	-12.8656	-11.4786	-13.0012	-8.6645	-13.6809
ZINC02278672	-5.0741	-12.8706	-4.7145	-11.2595	-9.5501
ZINC02293657	-7.1495	-9.1996	-14.2843	-16.1909	-7.5663
ZINC02294490	-10.3566	-13.2311	-14.1757	-10.9316	-11.8644
ZINC02294618	-8.2929	-18.6461	-11.3339	-14.4996	-10.5916
ZINC02294755	-21.8041	-21.7065	-24.7584	-20.8455	-21.4276
ZINC02294879	-1.3206	-5.4529	-1.3260	-8.7290	-5.3206
ZINC02294898	-7.4174	-20.0880	-17.3037	-13.5531	-11.7571
ZINC02294899	6.9129	-10.6560	-14.4235	-13.7613	-10.4800
ZINC02294900	-5.7850	-12.0340	-12.4540	-13.7094	-11.5763
ZINC02294901	-8.7308	-17.4373	-9.7057	-13.5416	-12.8790
ZINC02298746	-9.5367	-13.8075	-12.5277	-4.9670	-10.5069
ZINC02299177	-12.8612	-12.2701	-12.2941	-7.3208	-10.3880
ZINC02300538	-11.2439	-19.3000	-17.2758	-16.7888	-13.2783
ZINC02305029	-9.5306	-14.1361	-13.3730	-6.3682	-11.3210
ZINC02309815	-9.7028	-12.7789	-23.7580	-12.8336	-10.4706

ZINC02340719	-18.5922	-22.2316	-19.2313	-17.7252	-20.3679
ZINC02340722	-17.2676	-23.6231	-18.4362	-16.0807	-19.9198
ZINC02379172	-15.4607	-23.2570	-21.5726	-18.6701	-19.5666
ZINC02379663	-15.9032	-15.6199	-17.9141	-21.2744	-15.0151
ZINC02382530	-18.4387	-16.1296	-20.3335	-20.3782	-21.8086
ZINC02384674	-19.6911	-20.9460	-17.7217	-16.4509	-22.4127
ZINC02384955	-15.5684	-16.2368	-12.3443	-13.9675	-14.4695
ZINC02384957	-19.2814	-20.3470	-16.3862	-19.3552	-18.2986
ZINC02384958	-15.8531	-17.9015	-16.8938	-12.3205	-14.0529
ZINC02384960	-15.1862	-20.0250	-15.8485	-16.4669	-15.0564
ZINC02385686	-20.9537	-20.9171	-16.6285	-18.9081	-22.2311
ZINC02387193	-16.5873	-25.0012	-17.8500	-17.1196	-17.0566
ZINC02387218	-19.5237	-24.2400	-19.8859	-20.5231	-17.8834
ZINC02387221	-20.1134	-21.4884	-20.7186	-17.6399	-15.5425
ZINC02388217	-22.7807	-27.8583	-22.6820	-25.8488	-22.7095
ZINC02391095	-15.2993	-15.6043	-17.8467	-16.0131	-14.9184
ZINC02391843	-14.4167	-16.6913	-18.3569	-18.7724	-15.5092
ZINC02503744	-22.9257	-25.6555	-23.4132	-24.2386	-29.6118
ZINC02504611	-16.0543	-24.4253	-19.3279	-17.5631	-15.1375
ZINC02504636	-23.1637	-18.5618	-16.2663	-18.8151	-19.4351
ZINC02504650	-19.3436	-29.7732	-24.3279	-21.3486	-21.6128
ZINC02504671	-9.9632	-11.8437	-12.1798	-13.2210	-9.2347
ZINC02504672	-10.5357	-11.2423	-10.9236	-10.2052	-11.3244
ZINC02508419	-19.1731	-17.7970	-26.9160	-20.5537	-25.9415
ZINC02508421	-22.4217	-26.5459	-24.5589	-25.3131	-21.6299
ZINC02508422	-21.2545	-26.4617	-23.0023	-20.9802	-17.8826
ZINC02509800	-21.2882	-24.7791	-25.1375	-18.8292	-16.3348
ZINC02510806	-22.3363	-28.4965	-24.8569	-21.5218	-13.7489
ZINC02511853	-18.2930	-23.4949	-17.1477	-14.1305	-20.3927
ZINC02513843	-17.4730	-22.2549	-25.5772	-24.1428	-26.9389
ZINC02516003	-26.8490	-30.3704	-26.4736	-27.5973	-27.0462
ZINC02516004	-22.1390	-24.4704	-18.6536	-20.6373	-27.0462
ZINC02516005	-19.0962	-25.3123	-23.8819	-20.3332	-22.1610
ZINC02516006	-19.2847	-24.1983	-19.2995	-19.6892	-16.1268
ZINC02517108	-11.3482	-16.1395	-15.7774	-18.6499	-15.3118
ZINC02517115	-7.8456	-15.1901	-12.0738	-13.8250	-15.4135
ZINC02517116	-8.6359	-13.5867	11.8713	-16.3114	-16.2058
ZINC02517127	-13.4898	-17.9805	-14.1516	-20.1994	-18.1549
ZINC02517131	-8.4066	-15.8224	-13.8323	-15.2372	-15.5726
ZINC02518936	-13.5328	-17.9374	-20.8334	-19.4695	-19.7699
ZINC02522511	-19.0656	-25.5333	-22.7539	-22.1205	-20.9881
ZINC02522681	-14.3575	-18.2249	-14.9200	-14.0345	-11.9275
ZINC02522700	-14.1315	-18.3958	-14.9453	-14.2624	-13.4910
ZINC02522701	-22.6218	-19.7182	-21.1978	-21.3221	-20.6461
ZINC02522776	-15.7547	-16.8998	-18.2178	-18.0336	-20.2936
ZINC02525166	-15.1751	-21.7173	-16.3712	-16.2596	-16.6146
ZINC02526266	-15.3029	-16.8340	-14.7979	-19.0393	-14.2178
ZINC02526270	-17.9580	-18.5187	-21.5763	-21.2535	-16.8458
ZINC02526271	-17.5328	-19.4940	-19.7317	-19.7309	-20.6673
ZINC02526272	-16.5829	-20.6742	-20.7146	-20.4119	-16.9082
ZINC02526275	-19.8148	-22.0958	-22.3561	-25.5385	-22.8967
ZINC02526283	-15.4822	-19.0207	-19.1032	-17.7061	-12.3220
ZINC02526303	-15.9876	-21.7018	-22.6380	-18.3658	-20.3764
ZINC02526317	-13.0796	-17.9784	-17.1588	-17.5835	-17.2797
ZINC02526328	-22.4089	-26.3157	-8.8295	-16.5140	-26.0412
ZINC02526432	-10.5564	-16.2216	-14.6547	-12.4732	-14.7766
ZINC02526433	-14.1196	-18.2600	-18.4506	-16.5707	-17.5758
ZINC02526434	-15.3723	-22.7667	-20.7764	-17.5451	-18.7599

ZINC02526762	-18.9965	-18.9316	-15.3009	-18.1942	-19.2760
ZINC02528020	-11.0128	-12.8086	-12.6440	-14.2690	-10.8041
ZINC02539216	-18.1490	-20.7531	-16.8292	-17.0589	-18.0150
ZINC02539227	-22.3463	-24.0439	-18.1457	-17.2464	-22.9032
ZINC02545097	-17.8251	-14.5600	-16.2329	-14.2293	-13.2958
ZINC02551978	-17.8862	-23.3075	-19.7891	-19.1563	-17.4158
ZINC02555201	-9.2294	-11.3476	-13.1743	-13.5804	-10.4251
ZINC02555347	-24.4139	-24.4776	-29.5343	-23.5067	-26.0623
ZINC02555349	-28.2167	-26.5385	-18.0677	-23.7075	-26.4223
ZINC02555350	-26.8072	-24.4302	-24.2438	-21.5816	-19.1200
ZINC02555659	-28.2085	-30.0706	-19.6929	-16.8528	-21.4205
ZINC02555702	-22.6928	-28.3832	-26.1405	-24.2013	-20.2342
ZINC02555733	-12.7115	-13.1534	-13.3967	-15.8499	-14.4518
ZINC02556540	-20.5603	-29.5348	-24.5792	-25.5624	-24.5990
ZINC02556553	-14.9056	-14.0246	-15.3439	-15.1157	-9.4882
ZINC02556559	-16.1775	-18.7834	-13.7938	-15.3788	-14.3120
ZINC02556674	-18.5643	-19.0758	-16.9911	-20.8600	-18.7628
ZINC02556782	-14.3976	-18.3851	-16.3607	-15.5926	-16.5114
ZINC02558956	-11.9678	-20.8111	-14.5720	-13.4953	-14.1292
ZINC02558957	-10.3983	-11.7520	-12.3602	-14.2246	-10.1992
ZINC02560687	-15.4704	-18.1769	-16.0805	-16.2651	-14.0846
ZINC02560693	-17.4062	-19.8585	-23.0445	-16.3148	-20.5190
ZINC02560798	-17.7706	-18.0259	-17.8442	-16.5199	-15.0279
ZINC02560805	-17.6531	-19.0676	-17.0447	-6.4991	-16.2679
ZINC02560806	-18.3488	-20.0435	-19.8339	-20.6539	-17.3105
ZINC02560849	-17.4715	-25.1099	-18.8027	-21.2645	-25.8647
ZINC02560890	-24.2240	-22.5067	-16.3215	-17.1577	-18.8725
ZINC02561177	-19.4541	-26.2331	-20.3645	-22.6292	-19.7940
ZINC02564792	-14.0322	-18.5427	-19.4466	-15.5192	-18.7237
ZINC02565886	-25.1587	-28.7701	-18.0940	-18.7856	-28.6546
ZINC02565924	-27.8412	-28.8746	-22.7062	-28.7982	-28.5291
ZINC02566532	-11.7736	-11.8518	-21.7162	-12.9590	-13.8009
ZINC02568281	-12.8110	-14.7045	-15.4545	-19.0255	-16.2338
ZINC02569787	-13.3450	-25.1504	-19.0552	-18.1491	-17.5425
ZINC02569811	-20.4035	-24.5186	-22.1798	-22.7951	-19.6105
ZINC02570067	-12.9696	-17.9497	-22.3246	-18.6773	-16.6565
ZINC02570128	-7.2249	-9.2362	-16.6412	-18.5277	-6.2041
ZINC02571371	-19.9302	-18.8002	-19.2001	-17.0484	-16.8098
ZINC02572516	-13.8290	-18.5150	-15.7639	-18.7257	-12.9133
ZINC02573773	-20.0992	-21.6080	-15.2195	-14.1380	-25.0460
ZINC02575691	-27.9081	-19.3980	-18.6592	-22.8670	-26.8237
ZINC02576499	-18.1368	-28.1791	-18.6866	-20.7671	-18.0641
ZINC02577812	-15.3523	-11.4998	-16.2105	-16.1109	-19.4960
ZINC02577813	-16.3746	-17.4960	-17.3235	-15.8834	-18.6061
ZINC02581603	-13.6585	-20.7774	-17.4379	-18.7818	-16.1451
ZINC02581896	-14.7177	-14.0791	-13.6108	-11.0570	-19.0021
ZINC02583311	-18.1641	-20.7887	-14.1270	-18.0237	-22.0259
ZINC02583601	-7.6710	-16.9957	-9.9611	-13.8734	-13.3282
ZINC02583944	-15.2359	-17.1919	-18.6496	-20.4934	-16.3668
ZINC02583945	-14.0151	-16.7047	-18.6241	-19.9001	-16.5570
ZINC02583946	-16.7651	-17.8347	-25.4241	-22.8201	-16.5570
ZINC02583947	-17.6181	-27.3425	-20.8042	-23.3243	-18.2306
ZINC02583948	-13.8360	-17.2633	-18.6303	-19.4523	-16.4286
ZINC02583949	-14.4634	-15.6034	-16.7851	-19.6857	-15.1657
ZINC02583950	-14.6884	-17.1650	-19.6596	-19.4373	-16.4655
ZINC02583951	-14.9104	-17.7726	-18.5999	-18.2094	-16.3813
ZINC02583952	-14.3632	-17.1542	-17.5984	-18.5107	-15.7750
ZINC02583953	-14.9478	-17.1013	-18.7122	-19.5833	-16.3706

ZINC02583954	-13.4905	-16.5210	-17.4391	-19.8195	-15.1683
ZINC02583955	-15.2972	-17.0181	-18.2363	-18.7793	-16.9210
ZINC02583956	-15.1380	-17.4285	-18.4051	-21.1977	-16.4469
ZINC02583957	-15.1730	-16.5193	-19.2961	-18.7401	-16.7999
ZINC02583958	-14.0908	-19.8595	-18.7425	-18.9854	-16.5205
ZINC02583959	-17.8981	-25.8004	-21.1642	-21.3757	-19.9948
ZINC02583960	-14.0803	-23.9089	-22.5681	-18.8260	-17.8515
ZINC02584388	-17.6997	-19.1406	-19.7418	-14.9150	-15.5525
ZINC02584423	-15.1717	-20.2113	-20.1917	-17.4116	-23.0339
ZINC02584437	-18.3479	-25.9915	-17.9049	-16.0794	-20.3130
ZINC02585405	-15.7581	-18.5539	-20.8202	-17.2606	-15.9352
ZINC02586048	-15.2502	-16.8230	-18.1159	-19.8444	-16.5635
ZINC02597022	-14.4247	-11.9053	-12.4136	-8.5421	-7.0243
ZINC02650036	-18.2770	-18.3443	-17.7180	-12.6984	-10.4496
ZINC02685019	-12.7012	-20.9877	-18.2267	-15.4933	-19.7308
ZINC02685021	-11.6994	-16.7584	-14.8992	-15.4818	-21.2080
ZINC02685023	-17.8817	-24.4513	-20.5317	-22.6816	-23.0339
ZINC02685093	-16.1391	-17.5087	-15.0654	-19.2449	-18.2055
ZINC02685096	-16.1511	-21.0029	-21.4271	-19.4992	-16.9311
ZINC02685098	-15.0231	-15.5562	-18.4505	-18.8313	-17.9365
ZINC02694680	-12.9775	-14.3603	-19.9099	-19.5001	-16.5066
ZINC02699744	-10.1633	-13.8229	-13.5801	-15.1892	-15.2777
ZINC02699747	-14.2682	-16.5598	-13.3199	-0.8165	-20.7365
ZINC02699749	-10.3333	-18.7154	-14.0388	-11.2739	-16.2837
ZINC02699752	-13.0242	-14.7132	-14.8080	-16.5989	-14.3891
ZINC02699754	-17.4179	-18.5105	-17.1714	-15.0338	-17.7163
ZINC02699757	-14.5205	-19.4945	-16.9553	-16.4086	-16.0165
ZINC02699760	-16.3310	-17.1506	-16.9414	-15.0000	-15.8348
ZINC02699762	-16.3280	-17.6611	-16.5247	-14.9687	-17.2164
ZINC02699764	-16.5162	-17.6290	-16.5561	-14.8187	-15.2445
ZINC02699766	-15.5911	-16.6017	-16.2017	-14.3949	-16.2906
ZINC02700456	-19.1023	-23.5431	-20.6641	-18.0120	-16.4601
ZINC02700458	-19.1613	-18.3872	-15.5372	-15.0941	-16.5132
ZINC02749967	-14.1224	-20.0761	-18.3470	-20.6081	-19.5183
ZINC02786789	-14.7535	-15.3905	-13.8507	-18.8867	-16.5683
ZINC02787709	-17.4909	-18.1619	-19.0721	-11.9840	-18.0645
ZINC02787953	-19.8558	-22.3304	-19.7747	-13.4285	-18.3072
ZINC02788272	-13.2857	-15.0763	-15.0552	-11.3280	-11.2441
ZINC02789543	-18.3519	-17.4327	-25.5158	-17.9101	-15.7224
ZINC02789577	-16.3631	-18.3340	-22.4094	-16.9285	-18.2858
ZINC02789645	-13.1276	-17.0429	-22.0017	-16.4078	-15.8642
ZINC02789954	-14.5121	-19.1283	-20.8940	-17.7505	-15.7648
ZINC02790016	-17.0005	-17.6389	-24.4181	-16.8592	-17.6411
ZINC02790210	-16.4083	-16.1025	-21.7646	-14.1992	-17.9753
ZINC02790977	-15.5199	-18.7540	-21.5908	-17.9107	-18.8455
ZINC02790999	-13.9160	-16.4009	-17.9540	-9.3195	-16.1701
ZINC02791103	-12.7006	-16.2415	-20.2351	-18.1997	-14.0306
ZINC02791276	-25.2765	-27.5987	-28.7861	-27.1536	-29.0096
ZINC02791317	-14.5358	-20.9475	-18.0196	-12.8396	-16.9112
ZINC02791325	-15.4446	-16.0475	-14.8009	-18.8830	-10.6066
ZINC02791624	-13.8650	-14.3778	-21.9920	-16.4004	-12.9308
ZINC02791638	-15.1961	-17.4523	-14.4494	-17.8572	-13.6265
ZINC02791864	-18.2005	-21.4780	-18.4027	-13.6115	-19.6674
ZINC02792020	-18.7451	-14.9204	-15.1896	-13.0923	-10.7466
ZINC02792057	-16.0019	-17.1646	-18.3737	-17.2135	-19.3420
ZINC02792472	-15.6361	-23.6242	-15.4797	-7.2389	-13.8602
ZINC02792572	-26.10980	-28.3328	-23.8894	-26.1126	-28.9664
ZINC02793137	-17.9081	-18.2903	-16.6015	-17.6464	-17.9648

ZINC02793554	-17.6341	-14.7408	-18.4532	-11.8323	-13.7104
ZINC02793728	-12.8935	-15.5697	-14.8511	-14.3853	-9.3122
ZINC02793870	-19.1887	-21.0080	-14.5864	-14.3266	-12.1055
ZINC02793945	-15.0949	-15.3180	-21.0063	-10.6485	-15.6200
ZINC02794009	-21.3056	-20.1081	-12.8628	-9.8832	-13.2876
ZINC02794115	-15.1966	-15.2912	-20.8885	-9.8942	-15.9285
ZINC02794412	-18.0776	-19.3054	-12.3331	-10.4938	-14.1891
ZINC02794487	-16.4885	-23.2209	-15.0726	-6.3651	-13.7877
ZINC02794515	-17.7501	-19.5189	-17.2801	-10.9613	-14.9570
ZINC02794559	-17.3305	-19.5401	-13.0476	-8.0722	-14.0882
ZINC02794738	-17.6051	-18.5856	-23.2992	-13.4883	-17.3653
ZINC02794819	-21.0647	-20.7627	-12.2957	-8.0878	-13.8722
ZINC02794825	-16.3728	-15.3158	-14.5809	-18.6061	-16.0131
ZINC02795275	-14.1576	-20.5373	-13.8102	-19.2565	-20.3009
ZINC02795546	-25.3749	-16.2920	-20.5424	-20.7312	-17.2022
ZINC02796629	-28.4347	-26.7563	-21.9489	-21.2357	-25.4988
ZINC02796765	-25.1627	-28.5852	-23.4493	-20.4554	-25.4055
ZINC02796979	-27.3467	-28.8617	-24.4689	-21.7281	-26.3455
ZINC02797028	-28.0939	-27.6588	-21.0239	-15.7855	-25.6267
ZINC02797689	-11.9636	-18.3407	-18.7086	-17.6039	-14.9193
ZINC02798020	-14.4346	-16.2691	-18.9969	-14.3219	-18.1170
ZINC02798300	-14.0598	-17.6342	-18.9034	-11.5037	-16.0365
ZINC02798402	-15.2895	-15.8192	-18.9623	-12.1095	-15.4704
ZINC02798606	-16.6362	-20.2263	-21.0584	-17.7751	-15.9481
ZINC02798946	-13.9129	-16.3965	-17.1923	-11.6519	-16.0417
ZINC02799970	-17.4396	-19.7529	-21.3410	-17.7693	-15.8707
ZINC02800080	-14.8905	-17.6114	-16.9711	-18.6409	-18.7743
ZINC02800256	-19.1044	-22.5779	-24.9012	-21.1903	-27.6746
ZINC02802538	-19.2422	-20.3754	-25.3734	-21.4048	-26.1869
ZINC02803233	-18.7644	-20.5754	-15.8405	-28.3060	-18.0927
ZINC02810882	-18.7351	-16.7913	-21.3137	-15.6050	-20.1007
ZINC02810905	-23.5243	-30.7161	-25.3476	-20.6312	-29.8648
ZINC02819788	-21.5608	-21.6216	-22.1915	-22.8225	-19.4626
ZINC02832599	-14.0284	-13.8199	-20.0727	-10.7154	-14.9159
ZINC02836046	-16.6390	-22.2082	-16.6642	-16.1022	-18.6390
ZINC02836047	-15.6600	-20.5442	-17.8187	-11.3593	-18.4090
ZINC02836049	-20.3336	-20.3981	-21.9821	-21.5888	-17.1809
ZINC02837444	-13.0334	-12.6330	-14.9933	-13.2935	-12.7296
ZINC02840308	-18.9181	-19.9271	-22.1373	-19.0212	-20.0140
ZINC02840326	-15.3185	-18.4182	-19.5960	-18.1919	-17.6727
ZINC02840571	-13.9052	-15.4018	-18.2023	-17.5959	-14.5056
ZINC02840971	-14.5506	-16.5045	-20.1225	-18.1316	-16.1039
ZINC02841343	-15.7428	-19.9965	-18.5214	-18.7610	-17.9436
ZINC02841377	-17.3010	-21.0852	-21.0813	-20.0684	-22.2364
ZINC02841383	-15.6516	-21.6263	-19.2810	-20.9956	-24.8438
ZINC02841563	-13.1315	-16.6834	-16.4478	-15.4188	-18.9023
ZINC02841597	-16.4189	-25.4370	-24.9811	-22.5249	-20.4219
ZINC02841825	-13.3869	-15.9543	-18.7760	-7.5168	-17.8081
ZINC02841877	-16.4917	-17.5330	-21.5898	-18.7607	-16.6970
ZINC02841931	-16.0523	-25.3295	-21.2590	-17.8993	-23.3699
ZINC02841938	-12.6681	-29.7080	-19.7592	-13.9342	-29.4845
ZINC02844597	-19.8312	-16.7188	-12.9559	-11.1355	-14.7343
ZINC02847125	-14.9207	-20.4583	-20.0209	-18.2529	-17.5945
ZINC02848540	-20.9664	-20.0222	-20.9522	-18.0077	-20.3607
ZINC02850194	-26.9062	-27.1905	-18.1693	-23.6971	-25.5288
ZINC02857491	-20.6624	-18.2100	-22.0659	-23.0911	-17.6788
ZINC02858261	-22.1017	-28.5899	-25.4611	-22.1992	-24.0119
ZINC02858335	-6.7512	-12.7153	-15.5622	-15.7245	-14.4291

ZINC02865663	-20.9245	-25.7403	-13.0652	-17.8636	-27.0803
ZINC02865664	-14.5952	-19.2086	-23.9733	-15.3541	-16.7137
ZINC02865665	-15.4009	-19.0224	-22.8359	-10.7757	-16.7225
ZINC02865666	-17.7846	-24.2633	-25.6661	-17.2778	-24.2598
ZINC02865668	-21.4101	-17.9467	-25.1878	-13.8505	-18.9921
ZINC02866620	-16.0437	-18.7483	-18.6487	-14.3842	-17.0097
ZINC02868216	-15.2691	-15.3641	-15.7502	-22.3643	-18.2993
ZINC02868217	-15.0257	-14.6099	-18.9368	-14.4978	-14.3190
ZINC02868222	-15.0133	-20.5421	-16.7020	-11.4053	-14.3403
ZINC02868259	-14.0840	-10.5310	-16.9102	-15.8313	-9.0409
ZINC02868260	-16.4128	-11.5559	-13.5049	-14.1583	-13.6485
ZINC02868278	-15.7925	-19.1649	-19.0819	-15.3656	-20.3807
ZINC02868282	-15.3203	-12.9647	-15.6306	-15.5511	-14.6662
ZINC02868301	-15.4654	-15.1360	-15.0556	-12.9007	-11.7762
ZINC02868336	-11.9706	-12.6064	-17.3101	-12.6133	-16.1848
ZINC02868339	-16.0552	-14.3531	-14.0720	-19.0236	-11.3220
ZINC02868351	-12.0734	-11.3208	-15.6317	-14.1269	-15.7395
ZINC02868374	-16.1397	-17.0208	-16.7594	-19.1924	-14.7310
ZINC02868418	-12.7159	-14.5403	-17.2925	-13.5552	-21.4828
ZINC02868494	-20.8187	-22.6626	-23.2645	-19.7025	-22.2198
ZINC02868520	-15.6526	-14.2139	-14.3449	-13.6665	-7.7491
ZINC02868521	-17.8092	-22.7588	-23.3553	-18.9683	-24.4801
ZINC02868524	-13.7894	-13.0875	-16.0624	-15.7907	-14.0942
ZINC02868630	-18.8175	-14.7504	-20.3446	-21.0481	-14.3222
ZINC02868700	-16.9233	-12.4440	-16.7271	-13.4837	-15.1423
ZINC02868734	-16.1404	-12.5383	-14.7486	-14.6395	-10.9475
ZINC02868776	-10.4662	-15.3965	-13.1616	-15.0036	-10.0077
ZINC02870793	-5.3473	-16.7721	-5.4309	-10.4844	-14.4857
ZINC02870820	-15.9596	-18.6749	-15.9934	-15.2352	-12.8638
ZINC02871055	-24.5210	-27.8604	-26.3741	-20.1935	-27.0665
ZINC02871057	-8.0276	-10.1230	-5.0538	-13.6249	-11.6161
ZINC02871100	-8.4773	-14.0076	-10.9141	-5.7766	-16.3288
ZINC02871117	-12.9724	-17.7830	-16.4828	-14.8319	-14.7687
ZINC02871836	-1.5054	-14.6607	-7.1822	-6.5772	-12.1471
ZINC02871867	-16.6949	-14.5341	-12.5051	-9.9717	-19.1051
ZINC02871883	-0.3855	-11.1353	-7.2279	-0.7543	-11.7255
ZINC02874960	-15.5407	-18.0743	-16.9896	-14.7390	-15.4033
ZINC02874964	-14.7610	-17.6502	-15.7187	-14.1554	-14.1411
ZINC02875010	-3.5912	-11.2348	-2.1765	-5.9587	-16.4833
ZINC02881752	-8.2167	-10.2119	-7.4652	-9.3542	-13.8552
ZINC02886098	-12.2980	-9.9320	-15.6362	-7.6582	-14.9649
ZINC02887424	-15.3274	-16.2656	-20.5580	-20.0052	-17.2351
ZINC02893291	-12.6609	-16.4535	-18.9844	-21.7406	-15.6270
ZINC02896509	-18.1764	-24.8644	-20.1761	-19.9597	-19.9304
ZINC02896811	-11.3444	-17.3551	-14.7278	-12.2708	-9.3055
ZINC02898722	-28.2114	-30.1308	-25.6278	-28.2368	-25.8596
ZINC02900674	-13.5134	-16.5939	-13.9965	-10.1741	-17.4933
ZINC02901798	-28.5685	-31.1393	-26.5171	-26.5637	-25.7648
ZINC02902900	-25.1025	-27.6045	-26.6496	-24.9256	-27.0269
ZINC02938448	-12.3557	-15.0938	-19.9018	-15.5430	-17.4939
ZINC02946718	-17.2615	-15.9481	-18.3239	-17.2845	-18.1379
ZINC02953756	-17.0998	-20.4430	-15.6313	-12.2886	-19.0064
ZINC02953923	-16.3707	-16.0928	-17.2913	-11.1820	-18.0529
ZINC02965805	-20.1543	-21.2993	-25.8896	-24.2426	-22.1700
ZINC02968093	-12.6194	-14.6168	-14.7128	-17.2167	-17.5868
ZINC02979769	-11.4352	-16.6533	-8.0052	-15.9848	-12.8443
ZINC02981958	-11.4508	-15.5909	-8.6920	-15.9485	-13.6391
ZINC02986710	-11.3232	-14.5472	-14.2840	-18.2350	-15.4396

ZINC02987603	-14.1670	-25.1901	-14.2832	-18.3245	-24.7400
ZINC03018783	-20.2466	-22.4564	-22.8386	-18.2707	-21.9094
ZINC03029011	-23.4081	-21.8457	-20.5270	-20.3801	-15.8556
ZINC03029408	-9.1261	-18.3240	-6.4045	-3.8987	-8.8222
ZINC03029410	-9.0131	-17.5260	-5.3846	-1.8992	-9.9126
ZINC03029411	-9.4935	-16.6630	-5.8745	-6.7916	-8.1557
ZINC03029413	-14.7678	-19.9116	-12.6524	-10.0402	-9.5830
ZINC03029414	-16.5882	-17.7767	-6.3552	-10.2133	-13.3512
ZINC03029419	-16.0029	-18.0446	-12.3214	-9.1712	-13.0173
ZINC03029420	-10.7559	-15.6795	-9.5247	-7.7871	-11.7933
ZINC03029428	-9.7003	-15.3705	-12.6763	-11.2891	-13.9580
ZINC03029429	-9.2440	-14.2311	-15.4617	-11.1086	-12.7283
ZINC03029433	-11.0572	-15.7988	-17.1245	-18.2982	-12.0535
ZINC03029786	-10.4323	-15.3492	-20.3756	-13.7540	-14.8845
ZINC03029792	-19.4186	-21.3192	-26.0854	-24.1828	-21.1263
ZINC03029796	-12.1504	-17.8133	-16.5622	-15.0988	-14.3830
ZINC03029803	-18.6109	-24.3105	-25.8697	-24.8595	-20.7949
ZINC03040648	-20.5318	-21.2984	-19.8818	-21.2002	-18.8087
ZINC03040650	-18.6284	-20.8437	-22.3217	-20.7256	-22.2388
ZINC03040681	-18.4482	-17.1626	-13.2039	-15.1076	-20.6362
ZINC03040682	-17.1812	-17.9615	-15.3885	-20.4221	-18.3466
ZINC03040684	-21.1454	-21.3722	-15.6632	-18.2451	-20.8073
ZINC03040686	-21.3603	-21.7678	-16.8867	-20.8422	-19.9520
ZINC03040989	-23.9206	-30.8252	-31.4355	-25.7004	-28.3534
ZINC03040998	-18.5083	-24.3459	-24.2322	-23.7520	-21.1050
ZINC03041747	-22.2206	-21.4587	-24.5373	-26.2005	-17.1595
ZINC03046082	-11.7653	-16.7405	-12.3541	-11.6830	-17.0923
ZINC03052616	-3.8552	-18.3793	-11.5573	-6.3584	-13.6758
ZINC03052622	-7.3614	-14.4361	-5.0903	-6.4524	-4.9157
ZINC03052629	-15.5009	-15.6374	-6.5262	-9.4234	-12.2834
ZINC03052631	-15.9478	-12.4549	-13.1566	-11.5009	-18.0878
ZINC03052656	-3.6407	-15.1531	-9.0589	-1.1807	-11.8872
ZINC03056986	-13.6064	-14.1648	-19.7617	-24.2672	-19.9750
ZINC03056988	-13.1064	-11.2702	-13.0419	-18.7078	-12.7360
ZINC03057001	-22.8489	-27.2345	-25.0936	-21.9704	-27.1969
ZINC03064217	-17.3026	-15.3259	-14.2432	-24.5435	-15.7144
ZINC03067796	-18.9578	-24.7855	-14.7715	-26.2642	-26.0149
ZINC03067797	-20.8047	-27.3169	-20.0796	-23.6381	-22.7549
ZINC03067798	-22.8291	-19.0625	-28.0725	-20.9549	-21.6707
ZINC03067799	-23.8413	-18.0989	-22.3034	-19.4419	-24.9057
ZINC03074360	-18.8788	-18.8807	-16.0072	-15.1221	-16.7392
ZINC03076053	-16.1232	-19.6826	-18.8326	-17.6768	-15.6703
ZINC03076061	-16.3738	-19.5442	-15.5363	-14.4937	-16.5345
ZINC03079435	-12.2399	-16.1234	-16.0830	-16.3667	-15.0647
ZINC03079438	-21.9714	-18.2463	-13.1691	-21.1984	-16.8612
ZINC03079439	-19.0933	-17.2257	-14.4136	-21.2618	-18.5036
ZINC03085252	-28.9289	-35.6427	-26.3561	-28.0248	-26.5829
ZINC03086139	-10.1441	-14.6438	-18.6652	-17.2926	-11.1612
ZINC03086184	-11.8980	-11.9814	-14.7832	-13.4362	-13.3847
ZINC03089730	-25.2846	-29.0418	-20.7725	-20.3937	-26.4495
ZINC03089731	-19.6508	-30.4978	-21.6620	-20.9064	-29.0214
ZINC03092675	-18.4648	-28.5245	-20.9013	-20.6747	-27.2729
ZINC03093311	-15.0025	-11.8232	-15.6007	-15.6015	-14.6530
ZINC03096516	-8.6525	-13.0735	-8.7483	-17.9592	-13.2803
ZINC03096517	-12.0958	-12.9477	-10.2447	-18.2271	-14.8090
ZINC03100042	-23.5963	-27.4356	-25.5028	-22.4618	-26.5270
ZINC03104283	-13.4487	-18.2468	-11.6389	-9.4007	-19.3495
ZINC03104679	-19.2668	-22.6023	-22.2372	-19.6617	-19.7421

ZINC03105473	-16.4317	-16.7034	-19.5617	-12.1303	-13.1301
ZINC03107241	-24.6873	-23.2520	-24.0742	-17.4674	-21.6251
ZINC03110651	-13.5372	-12.6569	-13.9662	-15.9685	-14.6375
ZINC03116749	-12.8513	-16.3361	-15.9752	-15.2295	-12.9937
ZINC03116802	-14.0753	-16.4578	-14.2978	-15.9115	-15.6440
ZINC03116803	-13.8725	-13.7767	-16.3313	-10.6006	-16.6427
ZINC03116804	-19.2475	-17.8008	-18.0063	-17.5267	-21.5178
ZINC03116808	-13.4347	-16.2079	-15.5267	-11.7313	-15.6363
ZINC03117448	-14.6188	-18.6131	-14.9614	-14.0856	-18.6551
ZINC03117449	-9.7468	-16.0287	-16.8635	-18.2498	-19.1389
ZINC03117529	-14.4206	-20.3082	-17.4274	-16.8309	-19.7359
ZINC03117530	-11.4026	-15.6638	-19.3247	-18.1979	-18.4466
ZINC03117688	-13.8162	-22.7487	-17.5878	-12.7529	-15.8741
ZINC03118782	-17.0376	-18.4926	-17.9883	-9.1720	-13.4062
ZINC03121374	-19.2756	-20.2546	-18.3058	-16.1592	-19.3181
ZINC03121375	-20.7378	-22.5534	-25.4073	-20.6490	-21.3893
ZINC03121378	-17.5754	-18.7518	-17.3283	-15.8883	-18.7423
ZINC03121789	-20.0785	-24.7364	-25.1819	-20.3981	-22.1632
ZINC03124464	-27.8052	-31.3997	-27.7565	-24.2272	-28.8197
ZINC03124796	-14.4747	-19.5017	-12.4051	-13.6985	-19.2684
ZINC03126577	-19.2064	-26.0704	-25.1756	-22.7987	-22.6947
ZINC03128507	-11.5489	-19.1348	-17.2782	-18.5527	-13.7511
ZINC03128570	-8.8642	-13.0893	-14.4393	-12.7241	-10.6427
ZINC03128625	-23.5723	-28.1051	-28.7474	-28.6740	-23.8968
ZINC03132103	-10.9727	-11.7626	-16.9278	-13.4591	-13.6217
ZINC03132133	-5.5469	-7.5796	-8.5585	-7.9854	-8.5506
ZINC03132166	-6.6601	-10.2280	-9.7081	-10.5698	-9.3850
ZINC03132258	-19.6422	-14.0767	-21.1110	-19.1135	-23.2854
ZINC03132393	-7.8685	-9.5689	-7.6768	-11.2793	-8.7832
ZINC03132774	-19.0621	-23.0431	-19.0590	-21.3529	-18.6614
ZINC03133056	-13.3936	-13.2785	-13.1605	-15.7172	-15.9986
ZINC03133057	-12.1567	-13.1343	-14.2718	-16.6567	-14.5171
ZINC03133652	-23.2316	-24.2290	-16.8737	-21.6411	-21.7638
ZINC03149143	-18.3881	-20.4399	-14.5462	-13.6427	-14.4838
ZINC03150443	-15.1802	-17.5072	-14.1662	-14.9094	-17.6687
ZINC03153743	-18.1834	-25.7035	-16.2161	-25.8430	-20.0546
ZINC03153744	-16.7388	-17.1765	-17.9748	-18.3242	-18.3672
ZINC03155004	-13.4613	-17.3889	-17.5834	-12.6542	-13.7415
ZINC03156367	-10.2640	-10.2666	-10.7248	-13.2479	-12.5371
ZINC03156801	-16.4333	-19.7085	-20.4701	-14.5178	-16.6904
ZINC03157349	-11.9024	-18.0946	-16.3665	-18.7928	-14.2614
ZINC03158665	-10.7045	-19.8158	-13.9871	-21.2289	-17.3388
ZINC03160190	-19.1933	-20.3205	-20.2165	-23.3145	-22.4910
ZINC03160306	-16.8430	-15.5596	-19.1465	-16.5814	-18.3459
ZINC03160701	-25.2071	-26.3277	-24.9756	-25.7758	-24.2698
ZINC03160702	-22.2446	-28.6950	-25.2406	-27.3704	-22.6047
ZINC03167323	-16.7750	-18.4783	-16.4109	-18.4087	-15.9203
ZINC03167326	-15.8125	-17.5605	-16.3411	-17.7443	-18.5409
ZINC03170829	-19.6567	-19.3410	-20.7357	-25.1161	-18.6982
ZINC03171598	-23.8902	-18.1677	-23.3550	-21.2818	-27.5867
ZINC03172802	-15.3255	-21.0212	-15.5649	-15.9512	-14.9369
ZINC03176217	-6.8819	-17.9444	-11.2058	-11.9481	-16.4311
ZINC03177023	-11.9968	-9.9230	-11.0488	-14.0087	-13.8738
ZINC03177205	-12.7301	-14.5415	-16.9156	-17.2818	-12.6860
ZINC03178775	-10.4472	-14.7186	-16.1236	-12.7273	-12.5203
ZINC03184615	-12.1241	-18.2246	-12.2328	-9.9806	-10.5939
ZINC03194465	-21.7042	-24.4675	-25.4074	-20.0059	-20.3886
ZINC03194470	-20.9933	-23.0264	-27.4391	-25.5795	-22.0070

ZINC03199121	-20.2611	-20.8376	-24.5374	-25.8112	-21.1603
ZINC03201566	-15.9467	-20.4105	-18.9347	-167480	-17.8024
ZINC03202022	-22.8670	-25.1790	-24.3833	-19.5061	-22.7020
ZINC03202024	-19.5662	-18.3601	-10.7539	-12.3116	-19.6585
ZINC03205673	-20.7485	-22.2383	-25.2357	-19.3381	-21.6221
ZINC03206040	-17.7637	-23.4047	-21.3568	-17.3492	-19.3093
ZINC03201566	-15.9467	-20.4105	-18.9347	-167480	-17.8024
ZINC03206041	-26.5026	-27.5277	-23.4865	-16.7183	-25.8272
ZINC03207870	-18.3250	-19.1717	-18.8681	-10.1484	-16.7307
ZINC03210451	-20.8743	-20.6523	-22.7673	-21.6949	-22.2340
ZINC03225671	-20.0147	-29.5510	-22.1854	-20.4131	-20.9812
ZINC03225964	-19.6284	-26.3909	-20.2395	-19.2759	-15.8754
ZINC03225965	-19.6267	-22.6641	-16.4702	-19.9328	-17.0295
ZINC03225966	-18.1790	-28.4257	-17.9720	-20.0356	-20.1332
ZINC03229537	-19.6072	-27.0372	-20.3517	-21.5160	-20.9159
ZINC03229610	-17.4992	-22.9086	-22.1784	-17.5188	-19.7319
ZINC03229611	-19.6280	-25.6437	-19.3226	-16.6110	-16.9977
ZINC03229613	-19.6640	-26.6722	-21.6026	-21.4444	-15.8936
ZINC03230850	-20.6215	-23.9323	-23.0574	-23.2260	-20.2319
ZINC03230851	-17.0886	-23.4730	-20.1699	-14.5707	-17.2541
ZINC03376818	-23.6622	-27.1267	-28.4180	-28.8041	-28.8753
ZINC03292400	-13.2782	-13.6164	-5.7201	-15.6834	-16.4159
ZINC03296609	-15.5299	-19.2759	-22.7107	-21.1128	-19.8097
ZINC03308263	-19.9626	-25.9017	-23.2668	-20.8333	-18.9885
ZINC03308272	-16.1966	-23.2385	-20.8978	-19.7353	-18.4648
ZINC03317536	-18.6152	-23.0268	-16.6789	-20.3583	-17.4350
ZINC03322201	-18.0230	-20.2669	-21.7776	-18.2230	-22.6728
ZINC03346210	-21.0963	-26.7693	-27.7160	-20.6144	-21.3101
ZINC03352490	-11.7324	-11.1138	-20.0496	-17.6525	-19.0862
ZINC03354329	-15.8244	-19.8524	-19.8370	-14.5536	-20.4531
ZINC03354331	-20.1095	-17.9212	-17.0105	-18.8182	-19.9456
ZINC03376818	-23.6622	-27.1267	-28.4180	-28.8041	-28.8753
ZINC03377782	-13.2470	-20.5653	-11.2676	-11.2896	-13.3806
ZINC03466665	-19.5372	-19.9907	-22.8274	-13.4488	-17.6709
ZINC03470001	-12.2011	-13.9457	-15.4439	-13.3562	-16.7577
ZINC03470009	-19.7416	-17.7158	-19.3709	-13.8437	-19.6143
ZINC03470027	-18.0775	-22.8642	-22.3287	-12.0581	-18.1038
ZINC03470088	-19.0872	-27.3133	-24.9036	-28.0074	-19.3735
ZINC03470187	-19.8751	-18.9571	-24.2665	-12.3489	-22.5143
ZINC03486755	-18.3161	-18.5931	-23.1410	-13.5211	-21.8858
ZINC03618946	-23.7760	-27.8538	-22.8814	-17.7771	-27.7092
ZINC03618949	-22.8168	-26.4094	-22.4823	-20.5829	-22.8291
ZINC03618952	-25.0308	-23.6489	-24.1142	-22.9540	-28.6613
ZINC03618954	-22.8806	-23.4172	-25.1205	-20.9622	-23.0081
ZINC03626195	-16.7286	-19.8215	-17.5452	-19.4337	-15.7985
ZINC03635817	-12.3478	-14.2328	-11.8213	-14.5589	-15.9320
ZINC03641270	-15.9693	-18.9265	-20.1658	-20.2789	-16.4338
ZINC03641271	-18.9181	-17.8730	-16.9295	-21.7846	-16.1825
ZINC03646872	-21.4996	-18.8341	-19.3277	-24.9716	-20.6912
ZINC03646874	-21.0098	-17.2037	-19.1459	-25.3527	-18.5411
ZINC03646878	-20.8889	-19.7049	-19.2311	-19.5999	-17.4196
ZINC03646884	-18.0663	-19.8536	-19.2460	-12.0709	-19.8403
ZINC03647690	-15.6133	-19.9348	-17.8800	-20.4977	-16.5448
ZINC03647691	-19.9214	-20.3158	-15.5922	-21.0839	-15.3963
ZINC03650280	-21.9171	-28.8195	-24.7803	-24.6175	-24.3519
ZINC03651034	-15.0519	-17.1193	-14.8081	-16.3889	-15.7797
ZINC03651892	-20.6687	-22.9588	-25.3189	-16.5863	-23.0843
ZINC03663073	-23.8558	-30.0212	-24.5226	-20.7364	-28.9491

ZINC03663074	-20.4272	-31.2961	-27.7894	-21.8000	-28.5880
ZINC03666018	-13.5159	-18.8628	-16.8721	-20.7421	-19.7052
ZINC03666019	-12.6331	-14.6109	-18.9248	-18.3332	-18.2441
ZINC03669935	-21.3222	-20.8443	-19.8484	-21.3496	-24.8849
ZINC03669936	-20.9552	-21.5416	-22.9244	-22.2796	-25.3692
ZINC03669937	-23.2346	-21.7550	-26.0079	-28.2547	-27.7395
ZINC03669938	-24.7098	-22.0409	-21.1329	-24.3794	-25.8391
ZINC03670085	-23.0231	-21.8099	-26.3217	-20.9952	-22.9725
ZINC03670086	-22.7221	-21.0765	-24.5783	-24.1698	-23.7989
ZINC03670087	-21.5243	-22.5025	-26.9430	-26.6556	-22.9299
ZINC03670088	-19.8715	-23.2059	-22.2721	-24.1622	-22.6033
ZINC03672420	-16.2546	-19.7992	-10.4773	-12.7824	-18.4696
ZINC03780014	-30.2696	-27.8891	-25.9802	-25.9481	-26.1492
ZINC03783188	-19.5257	-26.8999	-19.9630	-23.2313	-20.3861
ZINC03786507	-15.5020	-30.7552	-25.8801	-17.0742	-27.2980
ZINC03789145	-15.3375	-24.2733	-15.7647	-24.0113	-20.8845
ZINC03789788	-9.3811	-13.6051	-22.2173	-11.2191	-14.5153
ZINC03791295	-30.2833	-27.5519	-13.8392	-28.4099	-28.5965
ZINC03791818	-19.3461	-18.3404	-14.9609	-16.4753	-17.3397
ZINC03800222	-20.0925	-23.0517	-18.4745	-17.8194	-20.6238
ZINC03800230	-14.4174	-20.2131	-18.1531	-19.6968	-21.5185
ZINC03801120	-23.8470	-26.1241	-23.1938	-20.9637	-25.5964
ZINC03805040	-15.1964	-15.6792	-14.2302	-13.6394	-13.0284
ZINC03805041	-15.2102	-17.3211	-17.3368	-14.9677	-13.5996
ZINC03818031	-6.9238	-15.9078	-10.0455	-19.6081	-11.6369
ZINC03818531	-18.4148	-22.5259	-20.8386	-18.6325	-17.9659
ZINC03818628	-20.5981	-23.9382	-13.5967	-27.7855	-20.5338
ZINC03818629	-24.8718	-24.7018	-25.1754	-24.0635	-24.5297
ZINC03820526	-26.0900	-21.3738	-21.0279	-22.5137	-24.6456
ZINC03820678	-15.9446	-10.4962	-8.9538	-11.5093	-9.7485
ZINC03820709	-25.2117	-31.0957	-25.6893	-28.0089	-21.1527
ZINC03821385	-16.9670	-18.3168	-13.2734	-14.7633	-15.6453
ZINC03826235	-29.0341	-28.9176	-29.5481	-27.4547	-26.3246
ZINC03830635	-18.6803	-29.0585	-28.6958	-14.1439	-21.1311
ZINC03832513	-25.2187	-28.1414	-20.1323	-28.5225	-27.5216
ZINC03843083	-30.1921	-27.7118	-26.2569	-25.3740	-29.0336
ZINC03870324	-16.3698	-16.1373	-13.8057	-14.6721	-11.6651
ZINC03871390	-26.5814	-31.0972	-15.1539	-28.2722	-29.2417
ZINC03871391	-21.0496	-23.5000	-22.2843	-24.1393	-27.9437
ZINC03871392	-26.8079	-17.2329	-23.4562	-28.7990	-28.4782
ZINC03871393	-22.3477	-20.0673	-25.7115	-22.7030	-23.9235
ZINC03871647	-10.2668	-17.6520	-18.0185	-10.2157	-16.4988
ZINC03871648	-12.5388	-17.3451	-16.2582	-9.2851	-16.0572
ZINC03871649	-9.7291	-15.8240	-16.2702	-13.2956	-13.9552
ZINC03871797	-17.8909	-23.4199	-26.6152	-20.1420	-21.7010
ZINC03872288	-25.9795	-29.1704	-26.5468	-24.5918	-24.3190
ZINC03872704	-27.0783	-30.7821	-24.0743	-24.7361	-24.4338
ZINC03872971	-26.5748	-28.8395	-27.5140	-36.8396	-29.4593
ZINC03872981	-16.5728	-28.3527	-23.8380	-24.4031	-18.5382
ZINC03873570	-16.0356	-23.4699	-8.4032	-8.0945	-10.5004
ZINC03873619	-25.5394	-27.6922	-30.0993	-25.3679	-21.9148
ZINC03873635	-21.7408	-25.6000	-23.9241	-23.4559	-25.9192
ZINC03873638	-21.1607	-20.2952	-26.0359	-26.6284	-19.8415
ZINC03873639	-18.1397	-19.8907	-15.8937	-18.6833	-18.6203
ZINC03876642	-9.4103	-25.4826	-8.2023	-11.8171	-17.4731
ZINC03876644	-12.6705	-18.6876	-10.5829	-17.9681	-14.0091
ZINC03876646	-19.6326	-30.3311	-11.0330	-17.6452	-22.6987
ZINC03876650	-16.3531	-22.7970	-13.7065	-23.0582	-26.3361

ZINC03876651	-24.2048	-23.4058	-1.0767	-7.6738	-19.7923
ZINC03876652	-7.5434	-8.3508	-4.1381	-3.8665	-8.8402
ZINC03876654	-4.7684	-11.0889	-4.4365	-4.6213	-8.7021
ZINC03876658	-17.8483	-23.3992	-15.9545	-16.4672	-16.4543
ZINC03876659	-15.6352	-22.5832	-16.6386	-15.0909	-21.3678
ZINC03876660	-15.0043	-14.0873	-8.2131	-15.8547	-12.1595
ZINC03876661	-13.2580	-20.4823	-16.9423	-15.4964	-12.3099
ZINC03876663	-11.5324	-10.5564	-8.1255	-7.9334	-11.3131
ZINC03876665	-10.0511	-13.1603	-6.2248	-7.0644	-8.9781
ZINC03876666	-13.7054	-17.1193	-16.4728	-17.1282	-15.9177
ZINC03876667	-16.3744	-17.3704	-12.7746	-15.9297	-16.3605
ZINC03876670	-9.5906	-24.1463	-16.3685	-16.2058	-24.1165
ZINC03876673	-16.1303	-21.1140	-11.3356	-9.6384	-12.3916
ZINC03876674	-14.0992	-20.1306	-11.1536	-13.5493	-11.9121
ZINC03876676	-23.3117	-27.7897	-19.6475	-29.6280	-20.3655
ZINC03876682	-16.8859	-17.6373	-20.7589	-19.0802	-15.5910
ZINC03876683	-15.7093	-21.1962	-18.2653	-19.8908	-17.4380
ZINC03876703	-9.5797	-17.3296	-7.5969	-16.0307	-12.4509
ZINC03876705	-11.0652	-14.5597	-11.9103	-17.3315	-14.7391
ZINC03876706	-7.7487	-13.1905	-10.0175	-15.2220	-9.3015
ZINC03876708	-8.5849	-20.2405	-8.0090	-21.1071	-18.0217
ZINC03883194	-17.9121	-23.7500	-22.7032	-18.9431	-18.0865
ZINC03883347	-18.8601	-23.6880	-20.6484	-24.1790	-20.3061
ZINC03883348	-20.5299	-21.1866	-20.4276	-21.5609	-19.5566
ZINC03883349	-18.5238	-20.3916	-20.4271	-23.0186	-19.5536
ZINC03884538	-11.1684	-21.8186	-13.6508	-14.6443	-14.5715
ZINC03884539	-10.9474	-21.9257	-15.3021	-16.7864	-17.5805
ZINC03888597	-22.3590	-23.2539	-22.8309	-21.1473	-20.1274
ZINC03893904	-27.0120	-22.5090	-22.1493	-24.0480	-21.9950
ZINC03893905	-15.5158	-26.7681	-16.1989	-17.6688	-18.3065
ZINC03900037	-15.0703	-22.7494	-17.5438	-12.6436	-16.9623
ZINC03924245	-17.4023	-13.9683	-15.8289	-20.2747	-17.8086
ZINC03938683	-23.3779	-23.2290	-26.9072	-22.3548	-28.4871
ZINC03954509	-19.2580	-23.0325	-25.4899	-28.6009	-21.1114
ZINC03963005	-13.5230	-14.1602	-7.2071	-11.6636	-13.5147
ZINC03964489	-14.2861	-17.6620	-16.0538	-19.9849	-21.2151
ZINC03985292	-13.7287	-15.2871	-16.0195	-16.2710	-11.3460
ZINC03985293	-10.4719	-14.9540	-10.6026	-10.7377	-16.2493
ZINC03985294	-14.3225	-17.5229	-10.1331	-10.4583	-14.9345
ZINC03985296	-10.3266	-17.1750	-5.9767	-5.8009	-16.6589
ZINC03985298	-7.6446	-9.5676	-8.0910	-9.2731	-12.9844
ZINC03985299	-11.8951	-11.2274	-9.3990	-8.6728	-16.5848
ZINC03985300	-6.0160	-11.9898	-5.6042	-4.2655	-15.0666
ZINC03985301	-9.0530	-14.1423	-3.5804	-8.6824	-10.5030
ZINC03985304	-17.1122	-29.8317	-22.2737	-28.4954	-24.9166
ZINC03985306	-20.2612	-14.9160	-14.6435	-28.4954	-16.9979

البحث عن جزيئات نشطة بيولوجيا جديدة عن طريق الفحص الظاهري والتطبيقات لتنشيط البيتيد ديفورميلاس

ملخص

زيادة مقاومة البكتيريا للعلاج المضاد للبكتيريا يطرح مشكلة صحية هائلة ويجعل تطوير مركبات مضادة للجراثيم جديدة مع آلية جديدة للعمل حاجة ملحة. البيتيد ديفورميلاس و هو ميتالوانزيم الذي يزيل مجموعة N- فورميل من N - ميثيونين من الببتيدات الجديدة هو هدف مهم في اكتشاف المركبات المضادة للبكتيريا.

في هذه الدراسة عرضنا الفحص الظاهري على أساس هيكل الهدف لقاعدة البيانات زينك من أجل اكتشاف المركبات المحتملة كمثبطات الإنزيم بيتيد ديفورميلاس البكتيرية مع أكثر تقارب مقارنة مع المثبط المعروف سابقا GSK1322322

بعد الفحص الظاهري، تم شراء 15 مركب من أعلى النتائج المتوقعة و تقييمها في المختبر لدراسة أنشطتها المضادة للبكتيريا ضد اثنين من البكتيريا موجبة غرام (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) و ثلاث بكتيريا سالبة غرام (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) في تراكيز مختلفة بواسطة طريقة نشر القرص. من بين هذه المركبات، ثلاثة مركبات، ZINC00039650، ZINC00126407 و ZINC03872971، أظهرت منطقة كبيرة من التنشيط. تم التأكد من النتائج التي تم الحصول عليها باستخدام طريقة التخفيف.

في نهاية هذه الدراسة، نقترح هذه الجزيئات الثلاثة كعوامل مضادة للجراثيم جديدة أكثر فعالية.

الكلمات المفتاحية: المضادات الحيوية؛ البيتيد ديفورميلاس. الفحص الظاهري. قاعدة البيانات زينك

Search for new bioactive molecules by virtual screening and applications to the inhibition of peptide déformylase

Abstract

The increasing resistance of bacteria to antibacterial therapy poses an enormous health problem, it renders the development of new antibacterial agents with novel mechanism of action an urgent need. Peptide deformylase, a metalloenzyme which catalytically removes N-formyl group from N-terminal methionine of newly synthesized polypeptides, is an important target in antibacterial drug discovery.

In this study, we reported the structure-based virtual screening of ZINC database in order to discover potential hits as bacterial peptide deformylase enzyme inhibitors with more affinity as compared to GSK1322322, previously known inhibitor.

After virtual screening, fifteen compounds of the top hits predicted were purchased and evaluated in vitro for their antibacterial activities against two Gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and three Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) bacteria in different concentrations by disc diffusion method. Out of these, three compounds, ZINC00039650, ZINC03872971 and ZINC00126407, exhibited significant zone of inhibition. The results obtained were confirmed using the dilution method.

At the end of this study, we propose these three compounds as new and more efficient antibacterial agents.

Keywords : Antibiotic, peptide deformylase, virtual screening, ZINC database.

Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase

Résumé

La résistance croissante des bactéries à la thérapie antibactérienne pose un énorme problème de santé, elle rend le développement de nouveaux agents antibactériens avec un nouveau mécanisme d'action un besoin urgent. La peptide déformylase, une métalloenzyme qui élimine par voie catalytique le groupe N-formyle de la méthionine N-terminale des polypeptides nouvellement synthétisés, est une cible importante dans la découverte de médicaments antibactériens.

Dans cette étude, nous avons réalisé un criblage virtuel basé sur la structure de cette cible à partir de la banque de données ZINC afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs potentiels de la peptide déformylase bactérienne avec plus d'affinité par rapport au GSK1322322, inhibiteur précédemment connu.

Après le criblage virtuel quinze composés, parmi les meilleurs prédits, ont été achetés et évalués *in vitro* pour leurs activités antibactériennes contre trois bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*) et deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*) à différentes concentrations par la méthode de diffusion sur disque. Parmi ceux-ci, trois composés, ZINC00039650, ZINC03872971 et ZINC00126407 ont développé une zone d'inhibition significative. Les résultats obtenus ont été confirmés par la méthode des dilutions.

A l'issue de cette étude, nous proposons ces trois molécules comme de nouveaux agents antibactériens potentiellement plus efficaces.

Mots clés : Antibiotique, peptide déformylase, criblage virtuel, banque de données ZINC.

Virtual Screening Approach of Bacterial Peptide Deformylase Inhibitors Results in New Antibiotics

Amina Merzoug,^{*[a, b]} Abdelouahab Chikhi,^[a] Abderrahmane Bensegueni,^[a] Hanane Boucherit,^[a, b] and Sezer Okay^[c]

Abstract: The increasing resistance of bacteria to antibacterial therapy poses an enormous health problem, it renders the development of new antibacterial agents with novel mechanism of action an urgent need. Peptide deformylase, a metalloenzyme which catalytically removes N-formyl group from N-terminal methionine of newly synthesized polypeptides, is an important target in antibacterial drug discovery. In this study, we report the structure-based virtual screening of ZINC database in order to discover potential hits as bacterial peptide deformylase enzyme inhibitors with more affinity as compared to GSK1322322, previously known inhibitor. After virtual screening, fifteen compounds

of the top hits predicted were purchased and evaluated *in vitro* for their antibacterial activities against one Gram positive (*Staphylococcus aureus*) and three Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) bacteria in different concentrations by disc diffusion method. Out of these, three compounds, ZINC00039650, ZINC03872971 and ZINC00126407, exhibited significant zone of inhibition. The results obtained were confirmed using the dilution method. Thus, these proposed compounds may aid the development of more efficient antibacterial agents.

Keywords: antibiotic · peptide deformylase · virtual screening · zinc database

1 Introduction

The emergence of multi-drug resistance is of great concern. Gram-positive bacteria like *S. aureus*, *E. faecalis* and *M. tuberculosis*, posing the most serious treatment challenges with increasing incidence of drug resistant isolates.^[1,2] Among Gram-negative bacteria, the drug resistant pathogens of greatest concern are *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.^[3–5] Therefore, identification of a new target which is previously untapped will play a critical role in the development of new antibacterial compounds active against resistant pathogens. One target that has not received much attention until recently is peptide deformylase (PDF, EC 3.5.1.88), It is an attractive target for the discovery of novel antibiotics with novel mechanism of action. It is a metalloenzyme which catalytically removes N-formyl group from N-terminal methionine of newly synthesized polypeptides which is an essential step in bacterial protein maturation.^[6]

Number of peptidic and non-peptidic compounds had been developed as PDF inhibitors with thiol, carboxylate, hydroxamate, phosphonate or N-formyl-hydroxylamine as metal-binding group,^[7] only compounds containing hydroxamic acid or N-formyl-hydroxylamine exhibit appreciable antibacterial activity.^[8–12] Amongst these inhibitors, BB-83698,^[11] NVPPDF-713^[13] and GSK1322322^[14] progressed up to phase I of clinical trials, however, only GSK1322322 showed good pharmacokinetic properties in phase I and promising proof of concept results in phase II.

The search for new antibacterial agents is time and cost-consuming.^[15] Recently virtual screening (VS) techniques

have gained much interest in many drug development strategies.^[16] It uses bioinformatics methods to identify new drugs on the basis of receptor (docking) or ligand structures.


VS is a fast and cheap method, it can reduce the space of a chemical database to test the biological activity of selected products against a specific target protein. Molecular docking is a computational method of structure based drug development to simulate and predict the binding affinities and the interaction modes of ligands for a therapeutic target.^[17]

In the present study our aim was to search potential inhibitors targeting putative four bacterial peptides deformylase binding sites by applying a strategy that combined computational docking method with a microbiological assay.

[a] A. Merzoug, A. Chikhi, A. Bensegueni, H. Boucherit
Laboratory of Applied Biochemistry, Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Mentouri Brothers University, Constantine 1 – Algeria
phone: +213-661-518-592
E-mail: a.merzoug@centre-univ-mila.dz

[b] A. Merzoug, H. Boucherit
Abdelhafid.Boussouf University Center, Mila, Algeria

[c] S. Okay
Department of Biology, Faculty of Sciences, Cankiri Karatekin University, Turk

 Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/minf.201700087>

2 Materials and Methods

2.1 Target Preparation

The peptide deformylase (PDF) represents an important target for the discovery of new antibacterial drugs.^[14,18] Numerous PDF structures co-crystallized with several ligands have been determined by X-Ray crystallography and NMR.

The ligand-bound crystal structures of PDFs from selected pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* were retrieved from RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) with PDB ID: 1S17, 2A18, 3U7K and 2A1E respectively.^[19–22] The retrieved PDF structures were used for active pocket and ligands binding modes predictions and analysis.

These four dimensional structures were chosen for their high resolutions. The characteristics of these enzymes are summarized in Table 1 below.

The PDF crystallographic structures were downloaded in the .pdb format.

2.2 Ligand Database

For the *in silico* structure based drug screening, we used Zinc database, a commercially-available chemical compounds library.

ZINC is a free database (<http://zinc.docking.org>) of 35 million compounds in ready to dock formats (SDF, MOL2 and SMILE), with vendors and compounds proprieties information.

2.3 Virtual Screening Procedure

The overview of the virtual screening procedure is presented in Figure 1.

Ligands were screened from ZINC database on the basis of structurally known PDF inhibitors (Actinonin, BB-3497, LMB415, GSK1322322...),^[12,14,23,24] by setting hydroxamate or N-formyl hydroxylamine as reference fragment, which is a valid fragment in PDFs inhibitors.^[14,23–26]

The Enhanced Zinc Database Browser was used to search all compounds containing an hydroxamate or N-

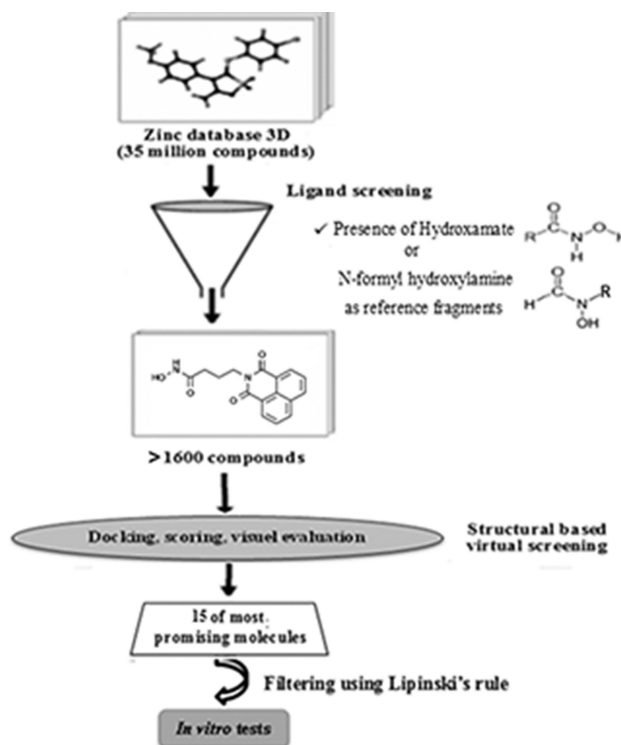


Figure 1. The Overview of the screening procedure

formyl hydroxylamine group. The selected compounds were downloaded as 3D SDF files.

The structures selected from the Zinc Database were used to conduct searches by structure based screening using molecular docking to investigate their binding mode with four human pathogenic bacteria peptide deformylase using FlexX (2,1,8, 2014),^[27] a molecular docking program.

Molecular docking is a computational tool of structure based drug discovery to simulate and predict the binding mode and binding affinity of a protein-ligand complex. Docking comprises two steps, firstly, the prediction of favorable binding mode for a ligand in the active site of a target protein, the second step being the estimation of the binding energy of the formed protein-ligand complex.^[28,29]

Table 1. Main characteristics of the codes 1S17, 2A18, 3U7K and 2A1E

Code	Organism	Resolution (Å ^o)	R factor	Number of chain	Number of amino acid by chain	Metallic ion
1S17	<i>P. aeruginosa</i>	1.95	0.233	2	180	Ni
2A18	<i>E. coli</i>	1.7	0.226	3	168	Ni
3U7K	<i>S. aureus</i>	1.9	0.266	1	191	Zn
2A1E	<i>S. pneumoniae</i>	1.7	0.258	1	203	Ni

2.4 FlexX

The FlexX molecular modeling program was used to conduct virtual structure screening. It is one of the best protein-ligand docking software,^[30–33] it has proved to be successful in many potential hits identify applications.^[34–38] Several therapeutic agents have been discovered with FlexX and are on the market.^[39] It is a docking tool that predicts protein–ligand conformations and binding energies. It uses an incremental construction algorithm where rigid base fragment is docked into the binding site first, after the ligand is constructed fragment by fragment.^[40] The scoring is evaluated using the modified Bohm's scoring function (Equation 1),

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} \times N_{\text{rot}} \\ & + \Delta G_{\text{hb}} \sum_{\text{neutral H-bonds}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{\text{io}} \sum_{\text{ionic int}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{\text{aro}} \sum_{\text{aro int}} f(\Delta R, \Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{\text{lipo cont}} f^*(\Delta R) \end{aligned} \quad (1)$$

The docking by FlexX is performed in three steps:

1) Preparing receptor

- Loading the receptor directly from the PDB by inserting its code ID
- Positioning the hydrogen atoms on the basis of intramolecular geometry
- Selecting the chain that will be used in docking
- Selecting the co-factors or the co-enzymes
- Defining binding site
- Adding water molecules in the active site
- Confirming the receptor

2) Defining ligand

- Loading one or several ligands, in SDF or MOL2 format

3) Docking the ligand to the binding site

The top hits predicted by molecular docking using FlexX were further filtered by selecting only those molecules which obeys Lipinski rule of five.^[41]

2.5 Lipinski Rule

The rule of five postulated by Christopher Lipinski^[41] can determine if a chemical product with a biological activity has properties that would make it a likely orally active drug in humans.

Lipinski's Rule of Five state that likely orally active drug must complete two of these four proprieties:

- No more than 5 hydrogen bond donors
- No more than 10 hydrogen bond acceptors
- The Molecular weight under 500 g/mol⁻¹
- The Log P below 5

In addition, Veber has introduced a supplementary criteria, the number of rotatable bonds must be less than 10.^[42]

2.6 Growth Inhibition of Four Bacteria with New Compounds

Fifteen of the best compounds of previous study were evaluated *in vitro* for their antibacterial activities against four different bacterial strains which are *E. coli* (ATCC25922), *P. aeruginosa* (ATCC27853), *S. aureus* (ATCC25923) and *K. pneumoniae* (ATCC700603).

All of the chemical compounds were purchased from the Ambinter c/o Greenpharma (Orleans, France) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) for the *in vitro* assays. The chemical compounds used were the following:

Zinc01187537, Zinc00034434, Zinc00162966, Zinc00162966, Zinc01430255, Zinc00162979, Zinc00500969, Zinc01428769, Zinc03872971, Zinc00039650, Zinc00126407, Zinc01455744, Zinc01393372, Zinc01455730, Zinc01428755, and Zinc01403330, (ZINC IDs).

The growth inhibition activity of each inhibitor of PDFs was tested by the paper disc diffusion method in nutrient broth from 24 h old bacterial cultures at 37 °C. The bacterial suspension was adjusted with sterile saline and inoculated on the surface of Mueller-Hinton agar plates.

Initially compounds powders were dissolved at a concentration of 30 mg/ml and 60 mg/ml in DMSO. Paper discs (diameter 6 mm) were placed on Petri plates and impregnated with 5 µl of each solution, with DMSO as solvent control (5 µl) and ciprofloxacin (5 µg/disc) as positive control. Growth inhibition was examined after one night incubation at 37 °C. Antibacterial assays were performed in duplicates.

The active products of the previous study were than tested to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for each bacterial strain and to confirm the results obtained. All bacteria were grown in nutrient broth at 37 °C for 48 h. After, 50 µL of 5.10⁵ CFU/ml was inoculated in tubes with 700 µL of nutrient broth in the presence of 250 µL of the products at variable concentration (from 256 to 1 µg/ml). After 16–20 h at 37 °C,^[43] the lowest concentration that did not show any visible growth was considered as MIC.^[44] The assays were performed in duplicates and the results were expressed in µg/mL.

3 Results and Discussion

3.1 Ligands Screening

In order to find new active compounds, a series of more than 1600 structures were selected from Zinc Database by using hydroxamate and N-formyl hydroxylamine as reference fragments.

Our intention is to find a new series of hydroxamate and N-formylhydroxylamine derivatives and detect their antibacterial activities by applying molecular docking methods and antibacterial screening.

3.2 Molecular Docking Study

Numerous technologies such as bioinformatics analysis or molecular docking for addressing drug targets have been developed recently. Molecular docking involved prediction of a preferred binding mode of large number of ligands or drug candidates to their protein targets to predict their affinities and activities. Hence docking is a pharmaceutically significant technique that plays an important role in the rational drug design.^[34–39]

In order to study the interactions between our 1671 molecules selected by the ligand screening method and the active site residues of the four bacterial PDFs enzyme selected as drug target and to compare their scores, interaction energy, from the reference ligand which is GSK1322322, a known inhibitor,^[14] a molecular docking study using the version 2,1,8, 2014 of the program FlexX was performed.

Of the 1671 compounds tested, 394 compounds form energy values higher than the reference inhibitor, GSK1322322 (Supporting Information).

Docking results show that the selected molecules by the ligand based virtual screening method have different orientations in the binding pocket of PDFs enzymes because of their diversity on atomic composition and chemical property.

The docking analysis revealed that the compounds are held in the binding pocket by the formation of several hydrogen bonds and hydrophobic interactions, and most of the hydrogen bonds were allowed by the hydroxamate or the N-formylhydroxylamine group, which is very similar to GSK1322322.

The binding energies and molecular structures of fifteen of the best compounds and of the reference molecule, GSK1322322, with enzymes under study are presented in Table 2.

Interesting interactions were detected between the four bacterial PDFs and these fifteen compounds with high number of matches and high interaction energies values.

Among these inhibitors, compound ZINC03872971 showed the highest docking score of -36.8396 kJ/mol, showed highest binding affinity with the *P. aeruginosa* PDF, followed by compounds ZINC00126407 and ZINC01428769 ($\Delta G = -32.9272$ kJ/mol and -30.1684 kJ/mol respectively). Its binding orientation to the PDF is shown in Figure 2.

Compound ZINC03872971 chelates to the metal ion through the hydroxamic acid group, and its carbonyl and hydroxyl oxygen atoms act as a bidentate ligand for Ni^{2+} . ZINC03872971 forms a several hydrogen bonds with the key amino acids of the active site, such as Gly46, Ile45,

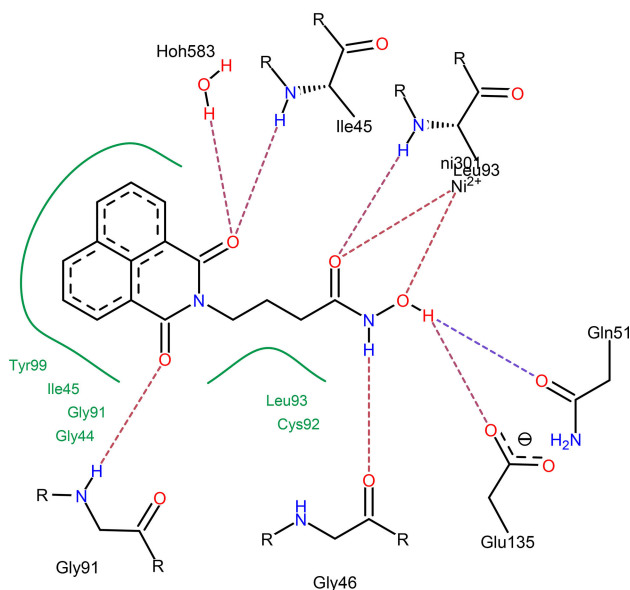


Figure 2. The docked poses of ZINC03872971 within the binding pocket of *P. aeruginosa* PDF showing their overall interactions (hydrogen bonds are shown in red dotted lines and hydrophobic interactions are shown in green lines)

Gln51, Gly91, Leu93, and Glu135.^[45–47] Besides, its isoquinolinyl group inserts into a hydrophobic pocket composed of Gly44, Ile45, Gly91 and Tyr99.

Docking analysis of the hydroxamate derivative revealed that compound ZINC01393372 and ZINC01187537 showing efficient bindings with all selected bacterial PDFs (Table 2). They showed the highest docking scores of -32.8282 kJ/mol and -32.4642 respectively with the *S. aureus* PDF, followed by compound ZINC00126407 and ZINC00162979 ($\Delta G = -31.2996$ kJ/mol and -31.1300 kJ/mol respectively).

The representative interaction mode of the compound ZINC01393372 with the binding pocket of *S. aureus* and *E. coli* PDFs are given in Figure 3 and 4. Compound ZINC01393372 binds in the binding pocket of *S. aureus* and *E. coli* PDFs through the formation of various distinct hydrogen bonds with selected amino acid residues.

The interaction profile of compound ZINC01393372 and *E. coli* PDF revealed that two hydrogen atoms of the inhibitor are hydrogen bond donors for the oxygen atoms of Gln50 and Glu133. As hydrogen bond acceptors, three oxygen atoms of compound ZINC01393372 interact with the hydrogen atoms of residues Gln50, Gly89, Leu91, and Glu133 (Figure 3), and the profile of the same compound and *S. aureus* PDF revealed that hydroxamic acid forms an ionic interaction with the metal center (Figure 4) and three hydrogen bonds with Gln65 and with Leu112, two by its carbonyl oxygen and one by its hydroxyl group.

The molecular docking showed that the compound ZINC01393372 is stabilized by hydrophobic interactions with Val50, Gly110 and Leu112.

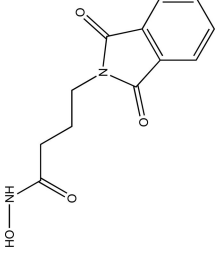
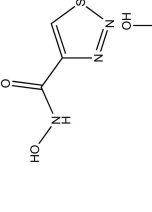
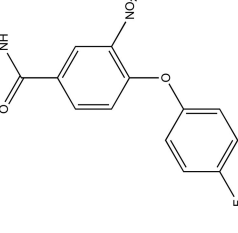
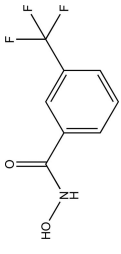
Table 2. Molecular structures, nomenclatures and predicted energies (kJ/mol) of fifteen of the best compounds with different bacterial PDFs.

Compound	Structure	Name	2A18 <i>E. coli</i>	2A1E <i>S. pneumoniae</i>	1S17 <i>P. aeruginosa</i>	3U7K <i>S. aureus</i>
GSK1322322		N-[(2R)-3-[2-[6-[(9aS)-3,4,6,7,9,9a-hexahydro-1H-pyrazino[2,1-c][1,4]oxazin-8-yl]-5-fluoro-2-methylpyrimidin-4-yl]hydrazinyl]-2-(cyclopentylmethyl)-3-oxopropyl]-N-hydroxyformamide	-26.6049	-23.2952	-21.7993	-31.8904
ZINC 01187537		1H-imidazole-4,5-dicarbohydroxamic-acid	-30.9474	-31.1087	-28.7659	-32.4642
ZINC 00344344		2,5-dimethylbenzene-1,4-dicarbohydroxamic-acid	-30.8880	-32.0422	-27.4118	-29.7140
ZINC 00162966		N,2-dihydroxy-5-methylbenzamide	-27.8499	-27.3023	-24.3264	-30.0906
ZINC 01430255		3-phthalimidopropanehydroxamic-acid	-24.1982	-24.3674	-28.4578	-30.2230
ZINC 00162979		4-Chloro-N,2-dihydroxybenzamide	-27.4461	-26.7422	-27.9988	-31.1300

Table 2. continued

Compound	Structure	Name	2A18 <i>E. coli</i>	2A1E <i>S. pneumoniae</i>	1S17 <i>P. aeruginosa</i>	3U7K <i>S. aureus</i>
ZINC 00500969		N-Hydroxy-2-quinolinecarboxamide	-30.8043	-29.3124	-26.8256	-28.3234
ZINC 03872971		4-(1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)-N-hydroxybutanamide	-27.5140	-26.5748	-36.8396	-28.1095
ZINC 01455730		2-(2-chloro-4,5-dimethoxy-phenyl) ethanhydroxamic-acid	-24.8680	-26.8608	-26.9301	-26.8608
ZINC 01428769		3-pyrrolidinobenzenecarbohydroxamic-acid	-31.6889	-30.3892	-30.1684	-29.0384
ZINC 00126407		N-hydroxy-2-(3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-2-yl)acetamide	-28.6786	-26.6770	-32.9272	-31.2996
ZINC 01455744		2-(2-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)ethanhydroxamic-acid	-26.9704	-23.9066	-26.5919	-26.0579

Table 2. continued

Compound	Structure	Name	2A18 <i>E. coli</i>	2A1E <i>S. pneumoniae</i>	1S17 <i>P. aeruginosa</i>	3U7K <i>S. aureus</i>
ZINC 01428755		4-phthalimidobutanedihydroxamic acid	-23.5473	-25.6418	-28.1613	-24.4482
ZINC 01403330		N-hydroxy-1,2,3-thiadiazole-4-carboxamide	-29.1806	-28.8472	-29.2132	-30.1374
ZINC 01393372		4-(4-fluorophenoxy)-N-hydroxy-3-nitrobenzenecarboxamide	-31.5692	-30.2228	-29.5150	-32.8282
ZINC 00039650		N-hydroxy-3-(trifluoromethyl)benzamide	-26.4851	-27.5980	-28.6427	-26.7776

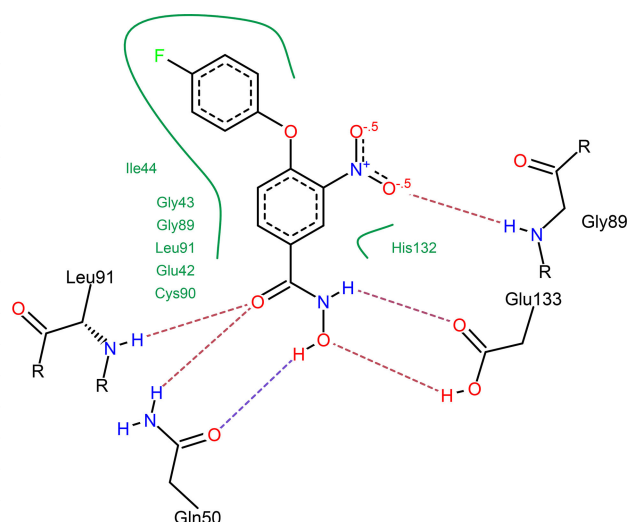


Figure 3. The docked structure of ZINC01393372 within the binding pocket of *E. coli* PDF showing their different interactions

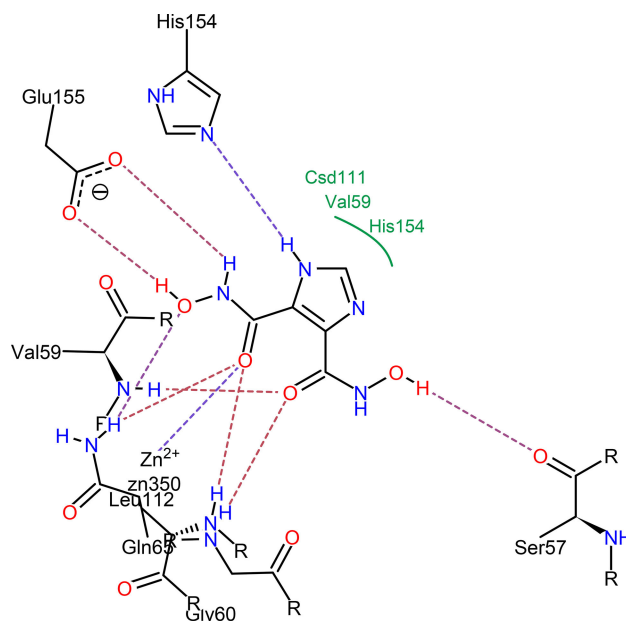


Figure 5. The docked poses of ZINC01187537 within the binding pocket of *S. aureus* PDF

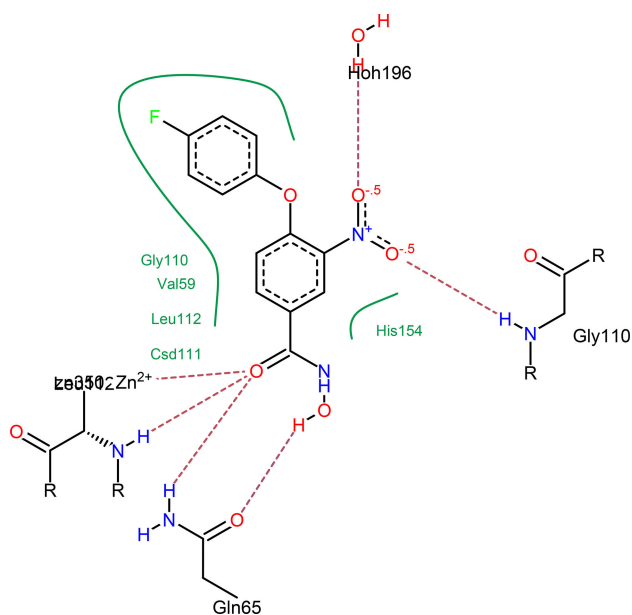


Figure 4. Docking results for ZINC01393372 with *S. aureus* PDF

The study of the inhibition mechanism of compound ZINC01187537 toward *S. aureus* PDF by molecular docking revealed that the compound forms weak interactions with the hydrophobic pocket (Figure 5). It is buried deep into the active site by forming hydrogen bonds by its dicarboxylic acid groups with Ser57, Val59, Gly60, Gln65, Leu112, His145 and Glu155 residues.

Of the fifteen inhibitors tested, the compound ZINC00344344 forms the most stable complex *S. pneumoniae* PDF-ligand, and had the best inhibitory effect with a binding energy value of -32.0422 kJ/mol, followed by compound ZINC01187537 ($\Delta G = -31.1087$ kJ/mol).

The stability of compound ZINC00344344 in the active site of *S. pneumoniae* PDF is thus dictated by its chelation to the metal ion via the carbonyl of the hydroxamate functional group, the hydrophobic interactions of its dimethylbenzene group within the hydrophobic pocket, and the intermolecular hydrogen binding interactions between the protein residues and the inhibitor. Figure 6 is the representation of the interactions exhibited by the compound ZINC00344344 in the enzyme active site.

Compound ZINC00039650 has only one electrophilic group, hydroxamate, and the rest is trifluoromethyl-benzyl group. Figure 7 shows that the compound ZINC00039650 penetrates well into the binding pocket of *S. pneumoniae* PDF, forming different interactions with amino acids of the active site. In particular, the metal binding group was involved in five hydrogen bonds (Figure 7), two by its carbonyl group with NH of Leu131 and metal ion, one by its NH with carbonyl of Gly71 and two by its hydroxyl with carbonyl of Gln76 and carboxyl of Glu174.

Hydrogen bonds are not solely responsible for the interaction of this compound with *S. pneumoniae* PDF, the role of hydrophobic interactions is also important in explaining. The ZINC00039650 is stabilized by hydrophobic interactions with Arg67, Gly69, Gly129, Cys130 and Leu131.

Among other ligands tested, compound ZINC01428769 and ZINC01393372 showed the highest docking scores of -31.6889 kJ/mol and -31.5692 kJ/mol respectively, followed by compound ZINC01187537, ZINC0034434 and ZINC00500969. They form the most stable complex *E. coli* PDF-inhibitor.

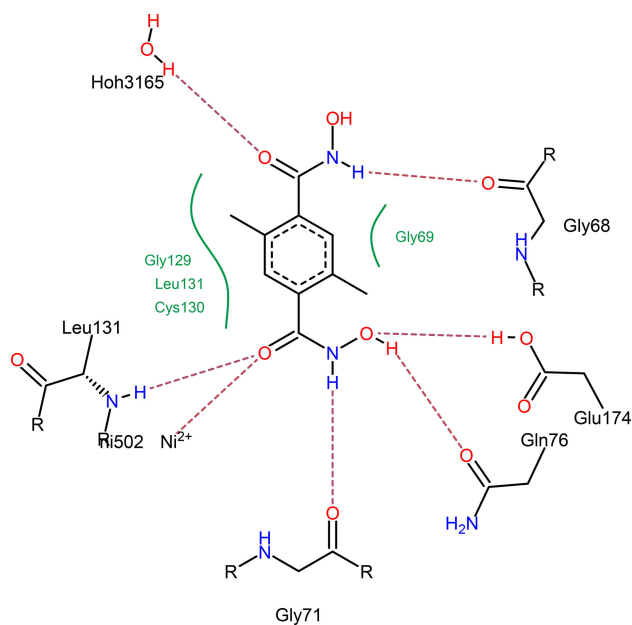


Figure 6. Docking results for ZINC00344344 with *S. pneumoniae* PDF

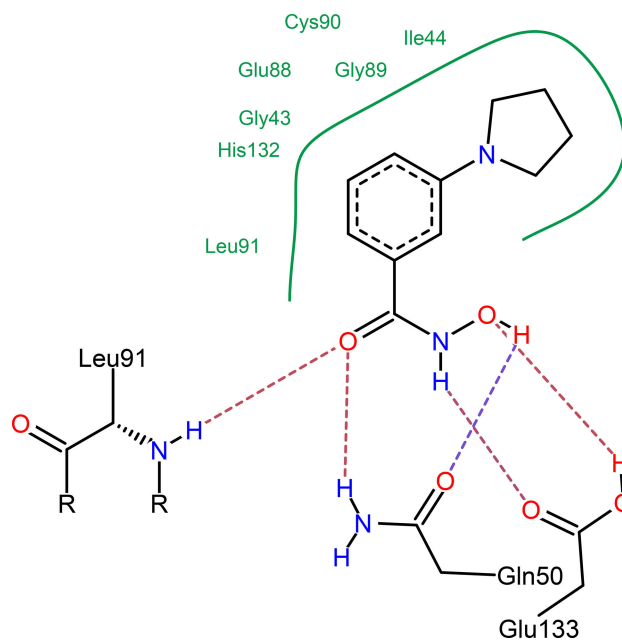


Figure 8. Interaction of compound ZINC01428769 with *E. coli* PDF

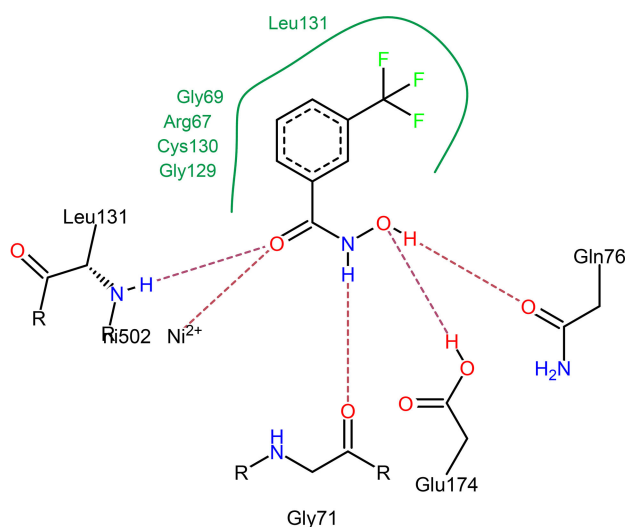


Figure 7. Binding modes of compound ZINC00039650 with the active site of *S. pneumoniae* PDF

The compound ZINC01428769 was inserted in active site of *E. coli* PDF by forming hydrophobic interactions with Gly43, Ile44, Gly89, Leu91, and His132 residues (Figure 8). The amino acids Gln50, Leu91 and Glu133 had formed hydrogen bonds with the hydroxamate group of compound ZINC01428769.

3.3 Drug-likeness Prediction

Several pharmacological active compounds fail to reach the clinical phases for their unfavorable pharmacokinetic properties. Therefore, a computational study of the top hits predicted by molecular docking using FlexX was performed for estimation of likeliness for absorption/permeation and values evaluated using Molinspiration chimio-informatics package^[48] are described in Table 3.

The estimation of likeliness for absorption/permeation revealed that the top hits predicted by molecular docking had obeyed Lipinski's rule of five, it could be observed that the pharmacokinetic properties of all those proposed compounds followed the criteria of Lipinski's rule. They had good properties that would make them a likely orally actives drugs.

3.4 Antibacterial Screening

3.4.1 *In vitro* antibacterial activity

The *in vitro* antibacterial activity was screened against three Gram-negative bacteria *E. coli* (ATCC25922), *K. pneumoniae* (ATCC700603) and *P. aeruginosa* (ATCC27853) and one Gram-positive bacteria namely, *S. aureus* (ATCC25923) using ciprofloxacin as standard drug and DMSO as a negative bacteria growth inhibition test, and the diameter of zone of inhibition (mm) were recorded.

ZINC03872971 and ZINC00039650 give a good result with three bacteria *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*, and only the compound ZINC00126407 was able to inhibit the

Table 3. Results of ADME/tox screening

Compounds	Molecular weight (g/mol)	Partition coefficient log P	Hydrogen bond donors	Hydrogen bond acceptors	Flexible bonds
ZINC01187537	186.127	-0.5705	5	8	2
ZINC00344344	224.216	1.3232	0	4	3
ZINC00162966	167.164	1.2105	3	4	1
ZINC01430255	234.208	0.5069	2	6	3
ZINC00162979	187.582	1.5555	3	4	1
ZINC00500969	188.186	1.7447	2	4	1
ZINC03872971	298.298	1.6292	2	6	4
ZINC01455730	245.662	1.796	2	5	4
ZINC01428769	206.245	1.8617	2	4	2
ZINC00126407	238.268	1.5238	3	5	2
ZINC01455744	290.113	1.9051	2	5	4
ZINC01428755	248.238	0.897	2	6	4
ZINC01403330	145.143	0.048	2	5	1
ZINC01393372	292.222	3.5593	2	7	4
ZINC00039650	205.135	2.2153	2	3	2

Table 4. Growth inhibition of four bacterial strains.

Tested compounds (150 µg/disc)	Diameter of the growth inhibition zone (mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
C1: ZINC01187537	-	6.5 ± 0.7	-	-
C2: ZINC00344344	-	-	-	-
C3: ZINC00162966	6.5 ± 0	-	6.5 ± 0	07 ± 0
C4: ZINC01430255	-	-	-	-
C5: ZINC00162979	6.5 ± 0	07 ± 0	6.5 ± 0	07 ± 0
C6: ZINC00500969	7 ± 1.4	7.5 ± 0.7	7 ± 1.4	-
C7: ZINC01428769	6.5 ± 0	6.5 ± 0	07 ± 0	-
C8: ZINC03872971	16.5 ± 0.7	16.5 ± 1.4	16 ± 0	-
C9: ZINC00039650	15 ± 1.4	11 ± 0	15 ± 0.7	-
C10: ZINC00126407	16.5 ± 0.7	13.5 ± 0.7	16 ± 0	8.5 ± 0.7
C11: ZINC01455744	6.5 ± 0.7	6.5 ± 0.7	07 ± 0	-
C12: ZINC01393372	07 ± 0	-	07 ± 0	-
C13: ZINC01455730	07 ± 0	12.5 ± 0.7	-	-
C14: ZINC01428755	-	-	-	-
C15: ZINC01403330	-	08 ± 0	-	-
Ciprofloxacin (5 µg/disc)	26.5 ± 0.7	31 ± 1.4	26.5 ± 0.7	33 ± 1.4

- Indicates no zone of inhibition. The negative control (DMSO) did not show any activity.

growth of all the bacterial strains under study. The inhibition zones of all the hydroxamate derivatives are listed in Table 4.

The antimicrobial activity of the selected products against four bacterial strains was studied using the disc diffusion method to determine the mean zones of inhibition. According to Table 4 and 5, the zone of inhibition obtained was dose dependent and compounds ZINC03872971, ZINC00039650 and ZINC00126407 were found to be the most effective antibacterial agent as compared to the other tested compounds. The average of the inhibition zones produced against the tested bacteria ranged from 6.5 to 18 mm (Figure 9).

Evaluation of anti-bacterial activity revealed that the compound ZINC03872971 and ZINC00126407 against *E. coli*

Table 5. Means of inhibition growth diameter obtained by diffusion method using 300 µg/disc.

Tested compounds	Means of inhibition growth diameter (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
C3: ZINC00162966	15 ± 0	/	18.5 ± 0.7
C5: ZINC00162979	13.5 ± 0.7	08 ± 0	15.5 ± 0.7
C6: ZINC00500969	17 ± 0	/	17.5 ± 0.7
C7: ZINC01428769	/	6.5 ± 0.7	/
C8: ZINC03872971	/	/	/
C9: ZINC00039650	/	/	/
C10: ZINC00126407	/	/	/
C11: ZINC01455744	13.5 ± 0.7	13.5 ± 0.7	15 ± 0
C12: ZINC01393372	10 ± 0	/	10 ± 0
C13: ZINC01455730	13.5 ± 0.7	/	14.5 ± 0.7

/: Indicates not done.

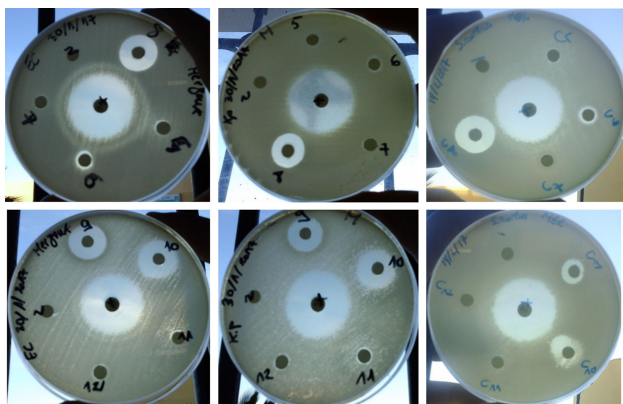


Figure 9. Photographs of the inhibitory zone of compounds ZINC03872971 (C8), ZINC00039650 (C9) and ZINC00126407 (C10) on bacterial strain

and *K. pneumoniae* produced 16 mm zone of inhibition whereas, compound ZINC00039650 showed 15 mm.

The compound ZINC03872971 showed highest activity against *S. aureus* (16.5 ± 1.4 mm) followed by compound ZINC00126407 and ZINC01455730 with inhibition zone of 13.5 ± 0.7 mm and 12.5 ± 0.7 mm respectively.

An introspection of the antimicrobial activity results revealed that the presence of some chemical elements and fragments like trifluoromethyl in compound ZINC00039650, isoquinoline ring in compound ZINC03872971 and benzothiazine cycle in compound ZINC00126407 improved their biological activity.

The compounds ZINC00162966, ZINC00162979, ZINC01428769, ZINC00039650, ZINC01455744 and ZINC01455730 showed varied antibacterial activity depending upon the various substituents present on benzene ring. The activity data suggested that compounds ZINC00039650 with trifluoromethyl substituent on benzene ring showed better antibacterial activity than the compounds with others substituents.

The replacement of 3-trifluoromethyl substituent with 3-pyrrolidin in ZINC01428769 led to a decrease in antibacterial activity. The exchange of the bromine in ZINC01455744 to chlorine in ZINC01455730 improved growth inhibition activity.

Further, the introduction of 2-dihydroxy-5-methoxy or 2-hydroxy-4-chloro groups on the benzene ring in compounds ZINC00162966 and ZINC00162979 respectively led to less active compounds.

We have also analyzed the effect of the replacement of the benzene ring by some heterocycles like benzothiazine and isoquinoline on antibacterial activity. Compound ZINC03872971 with an isoquinoline ring showed an increase in antibacterial activity in comparison to compound ZINC00039650. Replacement of the benzene ring by benzothiazine as in ZINC00126407 led to one of the most active studied compounds.

These results are in agreement with the *in silico* observations. The active compounds had shown good binding interactions to the active site of PDF enzyme. From the computational study summarized in Figures 3 to 8, groups like, trifluorobenzene, fluorobenzene, benzo-isoquinolin or pyrrolidino benzene were more favorable for hydrophobic interactions with the active site as compare to others groups. The benzo-isoquinolin group of most active compound ZINC03872971 fitted well into the hydrophobic pocket, which is the binding site for the methionine side chain of the substrate.^[19]

The results in Table 5 showed that the antibacterial activity of the tested compounds was increased with increasing their concentrations. In contrast, in the utilization of $300 \mu\text{g}$ /disc, clear growth inhibition zones were observed around the impregnated paper discs, the compound ZINC00162966 and ZINC00500969 being the most effective against *E. coli* and *K. pneumoniae*.

3.4.2 Determination of MICs

The MICs of the active products, obtained by the paper disc diffusion method, for each bacterial strain are shown in Table 6.

Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the best products

Compound	Minimum inhibitory concentration (MIC) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
C8: ZINC03872971	32	32	64
C9: ZINC00039650	128	> 256	256
C10: ZINC00126407	64	256	128

The MICs results confirmed those obtained by the paper disc diffusion method. Compound 8 showed increased antimicrobial activity against the tested strains, and these values ranged from 32 to $64 \mu\text{g}/\text{mL}$ and in case of the compounds 9 and 10 they showed activity varying from 128 to > 256 and from 64 to $256 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectively for selected strains in which it shows activity.

Our results revealed that compounds ZINC00039650, ZINC03872971 and ZINC00126407 are the interesting agents that merit further study for their antibacterial activity against other bacterial pathogens.

The results obtained in our study were consistent with those found by other authors, e.g., Hackbarth et al. (2002), Robert (2011), Sanjay et al. (2011), Lee et al. (2012) and O'Dwyer et al. (2013)^[10,14,22,24,25] who found that the compounds containing hydroxamate group can be potent antibacterial agents using PDF as target.

Many medical drugs have been developed through the virtual screening processes, such as the identification of

new anti-tuberculosis using a strategy that combined drug-likeness prediction, pharmacophore methods with molecular docking studies,^[49] the identification of natural compound inhibitors against PDF using *in silico* structural based virtual screening of 452 ligands including 308 antibacterial and 144 antiviral phytochemical,^[50] the development of six new anti-diabetics by the *in silico* screening of 1888 compounds collected from Zinc database against the glycogen phosphorylase,^[36] or the identification of six new compounds as possible lead candidates for designing of potent and selective Phosphodiesterase 4 inhibitors through ligand-based pharmacophore modeling and molecular docking approach.^[51] These processes are shortcut techniques that enable a rapid hit identification

Previously, new PDF inhibitors as antibacterial drugs^[52] and anti-tuberculosis compounds^[53] were identified through structure and ligand-based approaches against the Zinc database.

In this study, we identified three novel potential antibacterial chemicals from Zinc database by applying a strategy that combined virtual screening methods with a microbiological assay. Thus, our screening methods could contribute to the further identification of hit compounds for the development of therapeutic chemicals against not only bacterial infections but also other diseases.

4 Conclusion

The development of new drug using virtual screening technique is cost and time reducing. In the present study, this approach was successful in identifying a series of hydroxamate derivatives.

These products were evaluated for *in silico* bacterial PDFs inhibition and antibacterial activity, they had shown an efficient binding with all the PDFs under study and good activities against tested strains.

In future research, these hydroxamate derivatives will be screen *in vitro* to prove their PDF enzyme inhibition activity.

Abbreviations

DMSO	Dimethyl Sulfoxide enzyme
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
PDB	Protein Data Bank
PDF	Peptide Deformylase
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumonia</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
VS	virtual screening

Conflict of Interest

None declared.

References

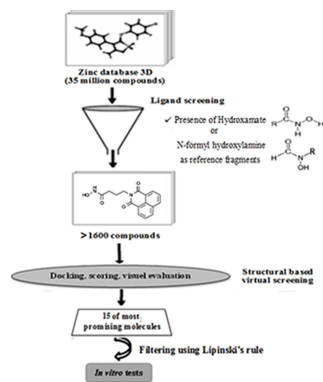
- [1] L. B. Rice, *Am. J. Infect. Control.* **2006**, *34*, 11–19.
- [2] N. S. Jaiprakash, A. K. K. Firoz, B. S. Devanand, *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 214–236.
- [3] R. P. Wenzel, M. B. Edmond, *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 1961–1963.
- [4] E. M. C. D'Agata, *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **2004**, *25*, 842–846.
- [5] R. Gaynes, J. R. Edwards, *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41*, 848–854.
- [6] J. Solbiati, A. Chapman-Smith, J. L. Miller, C. G. Miller, J. E. Cronan, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 607–614.
- [7] W. Yaoming, Y. Tian, M. H. Kristi, C. Chaity, P. Dehua, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 650–657.
- [8] D. Chen, C. Hackbarth, Z. J. Ni, C. Wu, W. Wang, R. Jain, Y. He, K. Bracken, B. Weidmann, D. V. Patel, J. Trias, R. J. White, Z. Yuan, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2004**, *48*, 250–261.
- [9] R. Wise, J. M. Andrews, J. Ashby, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2002**, *46*, 1117–1118.
- [10] C. J. Hackbarth, D. Z. Chen, J. G. Lewis, K. Clark, J. B. Mangold, J. A. Cramer, P. S. Margolis, W. Wang, J. Koehn, C. Wu, S. Lopez, G. Withers III, H. Gu, E. Dunn, R. Kulathila, S. H. Pan, W. L. Porter, J. Jacobs, J. Trias, D. V. Patel, B. Weidmann, R. J. White, Z. Yuan, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2002**, *46*, 2752–2764.
- [11] D. Lofland, S. Difuntorum, A. Waller, J. M. Clements, M. K. Weaver, J. A. Karlowsky, K. Johnson. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 664–668.
- [12] J. M. Clements, R. P. Beckett, A. Brown, G. Catlin, M. Lobell, S. Palan, W. Thomas, M. Whittaker, S. Wood, S. Salama, P. J. Baker, H. F. Rodgers, V. Barynin, D. W. Rice, M. G. Hunter, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2001**, *45*, 563–570.
- [13] T. Fritsche, H. Sader, R. Cleeland, R. Jones, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2005**, *49*, 1468–1476.
- [14] K. O'Dwyer, M. Hackel, S. Hightower, D. Hoban, S. Bouchillon, D. Qin, K. Aubart, M. Zalacain, D. Butlera, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2013**, *57*, 2333–2342.
- [15] J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski, *J. Health. Econ.* **2003**, *22*, 151–185.
- [16] F. L. Stahura, J. Bajorath, *Comb. Chem.* **2004**, *7*, 259–269.
- [17] H. Gohlk, G. Klebe, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2644–2676.
- [18] A. K. Firoz, S. J. Kaivalya, H. P. Rajendra, B. S. Devanand, B. A. Rohidas, N. S. Jaiprakash, *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 1146–1153.
- [19] K. J. Smith, C. M. Petit, K. Aubart, M. Smyth, E. McManus, J. Jones, A. Fosberry, C. Lewis, M. Lonetto, S. B. Christensen, *Protein. Sci.* **2003**, *12*, 349–360.
- [20] V. Molteni, X. He, J. Nabakka, K. Yang, A. Kreuzsch, P. Gordon, B. Bursulaya, I. Warner, T. Shin, T. Biorac, N. S. Ryder, R. Goldberg, J. Doughty, Y. He, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1477–81.
- [21] E. E. Kim, K. H. Kim, J. H. Moon, K. Choi, H. K. Lee, H. S. Park. **2008**. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2OS1>. (Accessed 3 June 2014).
- [22] S. J. Lee, S. J. Lee, S. K. Lee, H. J. Yoon, H. H. Lee, K. K. Kim, B. J. Lee, B. I. Lee, S. W. Suh, *Acta. Crystallogr.* **2012**, *68*, 784–793.
- [23] D. Z. Chen, D. V. Patel, C. J. Hackbarth, W. Wang, G. Dreyer, D. C. Young, *Biochemistry.* **2000**, *39*, 1256–1262.
- [24] C. M. Robert, *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2011**, *37*, 2–9.
- [25] K. V. Sanjay, R. K. Jat, N. Narendra, S. Rajkumar, S. Vineet, P. Sanjay, B. Kuldeep, *Pharmacophore.* **2011**, *2*, 114–123.
- [26] D. Butler, D. Chen, K. O'Dwyer, T. Lewandowski, K. Aubart, M. Zalacain, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2014**, *58*, 290–296.

- [27] BioSolvelt GmbH, An der Ziegelei 75, D-53757 Sankt Augustin, Germany. <http://www.biosolveit.de/FlexX/>.
- [28] I. Halperin, B. Ma, H. Wolfson, R. Nussinov, *Proteins*. **2002**, *47*, 409–43.
- [29] D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, J. Bajorath, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 935–49.
- [30] G. L. Warren, C. W. Andrews, A. M. Capelli, B. Clarke, J. LaLonde, M. H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S. F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I. D. Wall, J. M. Woolven, E. C. Peishoff, M. S. Head, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5912–5931.
- [31] K. A. Chakraborti, R. Thilagavathi, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3989–3996.
- [32] E. Kellenberger, J. Rodrigo, P. Muller, D. Rognan, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2004**, *57*, 225–242.
- [33] A. Chikhi, A. Bensegueni, *J. Proteomics Bioinform.* **2008**, *1*, 161–165.
- [34] M. Forino, D. Jung, J. B. Easton, P. J. Houghton, M. Pellecchia, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2278–81.
- [35] A. Chikhi, A. Bensegueni, A. Boulahrouf, M. Bencharif, *In Silico Biol.* **2006**, *6*, 459–466.
- [36] V. Parmenopoulou, A. L. Kantsadi, V. G. Tsirkone, D. S. M. Chatzileontiadou, S. Manta, S. E. Zographos, N. Kollatos, G. Archontis, L. Agius, J. M. Hayes, D. D. Leonidas, D. Komiotis, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4810–4825.
- [37] J. Ganugapati, S. Swarna, *Asian. J. Pharm. Clin. Res.* **2014**, *7*, 31–34.
- [38] I. Hamlaoui, S. E. Boulfelfel, A. Krid, M. Bencharif, *J. Health. Sci.* **2011**, *57*, 397–400.
- [39] M. J. Stoermer, *Med. Chem.* **2006**, *2*, 89–112.
- [40] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470–489.
- [41] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [42] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- [43] N. Ouis, PhD thesis, Oran 1 University (Algeria), **2015**.
- [44] N. A. Farooqui, A. Dey, G. N. Singh, T. S. Easwari, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 636–638.
- [45] T. Meinel, C. Lazennec, S. Blanquet, *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 175–183.
- [46] A. Becker, I. Schlichting, W. Kabsch, D. Groche, S. Schultz, A. F. Wagner, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1053–1058.
- [47] A. Becker, I. Schlichting, W. Kabsch, S. Schultz, A. F. Wagner, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11413–11416.
- [48] University of Bratislava. 1986. Molinspiration. <http://www.molinspiration.com/>.
- [49] J. X. Ren, H. L. Qian, Y. X. Huang, N. Y. Zhu, S. Y. Si, Y. Xie, *Comput. Biol. Med.* **2015**, *58*, 110–117.
- [50] P. K. P. Gupta, B. Sahu, *Bull. Env. Pharmacol. Life. Sci.* **2015**, *4*, 70–80.
- [51] R. P. Gangwal, M. V. Damre, N. R. Das, G. V. Dhoke, A. Bhadauriya, R. A. Varikoti, S. S. Sharma, A. T. Sangamwar, *J. Mol. Graph. Model.* **2015**, *57*, 89–98.
- [52] J. Gao, L. Liang, Y. Zhu, S. Qiu, T. Wang, L. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1141.
- [53] P. Punia, S. Singh, T. Raj, R. Raguvaran, M. Chopra, V. Dahiya, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 329–331.

Received: July 2, 2017

Accepted: September 27, 2017

Published online on ■■■ 0000



A. Merzoug*, A. Chikhi, A. Bensegueni,
H. Boucherit, S. Okay

1 – 14

**Virtual Screening Approach of
Bacterial Peptide Deformylase In-
hibitors Results in New Antibiotics**



Année Universitaire : 2017/2018	Présentée par : Amina MERZOUG										
Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences Filière : Biochimie											
Thème : Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase											
<p>Résumé</p> <p>La résistance croissante des bactéries à la thérapie antibactérienne pose un énorme problème de santé, elle rend le développement de nouveaux agents antibactériens avec un nouveau mécanisme d'action un besoin urgent. La peptide déformylase, une métalloenzyme qui élimine par voie catalytique le groupe N-formyle de la méthionine N-terminale des polypeptides nouvellement synthétisés, est une cible importante dans la découverte de médicaments antibactériens.</p> <p>Dans cette étude, nous avons réalisé un criblage virtuel basé sur la structure de cette cible à partir de la banque de données ZINC afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs potentiels de la peptide déformylase bactérienne avec plus d'affinité par rapport au GSK1322322, inhibiteur précédemment connu.</p> <p>Après le criblage virtuel quinze composés, parmi les meilleurs prédits, ont été achetés et évalués <i>in vitro</i> pour leurs activités antibactériennes contre trois bactéries à Gram négatif (<i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) et deux bactéries à Gram positif (<i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>) à différentes concentrations par la méthode de diffusion sur disque. Parmi ceux-ci, trois composés, ZINC00039650, ZINC03872971 et ZINC00126407 ont développé une zone d'inhibition significative. Les résultats obtenus ont été confirmés par la méthode des dilutions.</p> <p>A l'issue de cette étude, nous proposons ces trois molécules comme de nouveaux agents antibactériens potentiellement plus efficaces.</p>											
Mots clés : Antibiotique, peptide déformylase, criblage virtuel, banque de données ZINC.											
Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biochimie Appliquée.											
<p>Devant le jury :</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">Président : Mr. KHELIFI Douadi</td> <td style="width: 50%;">Prof ENSB - Constantine 3</td> </tr> <tr> <td>Directeur de thèse : Mr. CHIKHI Abdelouahab</td> <td>Prof Univ. Frères Mentouri - Constantine 1</td> </tr> <tr> <td>Examineurs : Mr. BENSEGUENI Abderrahmane</td> <td>Prof Univ. Frères Mentouri - Constantine 1</td> </tr> <tr> <td>Mr. LAHOUAL Mesbah</td> <td>Prof Univ. M.S. Benyahia. Jijel</td> </tr> <tr> <td>Mr. BOUBENDIR Abdelhafid</td> <td>M.C.A au Centre Univ. A. Boussouf – Mila</td> </tr> </table>		Président : Mr. KHELIFI Douadi	Prof ENSB - Constantine 3	Directeur de thèse : Mr. CHIKHI Abdelouahab	Prof Univ. Frères Mentouri - Constantine 1	Examineurs : Mr. BENSEGUENI Abderrahmane	Prof Univ. Frères Mentouri - Constantine 1	Mr. LAHOUAL Mesbah	Prof Univ. M.S. Benyahia. Jijel	Mr. BOUBENDIR Abdelhafid	M.C.A au Centre Univ. A. Boussouf – Mila
Président : Mr. KHELIFI Douadi	Prof ENSB - Constantine 3										
Directeur de thèse : Mr. CHIKHI Abdelouahab	Prof Univ. Frères Mentouri - Constantine 1										
Examineurs : Mr. BENSEGUENI Abderrahmane	Prof Univ. Frères Mentouri - Constantine 1										
Mr. LAHOUAL Mesbah	Prof Univ. M.S. Benyahia. Jijel										
Mr. BOUBENDIR Abdelhafid	M.C.A au Centre Univ. A. Boussouf – Mila										