



Université Frères Mentouri
Constantine 1

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



Université Frères Mentouri
Constantine 1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine 1

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé :

Identification de nouveaux inhibiteurs potentiels de la protéine non structurale NSP 13 du SARS-CoV-2 :

Etude in silico

Présenté et soutenu par :

Soutenu le : 08/008/2021

BOUKRIA SIHEM

BESSA CHAFIKA

Jury d'évaluation:

Président du jury : Mr MOKRANI E.H.

M.C.B UFM Constantine-1

Rapporteur : Mme TENIOU. S

M.A.A UFM Constantine-1

Examineur : Mme DEMMAK. R.G.

M.C.B USB Constantine- 3

Année universitaire 2020-2021

Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant, qui nous a donné la chance, la force et la patience pour accomplir ce modeste travail.*

*A notre encadrante : Madame **Teniou. S** :*

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter l'encadrement de notre travail, et nous vous en sommes sincèrement reconnaissantes

Nous vous remercions pour votre pédagogie ainsi que pour votre bienveillance envers nous tout au long de l'élaboration de ce travail

Nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre gratitude et de notre plus grande estime.

*Nous tenons aussi à remercier **les membres du jury** : Mr **Mokrani E.H** et Mme **Demmak R.G** pour leur lecture attentive de ce mémoire ainsi que pour les remarques constructives qu'ils nous adresseront à fin d'améliorer notre domaine de recherche. Votre présence nous honore.*

*Ainsi que **nos enseignants**, espérons que vous allez voir, dans ce manuscrit, les fruits du dévouement avec lequel vous avez fait preuve durant les enseignements que vous nous avez prodigué.*

*A monsieur le doyen **DEHIMET.L**, merci de nous avoir donné l'opportunité d'intégrer et de réintégrer la faculté et de contribuer au développement de nos connaissances dans le domaine de la biochimie appliquée.*

*A nos collègues **Amine, Malak, kenza, Aya, Ramzi, Abdelhak** ...Merci pour votre générosité, entraide, spontanéité et surtout votre dévouement pour la science.*

Que dieu vous protège et nous éclaire le chemin de la connaissance !

Dédicace

Je dédie ce travail ;

*A la mémoire de **mes chers parents** ; Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut pour vous remercier de votre générosité et de votre amour.*

*A la mémoire de **Marouane** ; j'aurais tant voulu que ça soit toi qui présente ce travail...*

*Qu'**Allah** le tout puissant, vous comble de sa sainte miséricorde.*

*A **ma sœur** ; ma deuxième maman, mon deuxième refuge.*

*A mon **mari** ; Pour ta patience et ton soutien.*

*A **mes enfants**, je voudrais que le jour où vous prenez ce document entre vos mains, vous serez fiers et inspirés de la volonté de votre maman qui vous aime.*

*A **Souad et Souhila** ; merci pour votre présence et vos encouragements*

Sihem

Dédicace

A ma mère, à qui je dois la réussite, pour l'éducation que tu m'as prodiguée ; Avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices que tu as consentis à mon égard, pour le sens du devoir que tu m'as enseigné depuis mon enfance...

Je t'aime intensément !

A mon père, tu m'as donné une si belle vie. Je profite de toutes ces merveilleuses bénédictions et de tout le confort grâce à ton travail acharné et à ton engagement à me donner une bonne vie.

A tonton Bachir, Ta sage présence à mes côtés est un vrai plus pour moi, je te suis profondément reconnaissante pour ce que tu as fait pour moi. Une chose est sûre : je n'oublierais jamais.

A mes frères, mes belles sœurs, et mes neveux : Amine mon petit bonhomme, mon adorable Abdou, Assinatte ma jolie princesse, Ahmed mon chou et Ghaith mon petit attachant.

A tata Nora, Merci de m'avoir laissé entrer dans ta vie sans hésitation. De m'accorder ta confiance et ton amour. Merci de me faire sentir que je suis ta propre fille...

A toute ma famille Bessa et Bensalloua, A Ahlem Merabet et Ritedj Hafsi chères cousines ;

A mon Binôme Sihem, je ne te remercierais jamais assez pour ta disponibilité et ta compréhension, tu as été une maman déguisée en copine, merci d'avoir eu le courage pour clôturer ce travail.

A Ryma.. Ma compagne de souffle et celle qui m'accompagnera à tout jamais, merci pour ton soutien infailible et pour la plus belle année de tous les temps, je t'aime

A yousra ; tu fais entièrement partie de ma vie et de mon future, on forme un duo indestructible, toujours là pour m'écouter, me soutenir et me pousser à me surpasser, je t'aime

A tous mes amis, Aicha, Safa, Messaouda, Sarah, Yasmine, Lina, Kenza, Housseem, Mehdi, Moussa...que les fleurs de notre amitié ne fanent jamais.

Sawsane

TABLES DES MATIERES

Introduction générale	1
Partie théorique	
Chapitre 1 : Le virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère 2. SARS-CoV-2	
1. Généralité.....	3
2. Définition des coronavirus.....	3
3. Classification des coronavirus.....	4
4. Les récepteurs identifiés des coronavirus.....	5
5. Le SARS-CoV 2.....	6
6. Les protéines structurales du SARS-CoV 2.....	6
7. Aspects génomiques.....	7
8. Réplication et pathogenèse.....	8
9. Épidémiologie.....	9
10. Diagnostic biologique de l'infection par le SARS CoV-2	10
11. Traitement Covid 19 : protocole et antibiotiques	11
12. Vaccination.....	12
13. Conclusion.....	13
Chapitre 2 : L'enzyme non structurale NSP13 du SARS-CoV-2	
1. L'hélicase	14
2. Mode d'action.....	15
3. Cas du virus SARS-CoV 2	15
4. Propriétés physico-chimiques de NSP 13	16
5. Les inhibiteurs de NSP 13	17
5.1. Les inhibiteurs naturels	17
5.2. Les inhibiteurs chimiques.....	17
Chapitre 3 : Le docking moléculaire	
1. Docking moléculaire (amarrage)	19
2. Criblage virtuel	19
3. Types de docking : du docking rigide vers l'introduction de la flexibilité	19
4. Le processus du docking	20
4.1. Les récepteurs.....	20
4.2. Les ligands	21
4.3. Le docking Ligand- Protéine	21
5. Programmes du docking	21
5.1. Le programme Surflex-dock	22
6. La reconnaissance moléculaire	22
6.1. Les interactions de Van der Waals	22
6.2. Les liaisons ioniques	23
6.3. Les liaisons hydrogènes	23
6.4. L'effet hydrophobe	24

Partie pratique

Chapitre 4 : Material and Methods

1. Materials	25
1.1 hardware.....	25
1.2. Software.....	25
1.2.1. Surflex-dock.....	25
1.2.2. Protein Data Bank server.....	25
1.2.3. Pdbaser	26
1.2.4. Open Babel	27
1.2.4. Open Babel	27
1.2.5. Chem3D.....	27
1.2.6. Discovery Studio 2021.....	28
1.2.7. ADMETlab 2.0.....	28
2. Methods.....	29
2.1. Assessment of Docking Quality “RMSD”.....	29
2.2. Receptor preparation.....	29
2.3. Ligands preparation.....	29
2.3.1. Natural products.....	29
2.3.2 Substitution approach.....	30
2.4 The protomol generation.....	30
2.5 The molecular docking.....	30
2.6 Designing of new substitutes molecules of VW4	30
2.7 ADME/Tox properties	32

Chapitre 5 : Results and discussion

1. Surflex reliability testing.....	33
2. Visual Analysis.....	33
3. Interaction study.....	35
3.1. Nsp 13/VW4 interactions.....	35
3.2. Nsp 13/ natural compounds interactions.....	37
3.3. Nsp 13/ substituted compounds interactions	39
4. ADME Study.....	43
5. Toxicity study.....	44
6. Conclusion.....	43

Conclusion Générale.....	46
--------------------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Illustration du coronavirus dans la muqueuse respiratoire	3
Figure 2 :	Représentation schématique d'un coronavirus.....	4
Figure 3 :	Représentation globale du génome et des protéines du SARS-cov-2.....	7
Figure 4 :	Cycle virale du SARS-cov-2.....	8
Figure 5 :	Représentation In silico de la structure de l'enzyme Nsp 13 du SARS-cov-2...	14
Figure 6 :	Génomique du SARS-cov-2.....	15
Figure 7 :	Complexe de réplication-transcription du SARS-cov-2.....	16
Figure 8 :	Cibles plausibles pour le développement de médicaments anti SARS-cov-2 ...	18
Figure 9 :	Digramme des programmes de docking les plus cités.....	21
Figure 10 :	Schéma représentatif d'une liaison de Van der Waals.....	23
Figure 11:	Schéma représentatif d'une liaison ionique.....	23
Figure 12 :	Schéma représentatif d'une liaison hydrogène.....	24
Figure 13:	Schéma représentatif de l'effet hydrophobe.....	24
Figure 14:	Surflex terminal.....	25
Figure 15:	Graphic interface of the PDB server.....	26
Figure 16:	Graphic interface of Pdbaser program.....	26
Figure 17:	Graphic interface of Open Babel program.....	27
Figure 18:	Graphic interface of chem3d software.....	27
Figure 19:	Graphic interface of Biovia discovery visualizer.....	28
Figure 20:	Graphic interface of ADMETLAB 2.0 server.....	28
Figure 21:	Results in percentage of the RMSD test.....	33
Figure 22:	Surface representation of VW4 and most relevant binding residues.....	35
Figure 23:	Illustration of the active site surface hydrogen bonds predicted between the nsp13 and its pdb ligand VW4.....	36
Figure 24:	Rosmarinic acid interactions with 5RLJ.....	38
Figure 25 :	T1 compound interactions with 5RLJ protein.....	42

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Taxonomie des coronavirus.....	5
Tableau 2 :	Souches identifiées des coronavirus et leurs récepteurs respectifs.....	5
Tableau 3 :	Souches identifiées des coronavirus et leurs récepteurs respectifs.....	6
Tableau 3 :	Liste des vaccins fabriqués contre le SARS-CoV	13
Tableau 5 :	Propriétés physico-chimiques de l’Nsp 13	16
Tableau 6 :	Substitutions carried out.....	31
Tableau 7 :	Visual analysis of RMSD.....	34
Tableau 8 :	Types and distances of interactions between nsp13 and VW4.....	36
Tableau 9 :	Chemical structure and scores of the natural compounds docked by Surfex in comparison with the reference ligand.....	37
Tableau 10:	Types and distances of interactions between nsp13 and rosmarinic acid.....	39
Tableau 11:	Compound’s binding scores predicted by Surfex.....	40
Tableau 12 :	Types and distances of interactions between nsp13 and T1 compound.....	42
Tableau 13 :	Physicochemical property.....	43
Tableau 14 :	Medicinal chemistry.....	44
Tableau 15 :	Toxicity.....	44

LISTE DES ABREVIATIONS

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
Å	Ångström
ACE2	Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ADME/TOX	Absorption, distribution, métabolisme et excrétion/Toxicité
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCoV	Coronavirus bovin
Cov	Coronavirus
Covid	Corona virus disease
CRP	Protéine C réactive
HE	Hémaglutinine Estérase
HLA	Human leukocyte antigen
LDH	Lactate-deshydrogénase
MERS-CoV	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient
MHV	Virus de l'hépatite murin
Nsp	Protéine non structurale
NTP	Nucleoside triphosphate
NTPase	Nucléoside-triphosphatase
ORF	Cadre de lecture ouvert

PP	Polyprotéine
Protéine S	Spike Protein
Protéine E	Protéine d'enveloppe
Protéine M	Membrane protein
Protéine N	The coronavirus nucleocapsid protein
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante
RTC	Complexe de réplication et de transcription
RT-PCR	Rétro – réaction en chaîne par polymérase
SARS-CoV-2	Syndrome respiratoire aigu sévère 2
TNF ALPHA	Tumor necrosis factor alpha
TP	Taux de prothrombine
VHC	Tétrahydrocannabinol

Introduction générale

Introduction générale

Les coronavirus (CoV) sont un groupe de virus génétiquement apparentés qui causent des maladies chez les mammifères et les oiseaux. Chez l'homme, ils provoquent le syndrome respiratoire aigu (SARS) [1]. Le virus SARS-CoV a été connu pour la première fois en 2002 en Chine. Une décennie plus tard (juin 2012), un coronavirus similaire est apparu au Moyen-Orient (MERS-CoV) avec un taux de mortalité plus élevé que le SARS-CoV [2], l'émergence du nouveau coronavirus connu sous le nom de SARS-Cov-2 en 2019 a causé de graves conséquences sur la vie humaine en raison de son potentiel épidémiologique [3]

Les CoVs sont des virus à ARN positif, ils possèdent l'un des plus grands génomes d'ARN connus parmi les virus à ARN (~29.7 kb) [4]. C'est ce génome qui est la clé de la réplication du virus, et cela en détournant la machinerie de la cellule hôte au profit de sa propre prolifération. En effet l'ARN est utilisé comme modèle pour synthétiser deux grandes polyprotéines *PP1a* et *PP1ab* ; après avoir subi un traitement protéolytique, 16 protéines non structurales (**Nsps**) sont produites, dont la primase (Nsp8), l'ARN polymérase ARN-dépendante (Nsp12) et l'hélicase (Nsp13). Ces trois enzymes, entre autres, sont des composants du complexe de réplication et de transcription (RTC) qui est essentiel au cycle de vie du SARS-CoV. De ce fait ; l'hélicase représente une cible potentielle de l'inhibition de la réplication du SARS-CoV-2 particulièrement et des coronavirus en générale.

Dans le présent travail, nous avons utilisé le programme *Surflex* afin d'étudier par docking moléculaire, les mécanismes d'inhibition de l'*nsp13* et ce dans la perspective de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme.

L'objectif du présent travail est, dans un premier temps, d'évaluer la performance du programme *Surflex*, au moyen de deux tests de fiabilité. Le premier test consiste à calculer, l'écart quadratique moyen ou RMSD entre la position prédite du ligand par le logiciel et celle déterminée expérimentalement. Le dernier test sert à analyser visuellement les résultats obtenus à l'issue du test précédent.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de l'*nsp13* par son inhibiteur de référence (VW4) issu de la PDB, qui nous servira, par la suite de structure de départ pour la conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs encore plus puissants et sélectifs vis-à-vis de l'*nsp13*. En parallèle nous avons opté pour une deuxième approche, qui est le docking de l'*nsp13* par des molécules

naturelles. Dans ce contexte nous avons choisi huit molécules relativement communes aux plantes largement utilisées en Algérie lors de la pandémie de la covid-19, tel que l'origan, le thym, le basilic, le clou de girofle et le gingembre[1]. Le choix de ces molécules était basé sur leurs ressemblances structurales avec l'inhibiteur de référence de l'nsp13.

En fin, les composés ayant présenté les meilleurs scores de docking ont fait l'objet d'une étude de leurs propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité potentielle régissant leurs paramètres ADMET.

Partie théorique

Chapitre I

Le virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère 2 « SARS-CoV-2 »

1. Généralité

Les *coronavirus* ont été étudiés pendant des décennies à l'aide du modèle bêtacoronavirus, du virus de l'hépatite murine (MHV) et de l'alphacoronavirus humain HCoV-229E. Chez l'homme, les coronavirus circulants HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 et HCoV-HKU1 provoquent généralement une maladie bénigne des voies respiratoires supérieures et sont collectivement associés à 10 à 30 % des cas de rhume. Cependant, au cours des deux dernières décennies, trois coronavirus hautement pathogènes sont apparus dans la population humaine et peuvent provoquer des maladies respiratoires graves : le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) est apparu en Chine en 2002, Le syndrome du coronavirus (MERS-CoV) est apparu en Arabie Saoudite en 2012, et plus récemment, le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) ; émergeant en 2019 dans la ville de Wuhan en Chine et qui a été la cause d'une **Pandémie** sans précédent [2].

2. Définition des coronavirus

Le nom coronavirus (CoV), du latin signifiant « virus à couronne », est dû à l'apparence des virions sous le microscope électronique ,avec une frange de grandes projections bulbeuses qui ressemblent à la couronne solaire (Figure 1) [3] [4].



Figure 1 : Illustration du coronavirus dans la muqueuse respiratoire

Les *coronavirus* appartiennent à la famille des Coronaviridae. Ce sont des virus enveloppés, à ARN monocaténaire a polarité positif, de forme sphérique ; certain *Coronavirus* font entre 120-160 nm de diamètre avec un cœur interne, parfois icosaédrique, de 65nm, et une nucléocapside en hélice[2] (figure2).

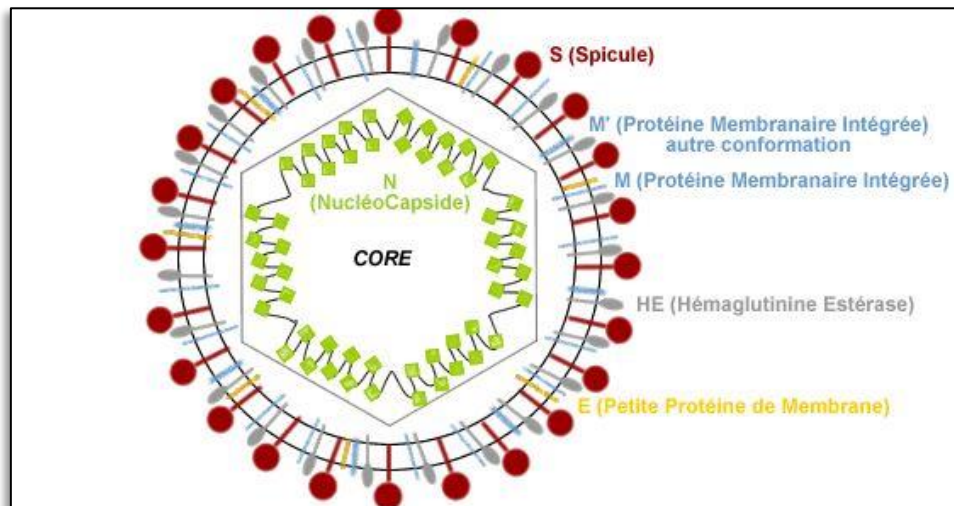


Figure 2 : Représentation schématique d'un coronavirus

Les *coronavirus* ont deux larges projections à leurs surfaces formées de glycoprotéines possédant un globule et une portion fine. Les peplomers (trimère de spicule) ont environ 20nm de long. Chez certain *coronavirus* comme le β CoV et le virus de l'hépatite murin (MHV), une seconde couche de peplomers formée par des protéines Hémaglutinine Estérase (HE) est également observée[5].

3. Classification des coronavirus

La famille des Coronaviridae est regroupés en quatre genres (alphacoronavirus, bêtacoronavirus, gammacoronavirus et deltacoronavirus) qui infectent principalement les oiseaux et les mammifères, y compris les humains et les chauves-souris. Les sept coronavirus connus pour infecter les humains appartiennent aux genres alpha et bêtacoronavirus, tandis que les gamma et deltacoronavirus infectent principalement les oiseaux [6] (tableau 1).

Tableau 1 : Taxonomie des coronavirus.

<i>Ordre</i>	<i>Nidovirales</i>
<i>Famille</i>	<i>Coronaviridae</i>
<i>Sous-famille</i>	<i>Coronavirinae</i>
• <i>Genre</i>	<i>Alpha coronavirus</i>
• <i>Genre</i>	<i>Beta coronavirus</i> <i>Clade A : HCoV-OC43 et HCoV-HKU1</i> <i>Clade B : SARS-CoV</i> <i>Clade C : MERS-CoV</i>
• <i>Genre</i>	<i>Gamma coronavirus</i>
• <i>Genre</i>	<i>Delta coronavirus</i>

4. Les récepteurs identifiés des coronavirus

Le degré d'atteinte cellulaire induit par une infection à coronavirus varie selon la souche virale et la cellule cible, et va de l'absence totale d'effet cytopathique à la lyse cellulaire [7][8](tableau 2).

Tableau 2 : Souches identifiées des coronavirus et leurs récepteurs respectifs

<i>Les souches identifiées :</i>	<i>Récepteurs cellulaires</i>
<i>Souche 229^E</i>	Aminopeptidase N, métalloprotéase présente à la surface des cellules épithéliales pulmonaires, intestinales, et rénales, des fibroblastes et de certaines cellules du système nerveux central
<i>Souche OC43</i>	Plusieurs candidats retenus : -Récepteurs contenant de l'acide sialique semblables à ceux utilisés par <i>Influenza C</i> -molécules HLA de classe I -antigènes carcino-embryonnaires

<i>Souche SARS-CoV 2</i>	<i>ACE2 : angiotensine-converting enzyme</i> , molécule exprimée dans de nombreux tissus : bronches, poumons, cœur, reins, tractus gastro-intestinal
--------------------------	--

5. Le SARS-CoV-2

Le virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SARS-CoV-2) est un nouveau coronavirus (CoV) humain. Il a émergé en Chine fin 2019 et est responsable de la pandémie mondiale de la Covid-19 ; une pneumonie fébrile atypique pouvant évoluer vers une insuffisance respiratoire très sévère, causant à ce jour, plus de quatre million de décès [3][9].

L'agent étiologique de la Covid-19 a rapidement été identifié, et dès le 26 janvier 2020, 10 génomes viraux ont été séquencés. La comparaison des séquences génomiques a montré que la séquence du génome du SARS-CoV-2 est proche du SARS-CoV (99 % d'identité) et du MERS-CoV (50 % d'identité), responsables des épidémies humaines précédentes. Il fut donc conclu que le SARS-CoV-2 était un nouvel agent infectieux à transmission interhumaine appartenant à la famille des SARS-CoV, dont le réservoir animal était la chauve-souris[5].

6. Les protéines structurales du SARS-CoV-2

Les orientations des études actuelles montrent que le SARS-CoV-2 possède quatre protéines structurales (Tableau3).

Tableau 3 : les protéines structurales du SARS-CoV-2

<i>Protéines S</i> (protéine spike ou protéine de pointe)	Forme les protubérances de la 'couronne', essentielle pour lier le virus aux récepteurs cellulaires
<i>Protéine E</i>	<i>Enveloppe</i>
<i>Protéine M</i>	<i>Membrane</i>
<i>Protéine N</i> (<i>nucleocapside</i>)	<i>Enveloppe et protège l'ARN viral</i>

Les protéines S, E et M constituent, ensemble, l'enveloppe virale [5][10].

7. Aspects génomiques

Le génome des CoV comporte un nombre variable de cadres de lecture ouverts (ORF). Les deux tiers de l'ARN viral sont situés principalement dans le premier ORF (ORF1a/b), traduisent deux polyprotéines, pp1a et pp1b, et codent pour 16 protéines non structurales (NSP), alors que les ORF restants code pour des protéines de structure et des protéines accessoires. Le reste du génome du virus code pour quatre protéines essentielles de structure, dont la glycoprotéine (S), la protéine de l'enveloppe (E), la protéine matricielle (M) et la protéine nucléocapside (N), ainsi que plusieurs protéines accessoires, qui interfèrent avec la réponse immunitaire de l'hôte[11] (Figure 3).

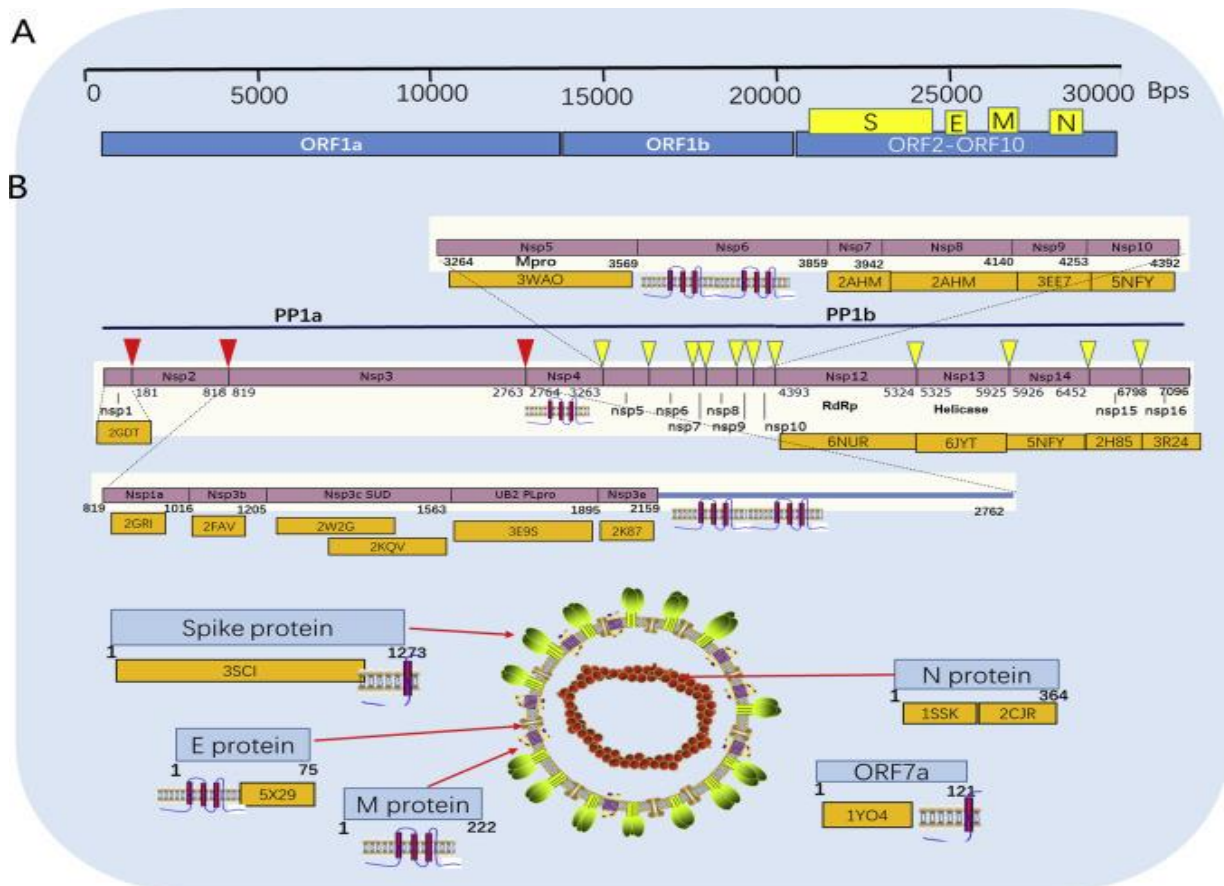


Figure 3 : Représentation globale du génome et des protéines du SARS-CoV-2. (A) Génome du SARS-CoV-2. (B) La grande réplique de la polyprotéine PP1ab. Le rectangle violet représente la polyprotéine répliquase PP1ab qui contient 7096 acides aminés. La position du triangle rouge signifie le site de clivage de PLpro, et la position du triangle jaune signifie le site de 3CLpro, les nombres sous le rectangle violet représentent les résidus qui liaient les protéines ou domaines individuels.

8. Réplication et pathogenèse

Le cycle de vie de Sars-CoV-2 dans la cellule comporte les étapes ; d'attachement, de pénétration et décapsidation puis les synthèses des macromolécules (acides nucléiques et protéines). Ces synthèses vont permettre l'assemblage des nucléocapsides puis l'enveloppement et la libération des virions infectieux en même temps qu'une lyse de la cellule infectée. Ce cycle lytique existe dans les cellules respiratoires infectées par le virus [12][13].

Le virus s'attache spécifiquement à la cellule sensible grâce à une interaction de haute affinité entre la protéine S virale et l'*Angiotensin-converting enzyme 2* (ACE 2), récepteur cellulaire de l'hôte. En effet, la protéine S est constituée de deux sous-unités fonctionnelles : la sous-unité S1 permet la liaison du virus au récepteur de la cellule hôte et la sous-unité S2 assure la fusion de l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Le clivage de la protéine S par les protéases de la cellule hôte active la fusion au niveau de deux sites en tandem, *heptad repeat 1* (HR1), et HR2. Ainsi, l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme. Le complexe réplication-transcription (RTC) assure la réplication du génome et la synthèse des protéines. Les protéines de structure s'auto-assemblent en capsomères puis en nucléocapside par intégration du génome répliqué. Formation de bourgeons, les vésicules contenant les virions fusionnent avec la membrane plasmique pour être libérées[14][15][16][17](figure 4).

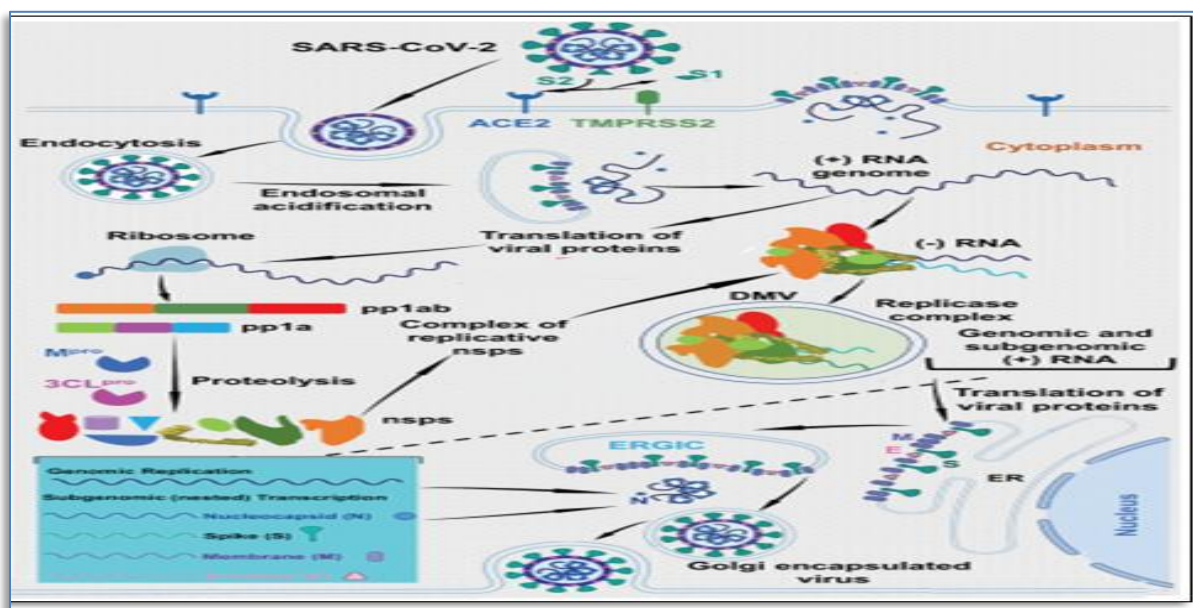


Figure 4 : cycle viral du SARS-CoV-2

9. Epidémiologie

La surveillance des mutations qui s'accumulent naturellement dans le génome du SRAS-CoV-2 est une priorité de santé publique et clinique. Elle permet d'anticiper et d'évaluer les impacts potentiels des mutations sur les caractéristiques épidémiologiques et cliniques du virus.

Ainsi, l'OMS a enregistré l'émergence de plusieurs variant du SARS-CoV-2. Ces variants ont été rapportés dans plusieurs pays, et se distinguent des variants communs, en raison d'un impact suspecté ou démontré sur la gravité de la maladie, la transmissibilité du virus ou l'efficacité vaccinale.

- Au **Royaume-Uni**, le variant baptisé « **Alpha** » ou **B.1.1.7** serait de 1,4 à 1,8 fois plus transmissible et de 1,1 à 1,7 fois plus virulent (risque d'hospitalisation ou de décès) que les variants communs. Il pourrait causer des infections d'une durée plus longue et serait associé à une charge virale plus élevée dans les voies respiratoires supérieures, ce qui pourrait contribuer à sa transmissibilité accrue. Il n'entraînerait pas de changement dans les manifestations cliniques de la COVID-19 ni un risque accru de réinfection comparativement aux variants communs. Les vaccins et traitements par anticorps monoclonaux approuvés par les agences réglementaires seraient aussi efficaces contre ce variant que contre les variants communs[13][8].
- En **Afrique du Sud**, le variant « **Beta** » ou **B.1.351** serait 1,5 fois plus transmissible que les variants communs et associé à une augmentation de la létalité dans ce pays. Les études sur la transmission et les impacts de ce variant sur les manifestations cliniques, les hospitalisations, les décès et les réinfections sont limitées. Les vaccins et traitements par anticorps monoclonaux approuvés par les agences réglementaires seraient moins efficaces contre ce variant que contre les variants communs. De plus, ce variant serait moins sensible aux anticorps neutralisants du plasma de convalescence pour la COVID-19 (ou évasion immunitaire), ce qui soulève des inquiétudes quant aux risques accrus de réinfection et de résistance à la vaccination pour ce variant. Des essais cliniques visant à tester l'efficacité d'une troisième dose ou d'un vaccin développé spécifiquement contre ce variant ont été annoncés par les fabricants Pfizer-BioNTech et Moderna [18].

- Au Brésil, le variant « **Gamma** » ou P.1 serait de 1,8 à 2,5 fois plus transmissible et de 1,1 à 1,8 fois plus virulent que les variants communs. Il serait associé à des infections avec une plus haute charge virale comparées à celles causées par les variants communs. Un faible risque de réinfection a été estimé avec ce variant (6,4 %) pour les personnes qui ont déjà été infectées durant la première vague. En raison de mutations partagées avec le variant B.1.351, une diminution de l'efficacité des vaccins et traitements par anticorps monoclonaux est attendue pour le variant P.1[19].
- L'OMS a donné deux noms différents aux sous-lignées distinctes du variant B.1.617, qui est en partie lié au regain de l'épidémie en Inde où il a été repéré pour la première fois en octobre 2020, avant de s'étendre à au moins quarante-quatre pays : B.1.617.2 devient « **Delta** », et B.1.617.1 « **Kappa** ». Il a été classé en Mai 2021 par l'OMS comme « *variant préoccupant* », rejoignant dans cette catégorie-là, les variants britannique, sud-africain et brésilien.

10. Diagnostic biologique de l'infection par le SARS CoV-2

La **RT-PCR** (rétro – réaction en chaîne par polymérase) est la technique de référence pour poser le diagnostic. L'apparition des signes cliniques s'accompagne de perturbation du bilan biologique. La numération et formule sanguine (NFS) montre une augmentation des polynucléaires neutrophiles et une diminution des lymphocytes CD4 et CD8. Une baisse de l'hémoglobine et des plaquettes sont rares[20].

Le test sérologique d'anticorps IgM/IgG : Ce test sanguin vérifie la présence d'anticorps IgM et IgG qui résulte d'une exposition passée ou récente à la Covid-19.

Une élévation de la protéine C réactive (**CRP**), dans 60,7 %-85,6 % des cas, atteignant des valeurs élevées (150 mg/L).

Le bilan biochimique révèle une **hypoalbuminémie**, **hyperferritinémie**, élévation des **transaminases** (TGO et TGP) dans 25 % des cas, augmentation de la **bilirubine** et de **LDH** et également des réserves alcalines[21].

Au bilan de l'hémostase ; le **TP** est diminué (94 %) et les D-dimères sont augmentés (23,3 % - 46,4 %), ce qui pousse le clinicien à penser à une coagulopathie associée aux formes graves à forte mortalité[21].

La **troponine** est élevée chez 23 % des insuffisants cardiaques aigus et 17 % des patients non cardiaques.

La fonction rénale est souvent conservée (seulement 4,5 % des patients ont présenté une insuffisance rénale aigue). **l'hypérurémie** est associée à un pronostic péjoratif[22].

Les facteurs de l'inflammation sont également élevés, indiquant le statut immunitaire des patients : **IL-6, IL-10**, facteur de nécrose tumorale- α (**TNF- α**).

En résumé, les patients présentant un syndrome respiratoire aigu présentent les signes suivants :

- Augmentation des D-dimères $> 1 \mu\text{g/ml}$ et une baisse de TP ;
- Augmentation des polynucléaires neutrophiles et diminution des lymphocytes.
- Hyperbilirubinémie totale, hypoalbuminémie, élévation de l'urée et des LDH ;
- Elévation d'IL-2, IL-7, IL-10, facteur de stimulation des colonies de granulocytes (GCSF), protéine induite par l'interféron gamma 10 kD (IP-10), protéine chimio attractante des monocytes 1 (MCP-1), protéine inflammatoire des macrophages 1- α (MIP -1 α)et TNF- α . [21][20][22].

11. Traitement Covid 19 : protocole et antibiotiques

La prise en charge de la Covid-19 s'adapte selon sa forme : légère (ne nécessitant pas d'hospitalisation) ou sévères (avec une hospitalisation voire une admission en réanimation).

Jusqu'à présent aucun traitement avec une activité virale directe n'a fait la preuve scientifique de son efficacité pour combattre le coronavirus SARS-CoV-2 responsable de la Covid-19.

Le traitement s'adapte selon les symptômes et la gravité de la maladie :

- En cas de fièvre, il est conseillé de prendre du paracétamol et non des anti-inflammatoires qui peuvent faire flamber l'infection [23][24].

- Les corticoïdes, la dexaméthasone en premier lieu, sont désormais recommandés dans la prise en charge des formes graves de la Covid-19, En cas de tension d'approvisionnement de la dexaméthasone, il est recommandé l'utilisation de méthylprednisolone, de prednisone ou d'hydrocortisone [24].
- L'oxygénothérapie permet de délivrer de l'oxygène à une personne en insuffisance respiratoire [25].
- thérapie par anticorps monoclonaux chez les personnes à risque élevé de développer une forme grave de la COVID-19 dès l'apparition de leurs symptômes [24].
- la vitamine D stimule notamment le système immunitaire et joue un rôle protecteur contre la covid-19 [26][27].

Il faut noter que *l'hydroxy-chloroquine* ou la *chloroquine*, un traitement employé contre le paludisme, le lupus érythémateux et l'arthrite rhumatoïde, a fait l'objet d'études en tant que traitement possible contre la COVID-19. Les données actuelles montrent que ce médicament ne réduit pas le nombre de décès [28][29].

12. Vaccination

Pour stopper la pandémie, les chercheurs et laboratoires du monde entier se mobilisent pour développer des vaccins efficaces contre la Covid-19. En plus des mesures barrières, la vaccination permettra de maintenir l'impact de l'épidémie et de réduire la mortalité et la morbidité liées à l'infection virale. Ainsi ; de nombreux vaccins ont été approuvé par l'OMS (Tableau 4).

Tableau 4 : Liste des vaccins fabriqués contre le SARS-CoV[30].

Company	Platform	Doses	Non-clinical results	Number of people who got vaccine	Protection from hospitalization /death due to COVID-19	Protection from severe disease from COVID-19 (may not be hospital)	Efficacy against milder disease from COVID-19
	mRNA-1273 mRNA in lipid nanoparticle	2	Neutralizing Abs; Strong Th1 response; protection from challenge	~15,000	100%	100% (30 cases in placebo arm; 0 in vaccine)	94.1%
	BNT162b2 mRNA in lipid nanoparticle	2	Neutralizing Abs; Strong Th1 and Th2 response; protection from challenge	~18,600	100%	100% (9 cases in placebo arm; 0 in vaccine)	95%
	AZD 1222 Non-replicating Chimp Adenovirus-DNA	2	Neutralizing Abs; Strong Th1 and Th2 response; protection from challenge	~5800	100%	100% (15 in placebo; 0 in vaccine)	90% half-full-dose; 70% overall; 76% with 1 dose
	JNJ-78436725 Non-replicating human adenovirus/DNA	1	Neutralizing Abs; Strong Th1 and Th2 response; protection from challenge	~22,000	100%	85% (across South Africa, U.S., Latin America including Brazil)	72% US; 66% Latin America; 57% S. Africa (95% B1.351)
	NVX-CoV2373 Spike protein/RBD + Matrix M adjuvant	2	Neutralizing Abs; protection from challenge	~9700	100%		89.3% UK; 60% S. Africa
	Ad26 and Ad5 adenovirus/DNA	2	Neutralizing Abs; Strong Th1 and Th2	~14964	100%	100% (20 in placebo; 0 vaccine)	91.6%

13. Conclusion

Le Sars-CoV-2 peut toucher tous les âges, les hommes plus que les femmes. Le tableau clinique est très variable allant de la forme asymptomatique à l'atteinte pulmonaire sévère. La RT-PCR (rétro – réaction en chaîne par polymérase) est la technique de référence pour poser le diagnostic. Jusqu'à ce jour, aucun traitement spécifique n'est approuvé. Actuellement, l'isolement et les mesures barrière constituent les principaux moyens de prévention ; port du masque, hygiène des mains et respect de la distanciation sociale[31].

Chapitre II

L'enzyme non structurale NSP13 du SARS-CoV-2

1. L'hélicase

Dans les cellules, le déroulement de l'ADN double-brin est catalysé par une famille de protéines appelées hélicases. Ces protéines sont présentes chez tous les organismes des virus jusqu'à l'homme.

L'hélicase est une enzyme qui favorise l'ouverture de l'hélice d'ADN, la séparant en deux brins simples de sorte qu'elle puisse se répliquer. L'hélicase brise les liaisons hydrogène entre les bases azotées des deux brins d'ADN, ce qui provoque leur séparation[32].

Elle participe aux processus de duplication cellulaire et de reproduction de celle-ci, la transcription, la recombinaison et la réparation de l'ADN, et la biogenèse des ribosomes. Une hélicase assure que l'ADN double brin se "zippe" [33].

La particularité de cette enzyme est qu'elle soit très conservée, parmi tous les coronavirus, avec un très haut taux de conservation allant jusqu'à 99.8% chez le SARS-CoV (différent par un seul acide aminé :V5701) .[33][32][31] ce qui présente un grand avantage par rapport à son inhibition [34][35].

L'hélicase des SARS-CoV (1 et 2) ou nsp 13 contient 5 domaines, un domaine de liaison au zinc N-terminal (ZBD) qui coordonne 3 ions de zinc structurels, un domaine hélicoïdal « tige », un domaine 1B en feuillet β et deux sous-domaines d'hélicase « RecA like » 1A et 2A qui contiennent les résidus responsables de la liaison des nucléotides et de l'hydrolyse (Figure 5)

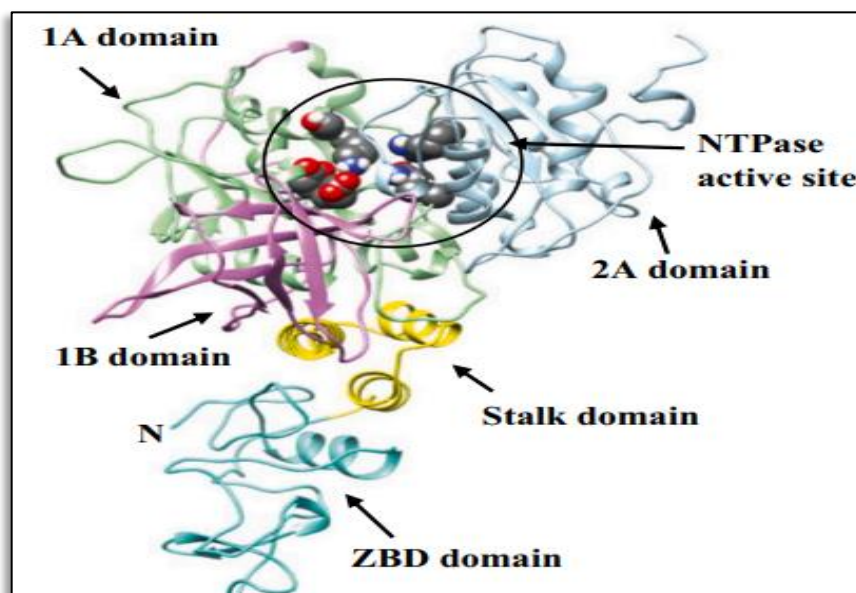


Figure 5 : Représentation In silico de la structure de l'enzyme Nsp 13 du SARS-CoV-2 montrant Cinque domaines :- **ZBD:** 1–99 résidus (turquoise), **Stalk:** 100–149 résidus (jaune), **1B:** 150–260 résidus (orchid), **1A:** 261–441 résidus (vert claire) et **2A:** 442–596 résidus (bleu clair). Le site actif de **NTPase** (sphères grises) est composé de six résidus ;-Lys288, Ser289, Asp374, Glu375, Gln404 and Arg567.

2. Mode d'action

Les hélicases sont des protéines qui se déplacent longitudinalement le long des liaisons phosphodiester de l'acide nucléique, séparant les deux brins antiparallèles de l'acide nucléique (ADN double brin, ARN double brin ou hybride ADN-ARN) en utilisant l'énergie libérée dans l'acide nucléique par l'hydrolyse de l'ATP ou du GTP. Il existe différents types d'hélicases (14 confirmées dans *E. coli* et 24 dans les cellules humaines) en conséquence de la grande variété de processus dans lesquels la séparation des chaînes d'acide nucléique doit être catalysée [36]

Les hélicases adoptent des structures et des états d'oligomérisation différents. Alors que l'hélicase de type ADN-B agit sur l'ADN en tant qu'hexamères à filetage, d'autres enzymes se sont révélées être actives en tant que monomères ou en tant que dimères. Des études récentes ont montré que les hélicases n'attendent pas seulement passivement l'ouverture de la fourche, mais jouent un rôle actif en forçant l'ouverture de la fourche, ce qui en fait un moteur actif dans le déroulement de son substrat. Les hélicases peuvent agir beaucoup plus rapidement *in vivo* que *in vitro* en raison de la présence d'une série de protéines accessoires qui aident à la déstabilisation de la liaison dans l'épingle à cheveux [33][37].

3. Cas du virus SARS-CoV 2

Le génome du SARS-CoV-2 code deux cadres de lectures ouverts (Open Reading Frame) ORF 1a et 1b, qui, lorsqu'ils sont traduits, produisent deux polyprotéines qui sont transformées par des protéases virales en 16 protéines non structurales (nsp 1-16), et qui forment collectivement le *Complexe de Réplication et de Transcription virale* (RTC) dont l'nsp 13. (Figure 6) [38][39].

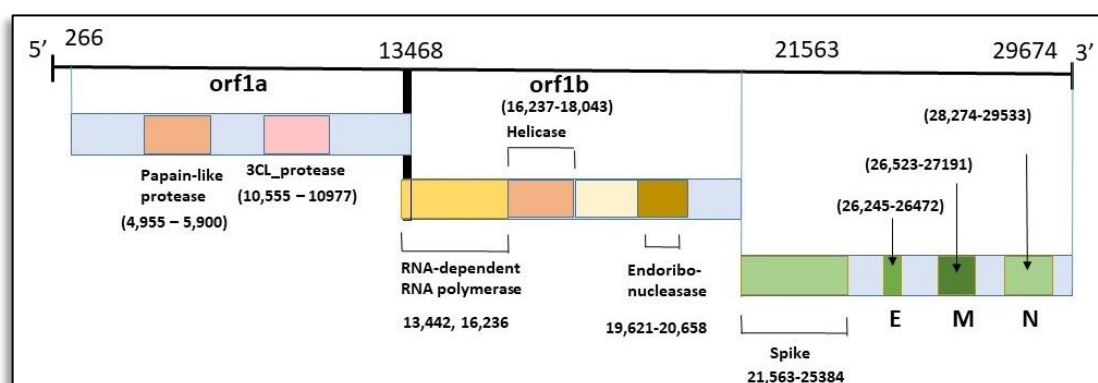


Figure 6 : génomique du SARS-CoV-2

L'enzyme non structurale 'nsp 13'

Alors que le rôle précis de l'nsp13 dans le cycle de vie viral n'a pas encore été déterminé, il s'est avéré être un composant critique pour la réplication virale dans le sars-cov-1 hautement similaire [38]. En effet elle peut dérouler l'ADN ou l'ARN avec une polarité 5' > 3' en utilisant non seulement l'ATP comme source d'énergie, mais également d'autres nucléotides (NTP) et désoxynucléotides [40]. Il a été démontré que l'nsp13 interagit avec le RTC (nsp7, nsp8, nsp12) pour synthétiser toutes les molécules d'ARN virale (Figure 7) [41][42][33].

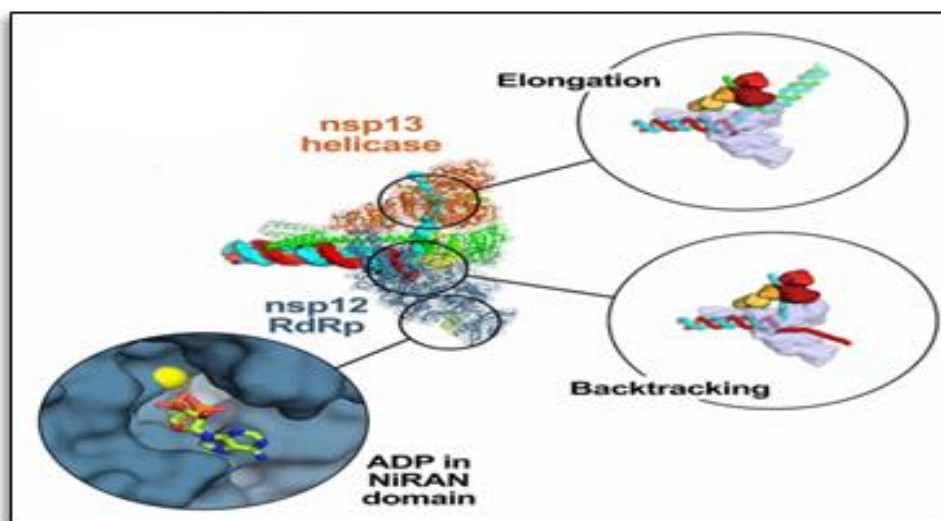


Figure 7 : complexe de réplication-transcription du SARS-CoV-2

4. Propriétés physico-chimiques de l'Nsp 13

Les propriétés physico-chimiques de la NSP13 sont mentionnées dans le tableau 5[43] :

Tableau 5 : Propriétés physico-chimiques de la NSP 13

<i>Propriétés physico-chimique</i>	<i>Hélicase SARS-CoV 2 NSP13</i>
N. d'acides aminés	601
Poids moléculaire (kDa)	66.85
Le totale des résidus avec charge négative (Glu+ASP)	52
Le totale des résidus avec charge positive (Lys +Arg)	64
Demi-vie	. 4H (in vitro) >20H (in vivo)

5. Les inhibiteurs de l'Nsp 13

Tous les nucléotides et désoxynucléotides naturels peuvent être ciblés comme substrats par l'activité NTPase de l'enzyme. La **conservation** de la séquence et le caractère **essentiel** de l'enzyme hélicase Nsp13 dans tous les coronavirus ont permis de cibler cette enzyme pour le développement de médicaments antiviraux (Figure 8)[44][45].

5.1. Les inhibiteurs naturels

Des études récentes ont identifié la *myricétine* et la *scutellaréine* comme nouveaux inhibiteurs chimiques de l'hélicase nsp 13 du SARS-CoV. Ils ont étudié les effets inhibiteurs de 64 composés naturels purifiés sur l'activité de l'hélicase du SRAS, nsP13, en effectuant un test de déroulement d'ADN double brin basé sur le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) ou en utilisant un test d'hydrolyse de l'ATP basé sur la colorimétrie. Bien qu'aucun des composés examinés de l'étude n'ait inhibé l'activité de déroulement de l'ADN ou l'activité ATPase de la protéine hélicase du VHC humain, on a constaté que la *myricétine* et la *scutellaréine* inhibent fortement l'hélicase du SRAS-CoV in vitro en affectant l'activité ATPase, mais pas l'activité de déroulement. une démonstration pour la première fois que certains flavonoïdes naturels, pourraient servir d'inhibiteurs chimiques du SARS-CoV[46].

5.2. Les inhibiteurs chimiques

L'activité de l'*nsp13* constituent une option thérapeutique potentielle pour le SAR-CoV-2. Les différentes approches de l'inhibition de l'activité nsp13 sont ; le ciblage de la liaison à l'ATP ou de l'activité directe de la NTPase, le blocage de la liaison des acides nucléiques à l'hélicase et le blocage de la translocation de l'hélicase. La classe de composés identifiés comme prometteurs par de tels mécanismes incluent le benzotriazole, l'imidazole, imidazodiazépine, phénothiazine, quinoléine, anthracycline, triphénylméthane, tropolone, pyrrole, acridone, petit peptide et dérivés de la bananine. Par exemple, les bananines inhibent l'activité de l'ATPase du CoV SRAS, ce qui entraîne l'inhibition de la réplication virale. Sur ces bases, des études sur le potentiel des inhibiteurs de l'hélicase virale dans l'infection par le SRAS-CoV2 ou le COVID-19 est bien justifiée (Figure 8) [44][40][34].

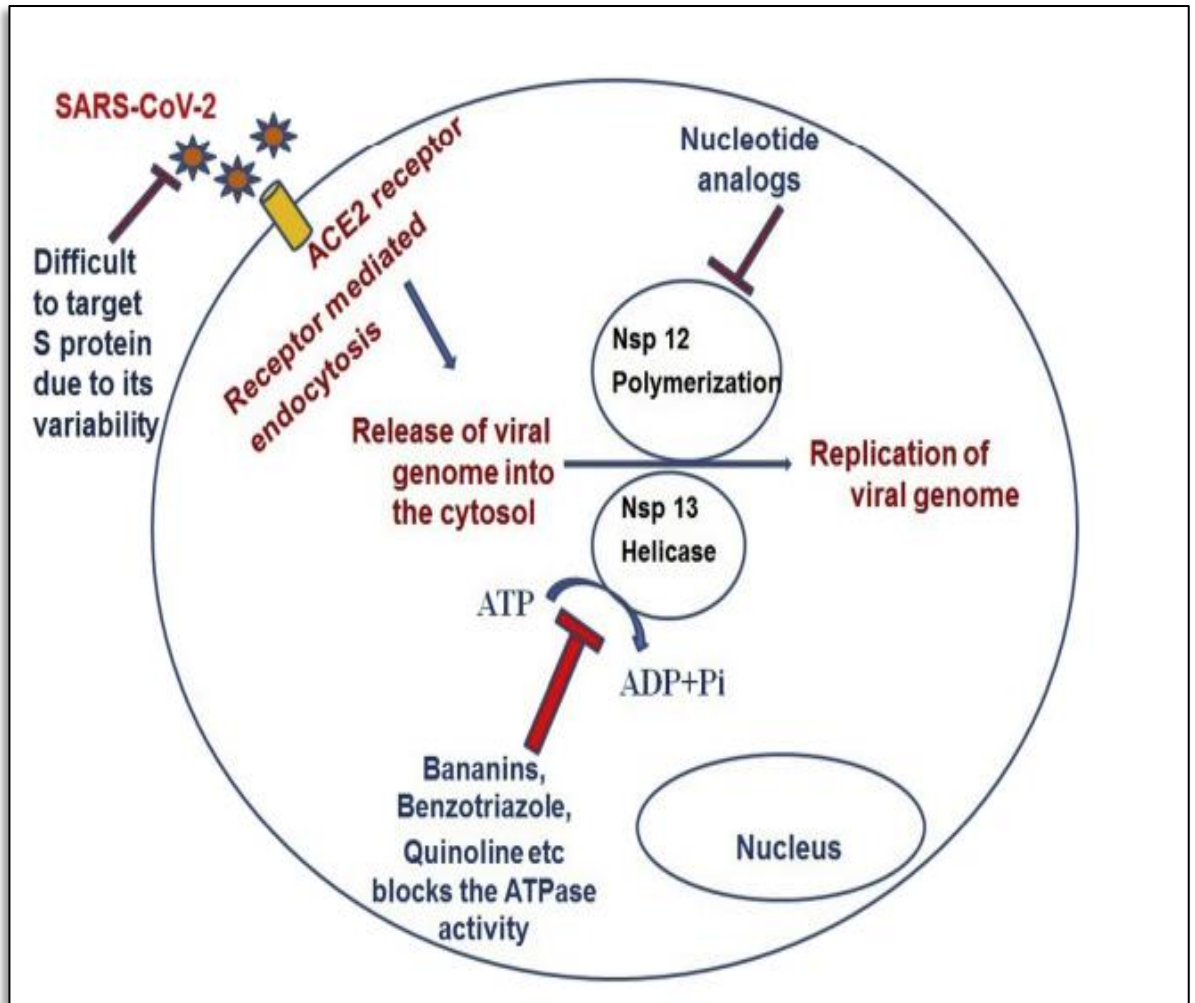


Figure 8 : Cibles plausibles pour le développement de médicaments contre le SARS-CoV-2

Chapitre III

Le docking moléculaire

1. Docking moléculaire (amarrage)

Après l'ère exigeant, long et surtout couteux de l'expérimentation *In vivo* et *in vitro* dans le domaine de la recherche scientifique, les méthodes *in silico* viennent donner un pas de géant pour le développement de nouveaux médicaments. En effet ce terme, nouvellement apparu (1989) et qui fait référence au composant essentiel des transistors utilisés dans les ordinateurs (silice), est un néologisme d'inspiration latine désignant une recherche ou un essai effectué au moyen de calculs complexes informatisés ou de modèles informatiques. [47]

Le docking moléculaire représente un puissant outil *in silico* pour aider à la conception des médicaments. Il peut être défini comme la capacité de prédire, avec un degré de précision substantiel, la structure et la conformation des complexes récepteur-ligand, où le récepteur est généralement une protéine ou une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) et le ligand est soit une petite molécule, soit une autre protéine [48]

2. Criblage virtuel

Le criblage virtuel par docking moléculaire est une approche théorique permettant la simulation de l'affinité d'un très grand nombre de ligands envers une cible thérapeutique donnée, ce qui est plus facile à mettre en œuvre, pour un coût bien moindre que le criblage à haut débit anciennement utilisé [49]. Le criblage virtuel permet donc de filtrer les molécules indésirables ou ceux ayant une faible affinité, ce qui aboutit à l'amélioration des résultats obtenus comparés aux méthodes traditionnelles.

3. Types de docking : du docking rigide vers l'introduction de la flexibilité

Il existe deux types de docking : Le docking lié (bound docking) et le docking non lié (unbound docking).

Dans le docking lié, on dispose à l'avance de la structure tridimensionnelle des molécules telles qu'elles seront dans le complexe. Il suffit alors de trouver comment associer ces deux corps rigides, sans devoir se soucier d'un éventuel changement de conformation dû à la flexibilité des molécules. En revanche, dans le cas du docking non lié, on dispose de la structure tridimensionnelle des molécules isolées, ces méthodes rencontrent plus de difficultés. Cette différence a pour conséquence une augmentation importante de la complexité du problème, le quelle provient des changements conformationnels qui peuvent apparaître dans les structures des molécules lors de leur liaison. [50][51].

Les types de docking sont répertoriés dans trois sous-classes suivant la manière dont la flexibilité est prise en compte :

- Le docking rigide où les molécules sont représentées comme des objets rigides qu'ils ne peuvent changer leurs formes spatiales durant le processus du docking.
- Le docking semi-flexible, où une seule molécule est considérée comme flexible.
- Le docking flexible, où les deux molécules sont considérées comme flexibles.

Les méthodes les plus courantes sont basées sur un ajustement géométrique des deux molécules et supposent qu'il n'existe pas de changement conformationnel lors de la formation du complexe. Bien que ce soit le cas dans la majorité des complexes, il existe quand même de petits changements conformationnels lors du phénomène de reconnaissance moléculaire. Une méthode récente propose de tenir compte des flexibilités conformationnelles des chaînes latérales des résidus de surface [50].

4. Le processus du docking

Les méthodes du docking cherchent à assembler les protéines afin de construire un complexe. Le processus de docking consiste à faire interagir une petite molécule organique avec le récepteur, généralement de nature protéique

L'objectif étant de parvenir à déterminer comment ces molécules vont s'agencer les unes par rapport aux autres

Le docking est capable de confronter deux entités telles que le ligand et le récepteur. L'avantage est de pouvoir prendre en compte un environnement complexe d'acides aminés dans lequel va évoluer le ligand[52][53].

4.1. Les récepteurs

Un récepteur est une protéine ou une substance biochimique cible capable de reconnaître et de se lier spécifiquement à une molécule informative. Les récepteurs peuvent être membranaires ou intracellulaire [54][55].

4.2. Les ligands

Les ligands sont des composés organiques divers qui peuvent se lier aux sites actifs des protéines afin qu'elles puissent remplir sa fonction ou jouer le rôle d'inhibiteur de l'enzyme [53] [56].

4.3. Le docking Ligand- Protéine

Cette approche ressemble à la situation de « la clé dans la serrure », quand le ligand est amarré dans la cavité de la protéine.

5. Programmes du docking

Le docking moléculaire est l'une des approches informatiques les plus populaires dans la conception moderne de médicaments basée sur la structure. Il peut être utilisé non seulement pour identifier la conformation correcte d'un ligand dans la cavité de liaison de la cible, mais aussi pour estimer la force de l'interaction entre la cible et le ligand.

Actuellement, de nombreux programmes de docking moléculaire sont disponibles dont AutoDock, AutoDock Vina, LeDock19, rDock, UCSF DOCK, LigandFit, Glide, GOLD, MOE Dock, Surflex-Dock, DOCK3, AutoDock4, GOLD5, FlexX6, Glide7, ICM8 et Surflex9 [57], [58].

La figure 9 illustre le nombre de citations des programmes de docking les plus courants (durant la période de 2001-2011), avec AutoDock, GOLD, DOCK, FlexX, Glide étant respectivement les plus cités [59].

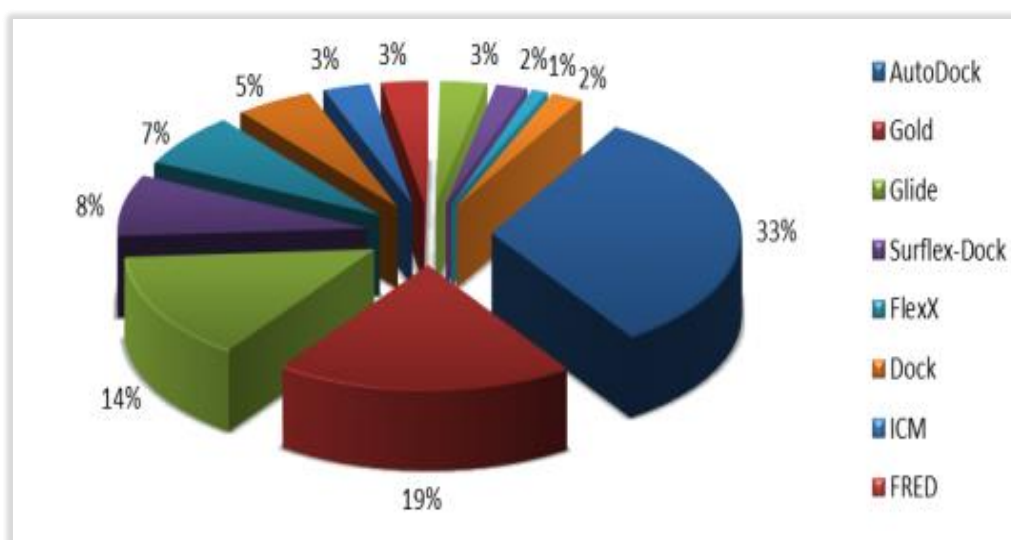


Figure 9 : Diagramme des programmes de docking les plus cités [59].

5.1. Le programme Surflex-dock

Le programme Surflex-Dock est l'une des techniques d'arrimage ligand-récepteur et l'un des programmes de criblage virtuel les plus efficaces, avec des caractéristiques favorables telles qu'une grande précision, un taux élevé de vrais positifs et une vitesse rapide.

C'est un algorithme de docking moléculaire flexible et entièrement automatique qui combine la fonction de notation du système de docking '*Hammerhead*' avec un moteur de recherche qui s'appuie sur une méthode de similarité moléculaire basée sur la surface comme moyen de générer rapidement des poses putatives appropriées pour les fragments moléculaires[60][61][62].

Ce processus met en œuvre une approche de recherche de construction incrémentielle et une nouvelle méthode d'assemblage de fragments ; chacune est plus rapide et plus précise. Cette nouvelle méthode d'assemblage de fragments est vaguement liée à l'approche de l'algorithme génétique, bien qu'il s'agisse d'une méthode déterministe[63].

6. La reconnaissance moléculaire

Ce terme désigne le processus d'association sélective par complémentarité entre deux entités moléculaires complexes. Il fait référence aux différentes interactions se formant entre deux ou plusieurs molécules, tel que : les liaisons non-covalentes, liaison hydrogènes, forces hydrophobes, van der Waals, interactions π -stack, et d'autres effets électrostatiques ou électromagnétiques. Ces interactions peuvent avoir un rôle dominant dans l'orientation de la reconnaissance de la complémentarité moléculaire, elles jouent un rôle important dans les systèmes biologiques et sont observées dans l'établissement de relations, entre récepteur-ligand, antigène-anticorps, ADN-protéine, sucre-lectine, ARN-ribosome[52].

6.1. Les interactions de Van der Waals

Les liaisons de Van der Waals doivent leur nom au physicien théoricien néerlandais Johannes Diderik Van der Waals (1837-1923). Il s'agit d'une liaison de type intermoléculaire qui se crée entre les molécules d'une substance [64]. Cette liaison est plus précisément une interaction électrique de faible intensité qui s'exerce entre les molécules présentant un moment dipolaires[65]. Par définition ces molécules sont globalement neutres mais présentent un pôle positif et un pôle négatif. Il s'exerce une force électrique globalement attractive entre les pôles de signes opposés des différentes molécules (Figure 10).

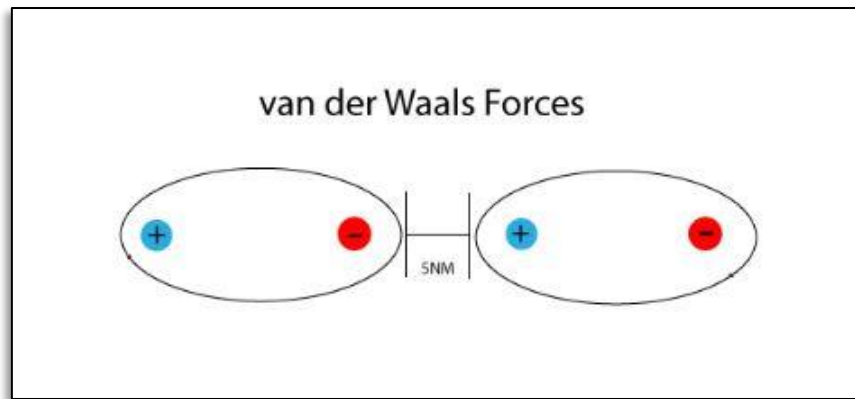


Figure 10 : Schéma représentatif d'une liaison de Van der Waals

6.2. Les liaisons ioniques

La liaison ionique implique un transfert d'électrons d'un atome à un autre. Ce type de liaison apparaît principalement lorsqu'une molécule est formée d'un métal et d'un non-métal. Dans une liaison ionique, l'atome qui perd un ou des électrons a une valeur d'électronégativité plus faible que celui qui gagne le ou les électrons. Ce type d'interaction mène à la formation d'ions : étant donné que les atomes gagnent ou perdent des électrons, ils se retrouvent avec une charge soit positive (cation) ou négative (anion) (Figure 11).

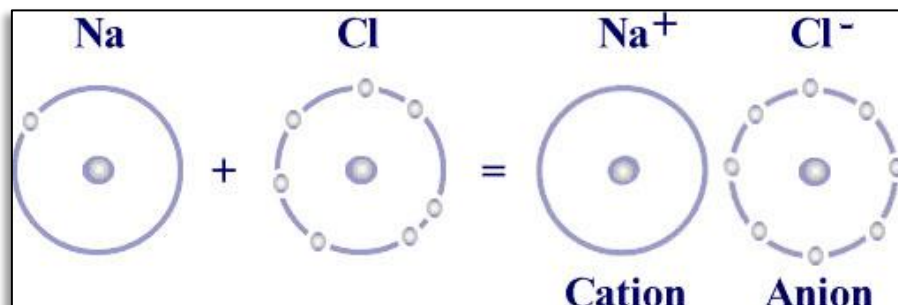


Figure 11 : Schéma représentatif d'une liaison ionique

6.3. Les liaisons hydrogènes

Pour que cette liaison s'établisse, il faut être en présence d'un donneur de liaison hydrogène et d'un accepteur : le donneur est composé d'un composé à H acide, c'est-à-dire un hétéroatome (azote, oxygène, fluor) porteur d'un atome hydrogène (comme dans les amines, alcools, thiols) ; l'accepteur est composé d'un hétéroatome (uniquement azote, oxygène ou fluor) porteur de doublets libres.

Lorsqu'une liaison hydrogène s'établit, les deux hétéroatomes se trouvent à une distance d'environ 2 Å [66] (Figure 12).

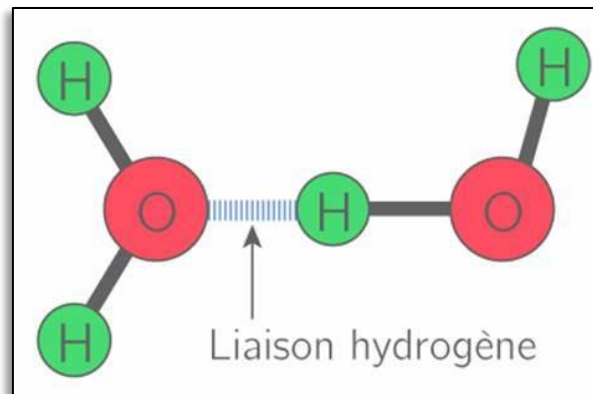


Figure 12 : Schéma représentatif d'une liaison hydrogène

6.4. L'effet hydrophobe

Les molécules ou groupes d'atomes non polaires ne sont pas capables de former des liaisons hydrogène et ne peuvent donc pas s'hydrater : pour cette raison, on les nomme substances hydrophobes. L'effet hydrophobe est la tendance qu'ont ces groupes à se rassembler par coalescence de façon à minimiser les contacts avec l'eau (figure 13). Les liaisons hydrophobes possèdent une énergie de l'ordre de 7 kcal/mol

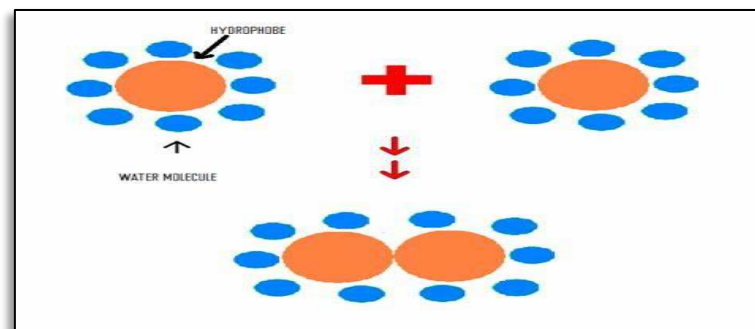


Figure 13 : Schéma représentatif de l'effet hydrophobe

Partie
pratique

Chapitre IV

Material and Methods

1. Material

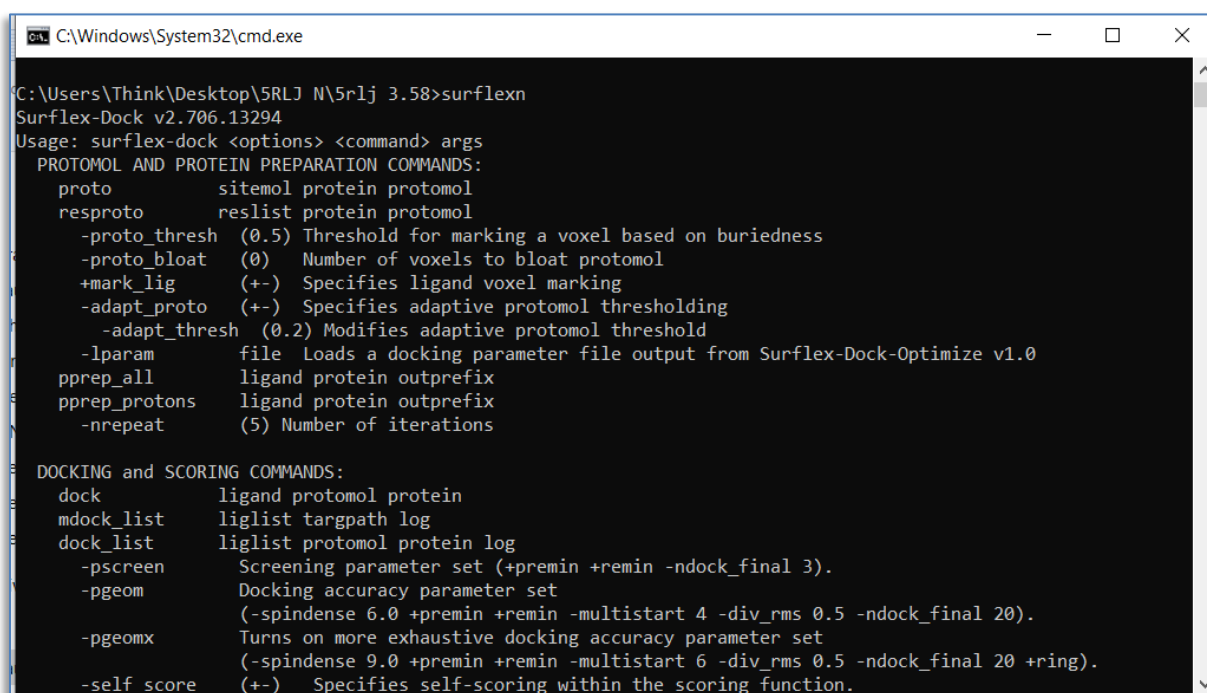
1.1. Hardware

This study was performed on computer running Windows 10 64bit, equipped with Intel(R) Core (TM) i5-4300U CPU.

1.2. Software

1.2.1. Surflex-Dock v 2.706.13294 2013

Surflex is a fully automatic flexible molecular docking algorithm based on an idealized active site ligand (a protomol) (Figure 14).



```

C:\Windows\System32\cmd.exe
C:\Users\Think\Desktop\5RLJ N\5rlj 3.58>surflexn
Surflex-Dock v2.706.13294
Usage: surflex-dock <options> <command> args
PROTOMOL AND PROTEIN PREPARATION COMMANDS:
proto          sitemol protein protomol
resproto       reslist protein protomol
-proto_thresh  (0.5) Threshold for marking a voxel based on buriedness
-proto_bloat   (0)   Number of voxels to bloat protomol
+mark_lig      (+-) Specifies ligand voxel marking
-adapt_proto   (+-) Specifies adaptive protomol thresholding
-adapt_thresh  (0.2) Modifies adaptive protomol threshold
-lparam        file  Loads a docking parameter file output from Surflex-Dock-Optimize v1.0
pprep_all      ligand protein outprefix
pprep_protons  ligand protein outprefix
-repeat        (5)   Number of iterations

DOCKING and SCORING COMMANDS:
dock           ligand protomol protein
mdock_list     liglist targpath log
dock_list      liglist protomol protein log
-pscreen       Screening parameter set (+premin +remin -ndock_final 3).
-pgeom         Docking accuracy parameter set
               (-spindense 6.0 +premin +remin -multistart 4 -div_rms 0.5 -ndock_final 20).
-pgeomx        Turns on more exhaustive docking accuracy parameter set
               (-spindense 9.0 +premin +remin -multistart 6 -div_rms 0.5 -ndock_final 20 +ring).
-self_score    (+-) Specifies self-scoring within the scoring function.
  
```

Figure 14: Surflex terminal

1.2.2. Protein Data Bank sever

The PDB is the single global archive of experimentally determined three-dimensional (3D) structure data of biological macromolecules[67]. The data, obtained by Xray crystallography or NMR spectroscopy and submitted by scientists from all around the world, is free access (Figure 15).

The screenshot shows the RCSB PDB website interface. At the top, there are navigation menus: Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, Learn, More, and Documentation. A search bar is present with the text "Enter search term(s)". Below the search bar, there are logos for PDB-101, PDB, and other related organizations. The main content area displays the entry "5RLJ" with a 3D ribbon diagram of the protein structure. To the right of the diagram, there is a text box containing the following information:

5RLJ
 PanDDA analysis group deposition -- Crystal Structure of SARS-CoV-2 helicase in complex with Z1407673036
 DOI: 10.2210/pdb5RLJ/pdb Deposition Group: [G_1002164 \(changed state\)](#)
 Classification: VIRAL PROTEIN
 Organism(s): Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
 Expression System: Escherichia coli
 Mutation(s): No
 Deposited: 2020-09-16 Released: 2020-09-30
 Deposition Author(s): Newman, J.A., Yosaatmadja, Y., Douangamath, A., Aimon, A., Powell, A.J., Dias, A., Fearon, D., Dunnett, L., Brandao-Neto, J., Krojer, T., Skyner, R., Gorrie-Stone, T., Thompson, W., von Delft, F., Arrowsmith, C.H., Edwards, A., Bountra, C., Gileadi, O.

Figure 15: Graphic interface of the PDB server

1.2.3. Pdbaser v 1.6

It is an open-source program designed to provide a fast way to separate ligands and chains from proteins while keeping their spatial coordinates unchanged for molecules extraction [68] (figure 16).

The screenshot shows the PDBaser GUI. It has three main panels: "PDB File", "Chain", and "Residue". The "PDB File" panel shows "5rlj (2).pdb" selected. The "Chain" panel shows "A" and "B" selected. The "Residue" panel shows "VW4 701" selected, with a list of residues below it: "{ ZN} 702", "{ ZN} 703", "{ ZN} 704", "PO4 705", and "PO4 706". To the right of the residue list is a 2D chemical structure of a ligand, which is a benzene ring attached to a side chain containing a sulfur atom double-bonded to an oxygen atom and single-bonded to a methyl group (CH3) and an amino group (NH2). Below the panels, there is a "Find" search box, a "Get from PDB" input field, and a "Download" button. There are also checkboxes for "Save 2D depiction", "Save full protein", and "Add hydrogens". At the bottom, there are "Input directory" and "Output directory" fields, an "Extract" button, and the version number "Abdelaziz, A, PDBaser(1.6)".

Figure 16: Graphic interface of PDBaser program

1.2.4. Open Babel v 3.1.1

It is free and open-source software chemical expert system mainly used to interconvert chemical file formats [69] (Figure 17).

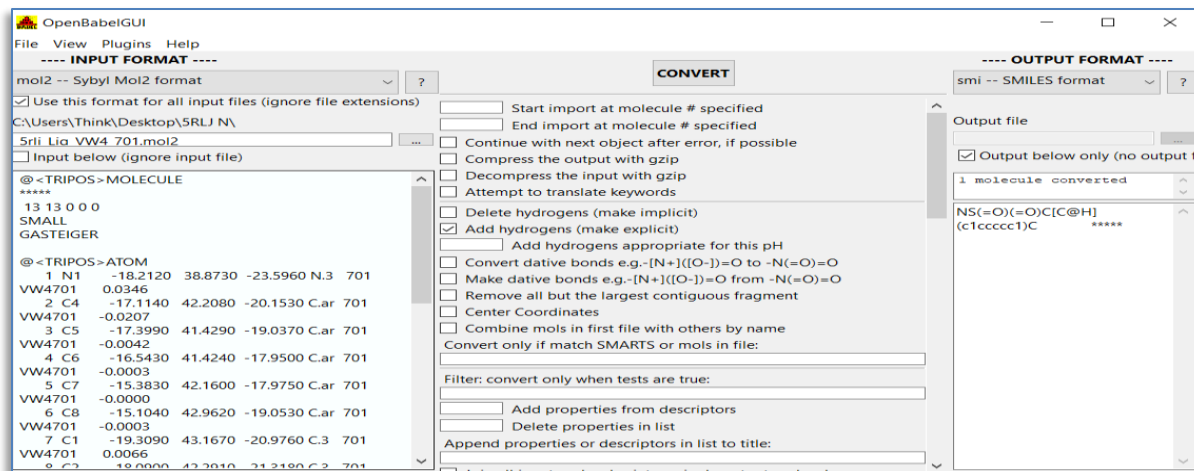


Figure 17: graphic interface of Open Babel program

1.2.5. Chem3D v 19.1

Is a software program used by chemists and biologists worldwide to draw molecular structures and saving them in several formats (figure 18).

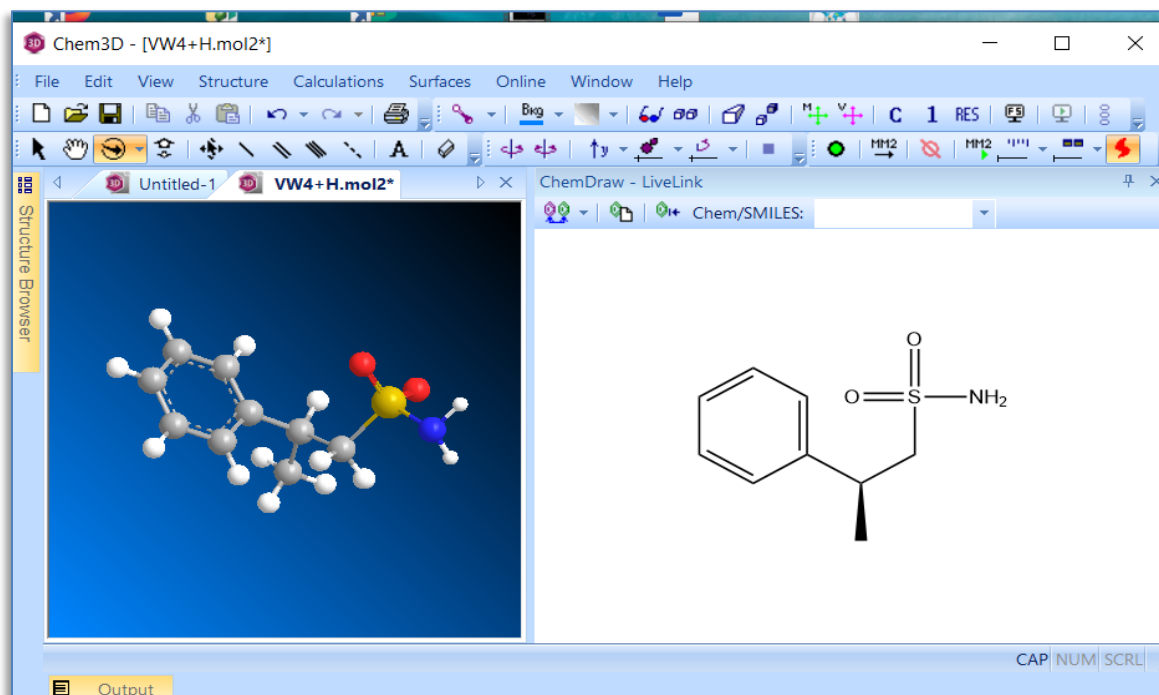


Figure 18: Graphic interface of chem3d software

1.2.6. Discovery Studio 2021

The *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* is a free, feature-rich molecular modeling application for viewing, sharing and analyzing protein and small molecule[70] (Figure 19).

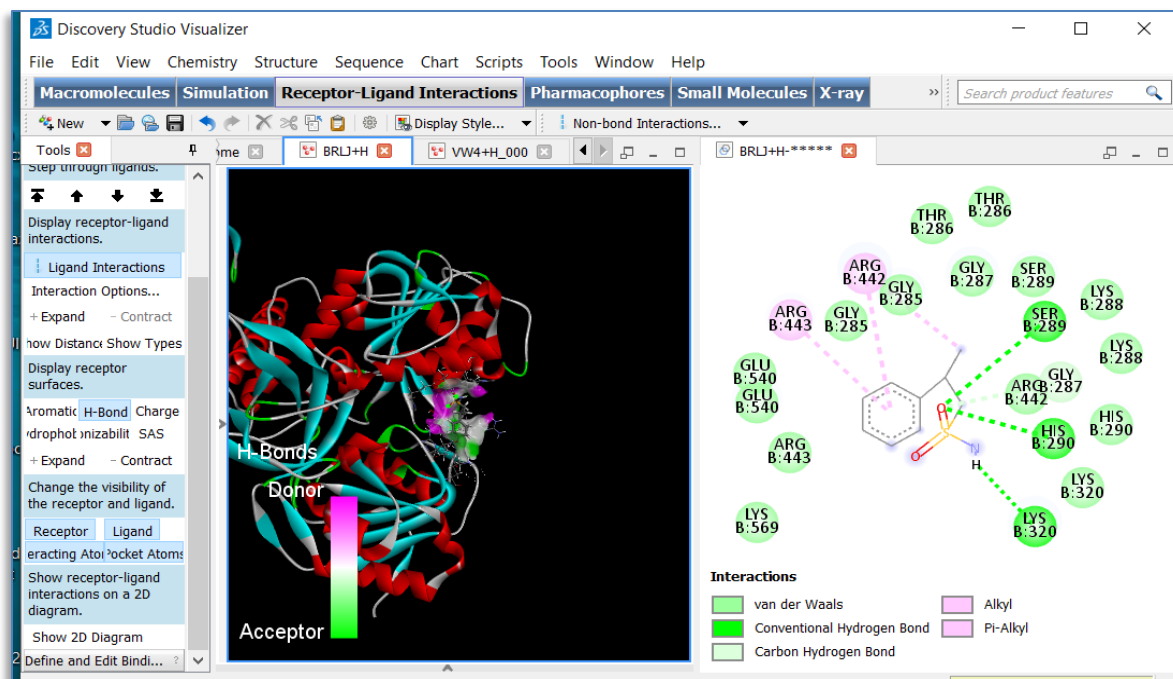


Figure 19: Graphic interface of Biovia discovery visualizer

1.2.7 ADMETlab 2.0

It is a free web server that calculates physicochemical and predict pharmacokinetic and toxicity parameters of molecules selected by molecular docking [71]. (Figure 20)

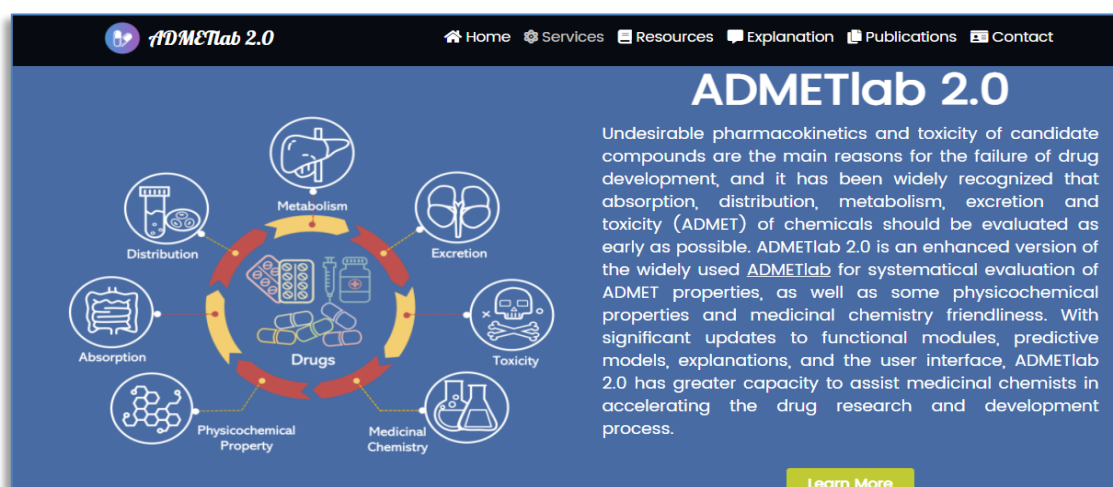


Figure 20: Graphic interface of ADMETLAB 2.0 server

2. Methods

2.1. Assessment of Docking Quality by “RMSD”

The ability of predicting correct ligand poses was validated using the *RMSD test* (*Root mean square deviation*) which corresponds to the average of the deviation between the ligand placement calculated by the software and the original one downloaded from the PDB; in other words, *RMSD* means the difference between predicted and observed conformation. The smaller the *RMSD* is between two structures, the more similar they are. [72]. So, we downloaded randomly 100 complex crystal structures from the pdb and their RMSD was calculated.

2.2. Receptor preparation

In this study we selected helicase “nsp13” as target; its 3D structure has been downloaded from the PDB under the code 5RLJ. The choice of this particular ID was dictated by its best resolution (1.88 Å°); this code represents the 3D crystal structure of SARS-CoV-2 helicase in complex with a co-crystallized inhibitor that has the code VW4.

5RLJ is a homodimer enzyme composed of 601 amino acids with two identical chains (A, B), using *Pdbaser* program we had removed its chain A, water and different ligands in order to keep only one chain with its free active site for an easy use of molecular docking, the atoms of hydrogens were added to the chain B using *Open Babel* program, thereby the prepared enzyme was exported in a *mol2* file format.

2.3 Ligands preparation

To prepare several types of ligands we proceeded according to two approaches; natural products and substitution molecules.

2.3.1 Natural products

Aromatherapy has experienced a revival since the end of the 20th century. Used for thousands of years; plants offer, through their many therapeutic properties, a serious alternative to patients increasingly turning to natural medicine. It is in this sense that we have selected eight molecules from plants widely used in Algeria during this pandemic: Oregano, thym, Basil, Clove, Ginger; their most common compounds (caffeic ac, curcumene ac, coumaric ac, gallic ac, menthol, ferulic ac, rosmarinic ac and sinapic ac) were drawn and exported in *mol2* format using *Chem3D* software; and docked with the protein 5RLJ.

2.3.2 Substitution approach

We used the 3D structure of VW4 inhibitor for both active site determination and as substitution ligands scaffold.

2.4 The protomol generation

The Surfex program generates its own theoretical active-site, it is called a “protomol”. This step was realized by the following command.

```
Surfex-dock proto ligand.mol2 protein.mol2 pl
```

2.5 The molecular docking

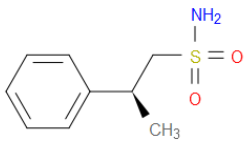
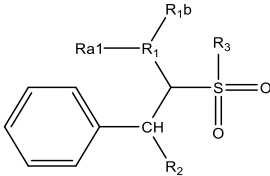


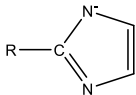
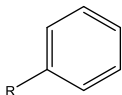
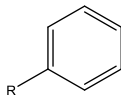
Studying molecular recognition using computational tools aims to predict the binding mode of complex protein-ligand. Therefore, we docked the compounds resulting of earlier substitution protocol by Surfex program which allows having the best twenty (20) positions of each ligand in the studied active site, classified by their affinity score. This step has been realized by the following command:

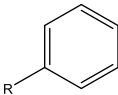
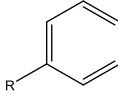
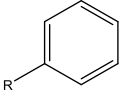
```
Surfex-dock ligand.mol2 pl-protomol.mol2 protein.mol2
```

2.6 Designing of new substitutes molecules of VW4

In order to identify novel and more efficient nsp13 inhibitor than VW4; we modified its structure using *Chem3D* program. In this context, several types of substitutions were carried out (mono, di, tri and quadric substitution) The geometry of the resulting compounds was optimized by minimizing energy and finally they were exported in mol2 format. (Table 6).

Table 6 : Substitutions carried out

Reference Ligand (VW4)		Substitutions	
			
Monosubstituted compound	R1	R2	R3
M1	OH		
M2		Hydroxyle OH	
M3			Hydroxyle OH
M4	Amide 		
M5			Amide 
M6	Amine NH ₂		
M7		Amine NH ₂	
M8	Imidazole 		
M9	Benzène 		
M10		Benzène 	

M11			Benzène 	
Bi-substitute compo	R1 a		R1 b	
B1	Aldéhyde	CHO	Carboxyle	COOH
B2	Aldéhyde	CHO	Hydroxyle	OH
B3	Hydroxyle	OH	Carboxyle	COOH
Tri-substitute compound	R1a		R1b	R2
T1	Aldéhyde CHO		Carboxyle COOH	Benzène 
Quadri-substitute	R1a	R1b	R2	R3
Q4	Aldéhyde CHO	Carboxyle COOH	Benzène 	OH

2.7 ADME/TOX

To predict the pharmacokinetic proprieties of the most promising products predicted by molecular docking, an ADME / Tox computational study was performed using ADMETlab 2.0 server (<http://www.admetmesh.scbdd.com>) for physicochemical property determination, Lipinski rule, cytochrome P450 (CYP) inhibition and toxicity (respiratory toxicity and carcinogenicity). Each potential drug must comply with several basic criteria, such as its low production cost, be soluble, stable, but must also comply with scales associated with its pharmacological properties of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity.

Chapitre

V

Results and discussion

1. Surflex reliability testing

Before discussing the study of the inhibition of nsp13 enzyme by various molecules, we evaluated the reliability of the Surflex program by the determination of the *RMSD* followed by a visualization of the formed complexes.

According to the results obtained by Chikhi and Bensegueni (62%) [73], The *RMSD* results allowed us to note that the *Surflex* software shows a performance to reproduce the experimental poses, indeed; 81% of the *RMSD* values are less than 2 Å (Figure 21).

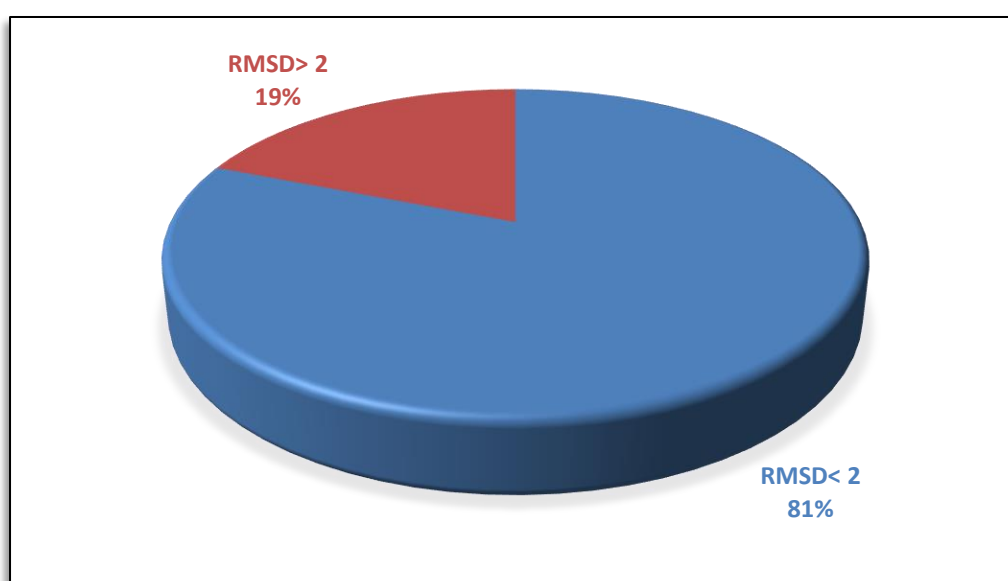
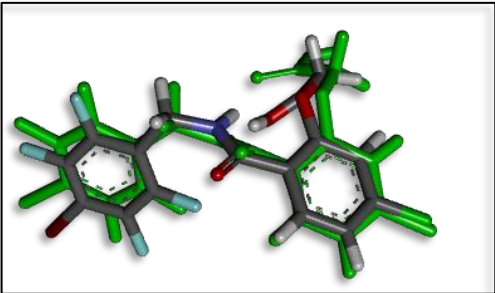
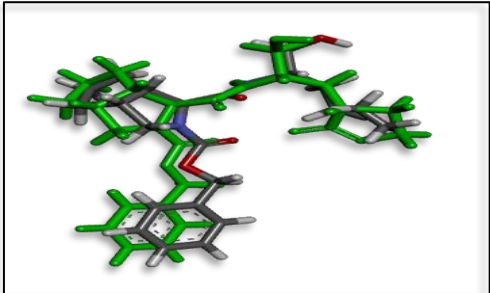
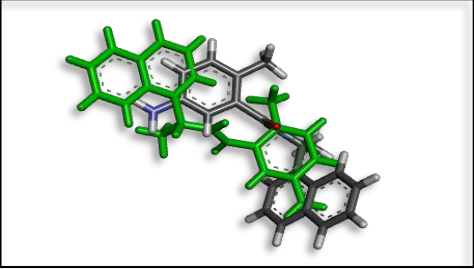


Figure 21: results in percentage of the RMSD test

2. Visual Analysis

It is an essential step to confirm the results of *RMSD*. In this context, we have visualized three complexes in order to ensure the performance of *Surflex*. The complexes 4LB4 ,7LYH and 7JRN. As shown in table 7, low obtained *RMSD* values result in a superposition between the models of the simulated ligands by *Surflex*.

Tableau 7: Visual analysis of RMSD: Superposition of the crystal conformation of the ligands with the best predicted poses (green color).

PDB code			Ligand code	RMSD (Å)	Superposition
4LB4			1WX	0,70	
7LYH			YHJ	1.35	
7JRN			TTT	8.01	

3. Interaction's study

The residues GLY 285, THR286, GLY 287, LYS 288, SER 289, HIS 290, LYS320 and ARG 442 were found to be present in the binding pocket of the nsp13 enzyme (Figure 22).

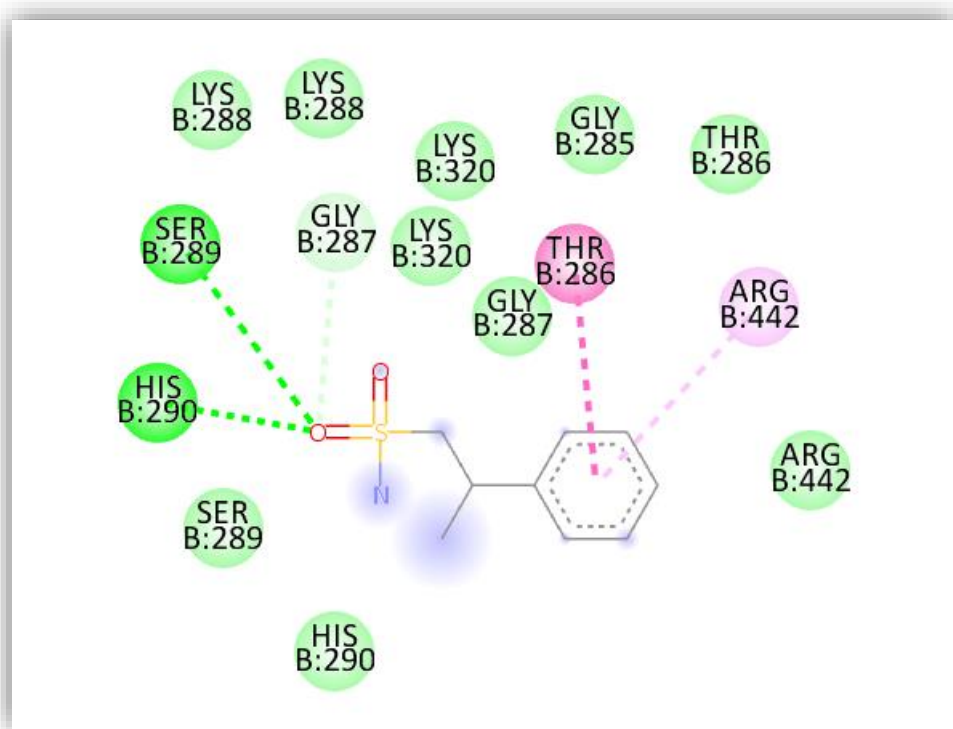


Figure 22: Surface representation of VW4 and most relevant binding residues;

3.1. Nsp13/VW4 interactions

First, we studied the way these two molecules react between them, as shown in figure 23 it's appeared that VW4 is stabilized in the active site by establishing essentially four hydrogen bonds with its amino acids' residues (SER 269, HIS 290, LYS 320 and GLY 287) and secondary by forming three hydrophobic bonds (ARG 442 (alkyl and Pi-alkyl) and ARG 443 (Pi-alkyl)).

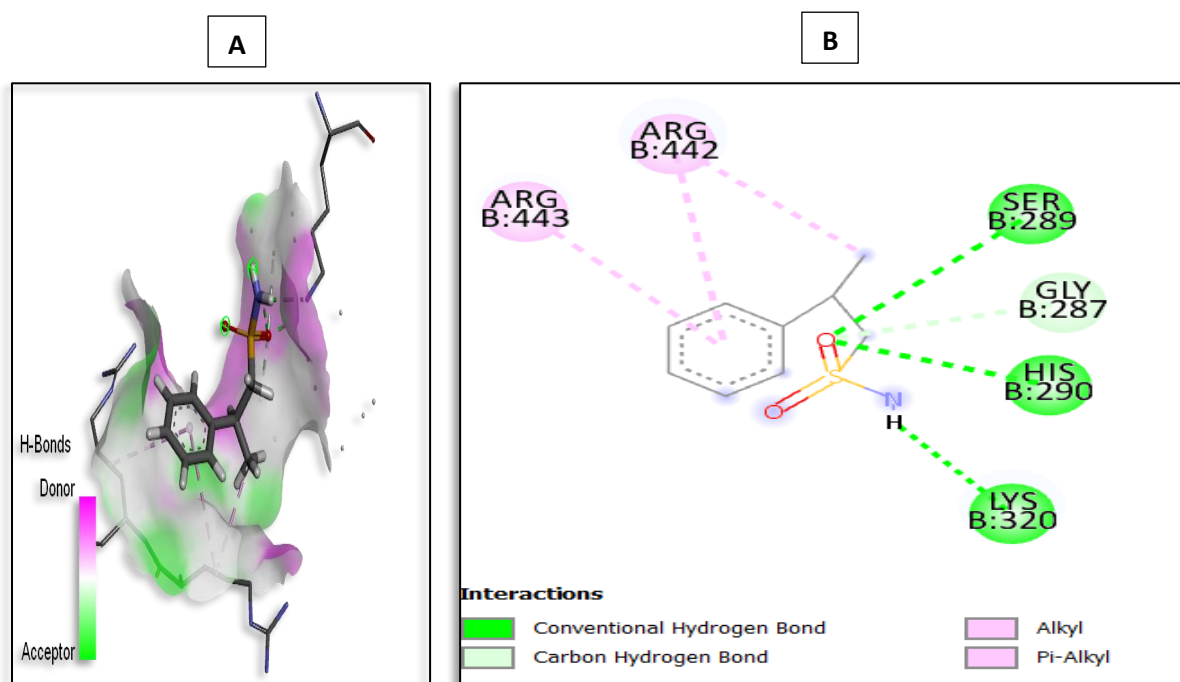


Figure 23: (A) illustration of the active site surface hydrogen bonds predicted between the nsp13 and its pdb ligand; VW4, (B) hydrogen bond (green dotted lines represents) and hydrophobic interaction (pi-alkyl is shown in purple color dotted lines).

In table 8 we illustrate the links types and distances of nsp13-VW4 complex

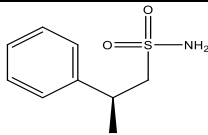
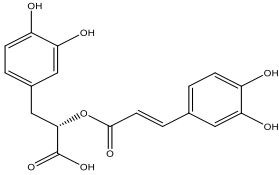
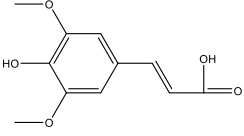
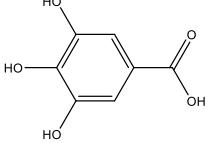
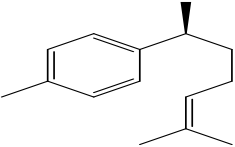
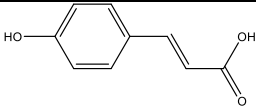
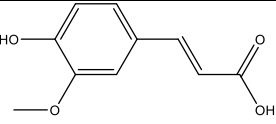
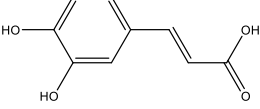
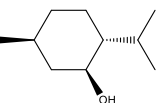
Table 8: Types and distances of interactions between nsp13 and VW4

<i>Interactions</i>	<i>Involved aa</i>	<i>H Donor</i>	<i>H acceptor</i>	<i>Distance(A°)</i>
Hydrogen	SER 289	Ser: HN	Ligand: O2	2.77
//	HIS 290	His: HN	Ligand: O2	1.97
//	LYS 320	Ligand: H	Lys: NZ	2.14
Carbon hydrogen	GLY 287	GLY: HA1	Ligand: O2	2.27
Hydrophobic Alkyl	ARG 442	Ligand:C1 alkyl	ARG alkyl	4.17
Hydrophobic PI-alkyl	ARG 442	Ligand: Pi-orbital	ARG alkyl	4.92
//	ARG 443	//	//	4.65

4.2. Nsp13/natural compounds interactions

As displayed in table 9; the Rosmarinic acid has shown the highest binding score with 6.68 M^{-1} , which is a good result in comparison with the reference ligand score (3.58 M^{-1}).

Table 9: Chemical structure and scores of the natural compounds docked by Surflex in comparison with the reference ligand.

<i>Compound</i>	<i>Score M-1</i>	<i>2D Structure</i>
VW4	3.58	
Rosmarinic Acid	6.98	
Sinapic acid	4.69	
Gallic-acid	4.44	
α curcumene acid	3.95	
Coumaric-acid	3.70	
Ferulic acid	3.61	
Caffeic acid	3.00	
Menthol	2.63	

The improvement of the predicted binding score is due to the establishing of new links including six hydrogen bonds with the active site residues like it is mentioned in figure 24.

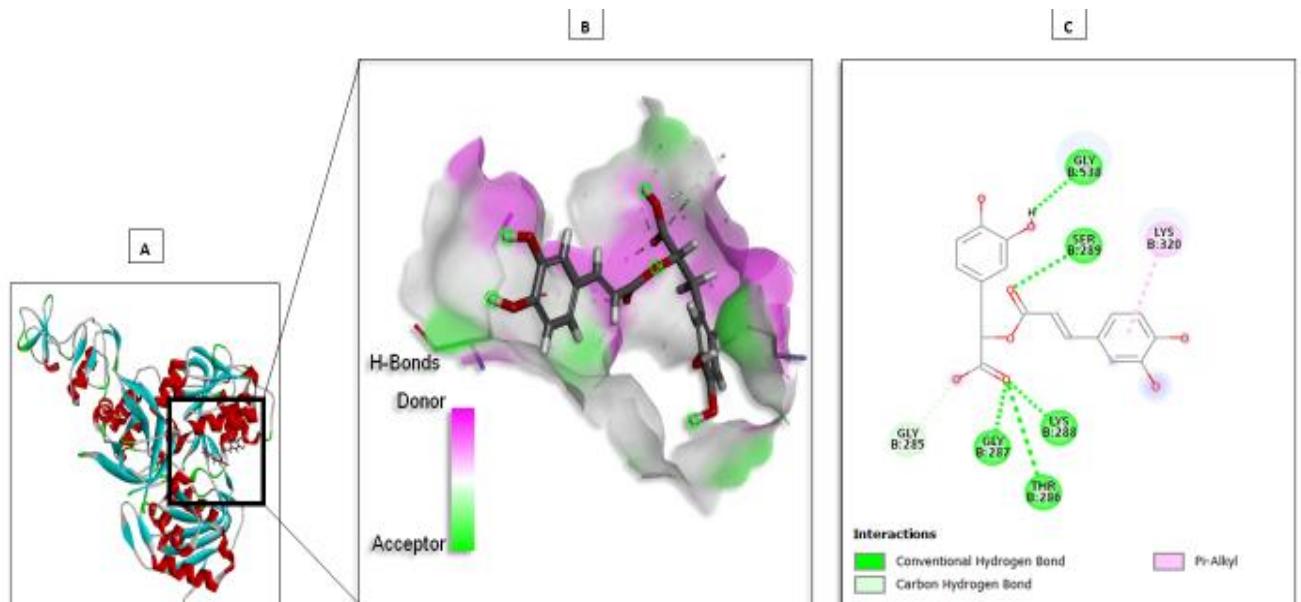


Figure 24: (A) Rosmarinic acid (stick model) interactions with 5RLJ; (B) active site surface of the H bonds of the interaction; (C) hydrogen bond (green dotted lines represents) and hydrophobic interaction (pi-alkyl is shown in purple color dotted lines).

The table 10 illustrates the amino acid involved in every interaction, its type and its distance.

Table 10: Types and distances of interactions between nsp13 and rosmarinic acid

<i>Interactions</i>	<i>Involved aa</i>	<i>H Donor</i>	<i>H acceptor</i>	<i>Distance(A°)</i>
Hydrogen	THR 286	THR: HN	: O	3.02
//	GLY 287	GLY: HN	: O	1.83
//	LYS 288	LYS: HN	: O	1.98
//	SER 289	SER: HG	: O	2.11
	//	SER: HN	: O	1.92
//	GLY 538	: H	GLY: O	1.88
Carbon hydrogen	GLY 285	: HA2	: O	2.18
Hydrophobic	LYS 320	: Pi-orbital	LYS: alkyl	3.56
PI-alkyl				

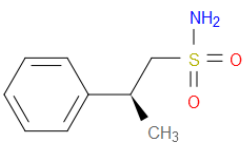
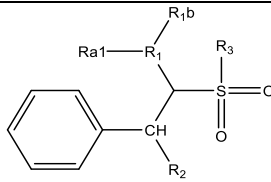


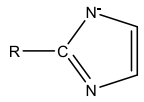
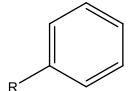
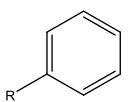
3.3. Nsp13/substituted compounds interactions

As said in preparation of ligands, we used VW4 as scaffold for new molecules substitution; sixteen molecules were prepared and docked, the most promising molecules present remarkable improvement in predicted binding score (table 11).

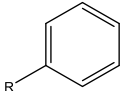
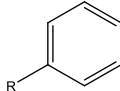
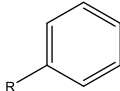
It should be noted that the improvement is due to the setting up of new links and interactions because of the structural modifications performed.

The compound T1 was the most promising potent inhibitor among the substituted ligands; Its binding score was improved from 3.58 (for the vw4 ligand) to 6.85 M⁻¹ (Table 11).

Table 11: Compound's binding scores predicted by Surflex

Reference Ligand (VW4)		Substitutions		
				
Monosubstituted compound	R1	R2	R3	Score M ⁻¹
M1	OH			3.73
M2		Hydroxyle OH		2.35
M3			Hydroxyle OH	4.07
M4	Amide			3.55
M5			Amide	3.00
				
M6	Amine NH ₂			2.68
M7		Amine NH ₂		2.76
M8	Imidazole			3.35
				
M9	Benzène			3.25
				
M10		Benzène		3.93
				

Results and discussion

M11			Benzène		4.46
Bi-substitute compo	R1 a		R1 b		
B1	Aldéhyde CHO		Carboxyle COOH		5.56
B2	Aldéhyde CHO		Hydroxyle OH		4.45
B3	Hydroxyle OH		Carboxyle COOH		4.80
Tri-substitute compound	R1a		R1b	R2	
T1	Aldéhyde CHO		Carboxyle COOH	Benzène 	6.58
Quadri-substitute	R1a	R1b	R2	R3	
Q4	Aldéhyde CHO	Carboxyle COOH	Benzène 	OH	5.70

It forms seven hydrogen bonds with active site amino acids residues of the nsp13 (Figure 25); their characteristics are mentioned in table 12.

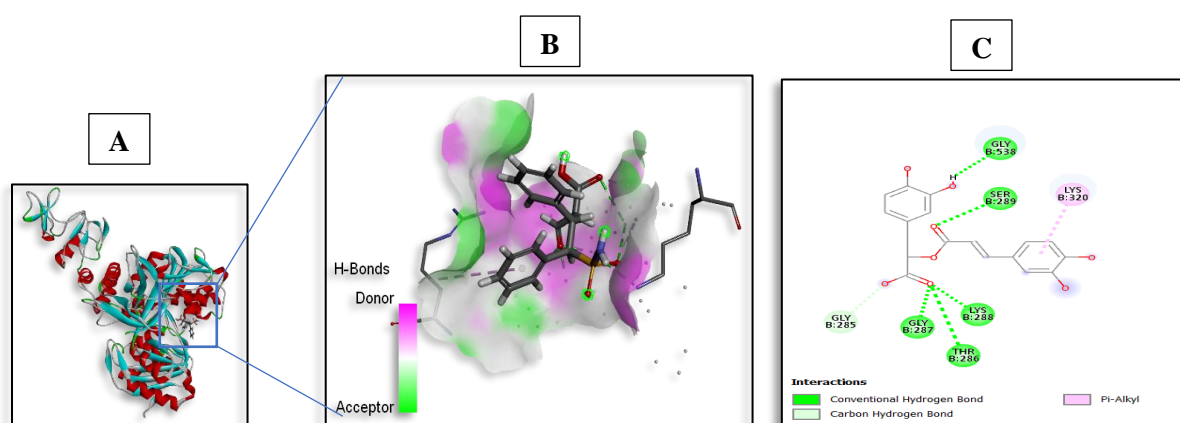


Figure 25: (A) T1 compound (stick model) interactions with 5RLJ. (B) active site surface of the H bonds of the interaction; (C) hydrogen bond (green dotted lines represents) and hydrophobic interaction (pi-alkyl is shown in purple color dotted lines).

Table 12: Types and distances of interactions between nsp13 and T1 compound

<i>Interactions</i>	<i>Involved aa</i>	<i>H Donor</i>	<i>H acceptor</i>	<i>Distance(A°)</i>
Hydrogen	THR 286	THR: HN	: O	2.65
//	GLY 287	GLY: HN	: O	1.94
//	LYS 288	LYS: HN	: O	2.12
//	SER 289	SER: HG	: O	2.82
//	HIS 290	HIS: HN	: O	1.75
//	LYS 320	: H	LYS: NZ	2.19
Hydrophobic	ARG 443	: Pi-orbital	ARG: alkyl	5.42
PI-alkyl				

4. ADME Study

Using ADMETlab 2.0 server, we calculated the physicochemical properties and predicted the pharmacokinetic parameters of the most promising hits (Rosmarinic acid and T1 compound). It helps us to check their ability of being suitable for use as medicinal products. The same parameters were also studied for VW4 for comparison. The results showed that both compounds successfully passed ADME tests (Table 13,14).

As shown in Table 14, the three compounds comply perfectly with Lipinski rule, which indicates that compounds that do not match at least three of the five criteria are likely to cause oral administration difficulties. This allows us to conclude that our molecules have a good oral bioavailability.

All potential drugs had to meet Lipinski's rule of five, which states that likely orally active drug must complete two of the following properties:

- no more than 05 hydrogen bond donors.
- No more than 10 hydrogen bond acceptors.
- The molecular weight under 500 g/mol¹.
- The partition coefficient (log P) below 5.

Table 13: Physicochemical property

Properties	VW4	Rosmarinic acid	T 1	Comment
Molecular Weight (g/mol)	199.07	360.08	347.08	Optimal 100-600
nHA	3	8	6	Number of hydrogen bond acceptors.
nHD	2	5	3	Number of hydrogen bond donors.
nRot	3	7	7	Number of rotatable bonds
Log P	1.142	1.775	1.28	Log of the octanol/water partition coefficient
SA score	2.406	2.903	3.521	<ul style="list-style-type: none"> ■ Synthetic accessibility score is designed to estimate ease of synthesis of drug-like molecules. ■ SAScore ≥ 6, difficult to synthesize; SAScore

Table14 : Medicinal chemistry

Properties	VW4	Rosmarinic acid	T 1	Comment
Lipinski Rule	Accepted	Accepted	Accepted	<ul style="list-style-type: none"> ■ $MW \leq 500$; $\log P \leq 5$; $Hacc \leq 10$; $Hdon \leq 5$ ■ If two properties are out of range, a poor absorption or permeability is possible, one is acceptable
CYP inhibitor	None	None	None	CYP1A2 CYP3A4 CYP2C19 CYP2D6

The finding results suggest that our compounds have a favourable effect on the Cyp isoforms.

5. Toxicity study

Finally, we evaluated the potential toxicity of the three compounds (VW4, rosmarinic acid and T1 compound). As displayed in table 15, the reference ligand (VW4) presents carcinogenic risk. The two other compounds show no risk which is an advantage for our results.

Table 15 : Toxicity

Properties	VW4	Rosmarinic acid	T 1
Respiratory Toxicity	No risk	No risk	No risk
Carcinogenicity	++	No risk	No risk

The obtained results showed that both compounds have successfully passed ADME/Toxicity tests, which is the goal of this study.

*!

6. CONCLUSION

In this study, we used Surflex program for molecular docking approach to predict the affinity and interaction modes of both natural and substituted molecules. First, the docking protocol was validated by applying the RMSD test and the visuals analysis. This approach allowed us to suggest Rosmarinic acid and T1 compound as potential new inhibitors of SARS-CoV-2 nsp 13 binding site. These proposed compounds were predicted to have good ADMET profiles.

Conclusion générale

Conclusion Générale

L'objectif principal de ce travail de master est de développer et évaluer *in silico* au moyen du docking moléculaire par Surflex, de nouveaux inhibiteurs de l'hélicase (nsp13) ; une enzyme essentielle pour la réplication du virus de la covid-19 : le Sars-Cov-2.

Tout d'abord, nous avons évalué la fiabilité des résultats du logiciel Surflex à l'aide de deux tests différents. Le premier test consiste à calculer l'écart quadratique moyen (RMSD), qui permet de comparer la différence entre la pose du ligand simulée par Surflex, et celle obtenue expérimentalement par cristallographie. Nous avons choisi aléatoirement 100 complexes protéines-ligands issues de la PDB, 81 complexes ont présenté de faibles valeurs RMSD (inférieure à 2 Å), ce qui est parfaitement convenable aux normes. Ces résultats ont été ensuite confirmés par une analyse visuelle du positionnement de trois ligands simulés virtuellement par rapport à leurs ligands de référence issus de la PDB, cette analyse était en faveur d'une grande précision des résultats. Grâce à ces deux tests, nous avons pu conclure que le logiciel Surflex est suffisamment fiable pour simuler les interactions nsp13-inhibiteurs, en toute confiance et sans risque.

Afin d'améliorer le score d'affinité du ligand de référence de l'nsp13, à savoir le VW4, qui est de 3.58 M^{-1} , nous avons procédé selon deux approches : la première était basée sur le docking de molécules entièrement naturelles, pour la seconde approche, nous avons modifié structurellement le ligand de référence (VW4), les molécules résultantes de cette substitution ont été dockées et évaluées *in silico*. Ce travail a révélé l'acide rosmarinique (parmi les molécules naturelles) et le composé T1 (parmi les substituants du VW4) comme meilleurs inhibiteurs de l'nsp13 avec des scores de 6.98 M^{-1} et 6.58 M^{-1} respectivement.

Enfin, l'étude *in silico* portant sur l'évaluation des différentes propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques a montré que l'acide rosmarinique et le composé T1 possèdent un bon profil ADMET.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ne sont que préliminaires. Il conviendrait dans l'avenir d'approfondir notre recherche en testant expérimentalement l'activité anti-nsp13.

Résumé

Résumé

À ce jour, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (sars-cov-2) a fait près de 3,9 millions de morts dans le monde selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). En l'absence de traitement approuvé contre la maladie COVID-19 causée par ce virus, ce chiffre continue d'augmenter. Une brise d'espoir souffle avec le premier vaccin approuvé, mais la pandémie continue à se propager avec de nouveaux variants émergents. Il semble qu'une autre approche, doit être engagée. Dans cet état d'esprit, nous avons concentré notre étude sur l'inhibition "*in silico*" de l'hélicase (nsp 13) ; une enzyme essentielle pour la réplication virale et cible plausible de médicaments contre le SARS-Cov-2, en raison de son haut degré de conservation.

Dans le but de repérer et d'évaluer les inhibiteurs potentiels de l'nsp13 du sars-cov-2, nous avons utilisé l'approche de docking moléculaire avec le programme *Surflex* ; elle consiste à prédire les interactions protéine-ligand. Nous avons choisi le code PDB 5RLJ comme récepteur nsp13, ce dernier a été 'docké' selon deux approches, la première basée sur des molécules naturelles, dans la seconde approche nous avons utilisé plusieurs molécules substituées du VW4, qui est le ligand de référence pour cette PDB ID. Les interactions ont été visualisées en utilisant *Biovia Discovery studio 2021*, l'affinité a été améliorée de $3,58 \text{ M}^{-1}$ (pour le ligand VW4), à $6,98 \text{ M}^{-1}$. Parmi les molécules naturelles, l'acide rosmarinique semble avoir le meilleur potentiel d'inhibition de l'nsp13. Pour les composés substitués ; T1 a donné le meilleur score d'affinité (6.58 M^{-1}).

Enfin, Une évaluation positive des propriétés pharmacologiques par le serveur ADMETLAB 2.0 nous a donné de bonnes perspectives sur ces deux composés.

Mots clefs: *In silico*, Docking Molecular, Surflex, SARS-CoV-2, Helicase nsp13

Abstract

To date Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (sars-cov-2) has killed quite 3.9 million people around the world according to World Health Organization (WHO) in the lack of approved treatment against COVID-19 disease caused by this virus, this number continues to rise. A spark of hope came with the first approved vaccine but the pandemic keeps spreading with new emerging variant. It appears that another approach investigating different targets than vaccines must be engaged. In this state of mind, we focused our study on the “*in silico*” inhibition of the *Helicase* (nsp 13); an essential enzyme for viral replication and one of the most important potential Cov’s drug targets, due to its high conservation degree.

In the purpose of spotting and evaluating potential SARS-CoV-2 Nsp13 inhibitors we used molecular docking approach with *Surflex* program; it consists of predicting and reporting the protein ligand interactions. We chose 5RLJ pdb code as nsp13 receptor and this later was docked according to two approaches, the first one was based on natural molecules, in the second approach we used several substituted molecules of VW4, which is the reference ligand for this pdb ID. Interactions were visualized using *Biovia discovery studio 2021*, the affinity was improved from 3.58 M^{-1} (for the UV4 ligand), To 6.98 M^{-1} . Among the natural molecules the rosmarinic acid appears to have the best potential act as SARS-CoV-2 Nsp13 inhibitor, for the substituted compounds T1 gave the best binding score (6.58 M^{-1}). Finally, we predict the assessment of drug ability of those compounds according to Admetlab2.0 server.

Key words: *In silico*, Molecular Docking, Surflex, SARS-CoV-2, Helicase nsp13

ملخص

حتى يومنا هذا و في غياب دواء معتمد، أدى انتشار فيروس كورونا المستجد (سارس 2) عبر العالم و المسبب لمتلازمة العسر التنفسي، في هلاك أكثر من 3.9 مليون شخص.

في هذا البحث، قمنا باستخدام طريقة الإلتحام الجزيئي بواسطة برنامج *Surflex* لتطوير مركبات جديدة تعمل على تثبيط انزيم الهليكاز nsp13 ولذلك اتخذنا منهجين:

أولا قمنا بحساب قيمة التآلف بين انزيم nsp13 و مركبات طبيعية، و ثانيا بإجراء تعديلات شكلية في هيكل المثبط المرجعي للإنزيم بهدف الحصول على مركبات ذوات نتيجة تقاربية أعلى.

سمحت نتائج هذا العمل باختيار أفضل مركبين وهما: حمض الروزمارينك بنتيجة M-1 6.98 ، و مركب T1 ب M-1 6.58 .

بعد التقييم الافتراضي للخصائص الفيزيائية، الكيميائية والصيدلانية بواسطة المتصفح ADMETLAB 2.0، اتضح لنا أن هاذين المركبين قدما نتائج إيجابية ويمكن اقتراحهما كمثبطات جديدة محتملة لإنزيم nsp 13 ومع ذلك تبقى الاختبارات التجريبية ضرورية لتثبيت هاذين المركبين كمثبطات فعلية لـ nsp13.

Annexes

Tableau 1 : Résultats RMSD de 100 complexes protéine-ligand

N°	Complexe	Ligand	RMSD	N°	Complexe	Ligand	RMSD	N°	Complexe	Ligand	RMSD
1	2BPM	529	0.519	34	5RLI	JFM	1.08	68	3V35	NTI	2.05
2	3DHD	NMN	0.804	35	5RLK	NYV	0.895	69	4CMT	GWH	0.864
3	3FRF	XCF	1.029	36	5RLL	H04	1.009	70	4CMU	IV7	1.55
4	3GHV	GHC	2.58	37	5RLM	VW7	1.77	71	4EEO	OF1	0.372
5	3M09	RAR	2.11	38	5RLN	NZG	0.531	72	4EY5	HUP	2.05
6	3NZA	D2K	2.19	39	5RLP	VWA	0.641	73	4FOB	OUS	0.798
7	3NZD	D2Q	0.535	40	5RLR	VWD	1.07	74	4FOC	OUU	1.039
8	3QTW	X3A	0.636	41	5VCP	BB2	0.567	75	4GCA	2X9	1.19
9	3RTT	KLH	1.486	42	6CQU	HI6	0.951	76	4IGS	64I	0.142
10	4FGG	OU5	1.35	43	6CQV	HI6	6.26	77	4LAU	W8X	0.99
11	4HOE	18G	1.51	44	6EKU	ZMR	0.846	78	4LB3	M15	1.03
12	4L4L	1XC	0.897	45	6EXK	RM0	1.41	79	4LB4	1WX	0.70
13	4L4M	1XD	3.747	46	6EZG	C6K	0.688	80	4LBR	409	0.936
14	4LEK	1DN	0.675	47	6EZH	C6H	1.658	81	5AAA	VGH	1.599
15	4M6Q	20T	2.83	48	1B12	1PN	1.404	82	5FTQ	U4W	0.935
16	5L3J	6G9	4	49	1S3B	RMA	4.02	83	5I38	KOJ	1.03
17	4MUU	218	0.469	50	1Z3N	3NA	1.30	84	5JZJ	AN2	1.22
18	5ISP	U06	1.07	51	2AJC	AES	0.177	85	7LTJ	YD1	1.25
19	6G0W	EGW	1.22	52	2FZD	TOL	1.50	86	7LYH	YHJ	1.35
20	7JIT	Y95	0.55	53	2PDG	47D	0.731	87	7LYI	YHI	1.23
21	7JRN	TTT	8.01	54	2RJQ	BAT	9.29	88	7LZW	YLM	1.24
22	7K40	U5G	1.01	55	2XFN	XCG	0.664	89	7LZX	YMG	1.66
23	7NNG	UJK	0.165	56	2YNB	G85	0.59	90	7NG6	ALD	0.45
24	5BOD	TTJ	1.99	57	3AOX	EMH	1.14	91	1AIM	ZYA	1.34
25	5CY7	56U	1.21	58	3B8Z	294	1.19	92	1DME	HMD	2.40
26	5CY8	56V	0.55	59	3G5E	Q74	6.96	93	1EB2	BPO	1.92
27	5FOG	VRT	0.713	60	3HY7	O97	5.60	94	1G36	R11	1.10
28	5JF1	BB2	0.739	61	3HY9	O98	6.0	95	1K1L	FD3	1.92
29	5JF6	BB4	3.08	62	3HYG	O99	0.679	96	1K1M	FD4	0.88
30	5MTE	BB2	1.10	63	3KX2	ADP	1.89	97	1Z89	62P	1.81
31	5OV9	CVI	0.334	64	3LJT	LA3	0.44	98	5RLC	VVM	1.56
32	5RLB	VVJ	1.41	65	3NQ1	KOJ	5.62	99	5RLD	VVY	1.02
33	5RLH	K2P	1.629	66	3U2C	SUZ	0.57	100	5RLS	VWG	1.07
				67	1DIF	A85	1.02				

*Références
bibliographiques*

References

- [1] A. Helali, C. Mokhtari, M. Ghoul, and M. Belhadeif, “Prévenir l’infection par le COVID-19 : Quelle place pour les plantes médicinales selon la population algérienne ? Prevent COVID-19 infection: What place for medicinal plants according to the Algerian population?,” vol. 03, no. June, p. 0, 2020.
- [2] E. Hartenian, D. Nandakumar, A. Lari, M. Ly, J. M. Tucker, and B. A. Glaunsinger, “The molecular virology of coronaviruses,” *J. Biol. Chem.*, vol. 295, no. 37, pp. 12910–12934, 2020, doi: 10.1074/jbc.REV120.013930.
- [3] A. Vabret, J. Dina, E. Brison, J. Brouard, and F. Freymuth, “Coronavirus humains (HCoV),” *Pathol. Biol.*, vol. 57, no. 2, pp. 149–160, 2009, doi: 10.1016/j.patbio.2008.02.018.
- [4] D. S. Goodsell, “SARS-CoV-2 mRNA Vaccine,” *RCSB Protein Data Bank*, Dec. 2020, doi: 10.2210/RCSB_PDB/GOODSELL-GALLERY-027.
- [5] D. A. B. R. S. Baric, “Coronavirus Genome Structure and Replication,” vol. 1, pp. 1–30, 2005.
- [6] O. Nidovirales, “Astrid Vabret - Meriadeg Ar Gouilh,” p. 2012, 2012.
- [7] P. Drouin, R. L. Hospitalier, J. P. Gillet, and M. Guittet, “Caractérisation d ’ une nouvelle souche de coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire,” pp. 323–335, 1985.
- [8] M. Baay *et al.*, “SARS-CoV-2: Virology, epidemiology, immunology and vaccine development,” *Biologicals*, vol. 66, no. June, pp. 35–40, 2020, doi: 10.1016/j.biologicals.2020.06.005.
- [9] “Ketfi Faculté,” 2020.
- [10] D. Schoeman and B. C. Fielding, “Coronavirus envelope protein : current knowledge,” vol. 0, pp. 1–22, 2019.
- [11] R. J. Rockett *et al.*, “Revealing COVID-19 transmission in Australia by SARS-CoV-2 genome sequencing and agent-based modeling,” *Nat. Med.*, vol. 26, no. September, 2020, doi: 10.1038/s41591-020-1000-7.
- [12] H. Chu *et al.*, “1,2* ,” pp. 1–25, 2020.
- [13] S. A. Lakshmi, R. Mohamed, B. Shafreen, and A. Priya, “Ethnomedicines of Indian origin for combating COVID-19 infection by hampering the viral replication : using structure-based drug discovery approach Ethnomedicines of Indian origin for combating COVID-19 infection by hampering the viral replication : using,” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1080/07391102.2020.1778537.
- [14] S. Kannan, P. S. S. Ali, A. Sheeza, and K. Hemalatha, “COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – recent trends,” vol. 19, pp. 2006–2011, 2020.
- [15] P. Bertin, K. Nera, and S. Delouvé, “Conspiracy Beliefs , Rejection of Vaccination , and Support for hydroxychloroquine : A Conceptual Replication-Extension in the COVID-19 Pandemic Context,” vol. 11, no. September, pp. 1–9, 2020, doi: 10.3389/fpsyg.2020.565128.

- [16] J. Žilinskas, A. Lančinskas, and M. R. Guarracino, “Pooled testing with replication as a mass testing strategy for the COVID - 19 pandemics,” *Sci. Rep.*, pp. 1–7, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83104-4.
- [17] A. N. Spratt *et al.*, “Coronavirus helicases: attractive and unique targets of antiviral drug-development and therapeutic patents Austin,” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1080/13543776.2021.1884224.
- [18] B. T. Sewell, J. Lourenço, L. Carlos, and J. Alcantara, “Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa,” *Nature*, vol. 592, no. October 2020, 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
- [19] D. S. Candido *et al.*, “Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil,” vol. 1260, no. September, pp. 1255–1260, 2020.
- [20] E. I. Patterson *et al.*, “Methods of Inactivation of SARS-CoV-2 for Downstream Biological Assays,” *J. Infect. Dis.*, vol. 222, no. 9, pp. 1462–1467, 2020, doi: 10.1093/infdis/jiaa507.
- [21] G. Lippi and M. Plebani, “SARS-CoV-2 antibodies titration: a reappraisal,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 8, no. 16, pp. 1032–1032, 2020, doi: 10.21037/atm-20-5361.
- [22] Z. Zhao *et al.*, “New insights from chemical biology: Molecular basis of transmission, diagnosis, and therapy of SARS-CoV-2,” *CCS Chem.*, vol. 3, no. 1, pp. 1501–1528, 2021, doi: 10.31635/ccschem.020.202000322.
- [23] P. Sestili and C. Fimognari, “Paracetamol-Induced Glutathione Consumption: Is There a Link With Severe COVID-19 Illness?,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, no. October, pp. 1–7, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.579944.
- [24] L. E. Rothuizen, F. Livio, and T. Buclin, “Traitements aggravant une infection par le COVID-19 : vraiment ?,” *Rev. Med. Suisse*, vol. 16, no. N 6912, pp. 852–854, 2020.
- [25] S. Susen *et al.*, “TRAITEMENT ANTICOAGULANT POUR LA PREVENTION DU RISQUE THROMBOTIQUE CHEZ UN PATIENT HOSPITALISE AVEC COVID-19 ET SURVEILLANCE DE L’HEMOSTASE PROPOSITIONS DU GIHP ET DU GFHT Version courte (3 avril 2020),” pp. 1–5, 2020.
- [26] L. Chiscano-Camón, J. C. Ruiz-Rodriguez, A. Ruiz-Sanmartin, O. Roca, and R. Ferrer, “Vitamin C levels in patients with SARS-CoV-2-associated acute respiratory distress syndrome,” *Crit. Care*, vol. 24, no. 1, pp. 20–22, 2020, doi: 10.1186/s13054-020-03249-y.
- [27] R. M. L. Colunga Biancatelli, M. Berrill, J. D. Catravas, and P. E. Marik, “Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19),” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. June, pp. 1–11, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01451.
- [28] K. A. Pastick *et al.*, “Review: Hydroxychloroquine and chloroquine for treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19),” *Open Forum Infect. Dis.*, vol. 7, no. 4, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1093/ofid/ofaa130.
- [29] P. Maisonnasse *et al.*, “Hydroxychloroquine use against SARS-CoV-2 infection in non-human primates,” *Nature*, vol. 585, no. 7826, pp. 584–587, 2020, doi:

- 10.1038/s41586-020-2558-4.
- [30] “Vaccins contre la COVID-19.” <https://www.who.int/fr/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-vaccines> (accessed Jul. 18, 2021).
- [31] C. Menni, C. H. Sudre, C. J. Steves, S. Ourselin, and T. D. Spector, “Quantifying additional COVID-19 symptoms will save lives,” 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0916-2.
- [32] Cecile Toussaint, “Les hélicases,” *Médecine/Science*, vol. 11, no. 10, pp. 1389–1398, 1995.
- [33] A. N. Spratt, F. Gallazzi, T. P. Quinn, C. L. Lorson, A. Sönnnerborg, and K. Singh, “Coronavirus helicases: attractive and unique targets of antiviral drug-development and therapeutic patents,” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 31, no. 4, pp. 339–350, 2021, doi: 10.1080/13543776.2021.1884224.
- [34] S. Habtemariam, F. Nabavi, M. Banach, and I. Berindan-neagoe, “Should We Try SARS-CoV-2 Helicase Inhibitors for COVID-19 Therapy?,” *Arch. Med. Res.*, pp. 10–12, 2020, doi: 10.1016/j.arcmed.2020.05.024.
- [35] K. J. Mickolajczyk *et al.*, “Force-dependent stimulation of RNA unwinding by SARS-CoV-2 nsp13 helicase,” 2021, doi: 10.1016/j.bpj.2020.11.2276.
- [36] J. Chen *et al.*, “Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex,” *Cell*, vol. 182, no. 6, pp. 1560-1573.e13, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.07.033.
- [37] S. S. Patel and I. Donmez, “Mechanisms of helicases,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 27, pp. 18265–18268, 2006, doi: 10.1074/jbc.R600008200.
- [38] J. A. Newman *et al.*, “Structure, Mechanism and Crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase,” *bioRxiv*, no. 6, p. 2021.03.15.435326, 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1101/2021.03.15.435326>.
- [39] “DNA Gyaan » SARS-CoV-2- Why is it different this time? ».” <https://www.dnagyaan.com/sars-cov-2-why-is-it-different-this-time/> (accessed Jul. 17, 2021).
- [40] S. Habtemariam *et al.*, “Should We Try SARS-CoV-2 Helicase Inhibitors for COVID-19 Therapy?,” *Arch. Med. Res.*, vol. 51, no. 7, pp. 733–735, 2020, doi: 10.1016/j.arcmed.2020.05.024.
- [41] M. R. Freidel and R. S. Armen, “Mapping major SARS-CoV-2 drug targets and assessment of druggability using computational fragment screening: Identification of an allosteric small-molecule binding site on the Nsp13 helicase,” *PLoS One*, vol. 16, no. 2 February, Feb. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0246181.
- [42] J. Chen *et al.*, “Article Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex II Article Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex,” *Cell*, vol. 182, no. 6, pp. 1560-1573.e13, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.07.033.

- [43] K.-J. Jang, S. Jeong, D. Y. Kang, N. Sp, Y. M. Yang, and D.-E. Kim, "A high Atp concentration enhances the cooperative translocation of the SARS coronavirus helicase nsP13 in the unwinding of duplex RnA," doi: 10.1038/s41598-020-61432-1.
- [44] I. Briguglio, S. Piras, P. Corona, and A. Carta, "Inhibition of RNA Helicases of ssRNA + Virus Belonging to Flaviviridae , Coronaviridae and Picornaviridae Families," vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/213135.
- [45] A. B. Gurung, "Gene Reports In silico structure modelling of SARS-CoV-2 Nsp13 helicase and Nsp14 and repurposing of FDA approved antiviral drugs as dual inhibitors," *Gene Reports*, vol. 21, no. June, p. 100860, 2020, doi: 10.1016/j.genrep.2020.100860.
- [46] M. S. Yu *et al.*, "Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsP13," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 12, pp. 4049–4054, 2012, doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.081.
- [47] B. Palsson, "The challenges of in silico biology," *Nat. Biotechnol. 2000 1811*, vol. 18, no. 11, pp. 1147–1150, 2000, doi: 10.1038/81125.
- [48] G. Heberle and W. F. de Azevedo, "Bio-Inspired Algorithms Applied to Molecular Docking Simulations," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 9, pp. 1339–1352, Mar. 2011, doi: 10.2174/092986711795029573.
- [49] E. MOKRANI, "Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique.," Université Mentouri Constantine, 2012.
- [50] M. Mangoni, D. Roccatano, and A. Di Nola, "Docking of flexible ligands to flexible receptors in solution by molecular dynamics simulation," *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 35, no. 2, pp. 153–162, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19990501)35:2<153::AID-PROT2>3.0.CO;2-E.
- [51] S. Ahmad, Y. Waheed, S. Ismail, S. Bhatti, S. W. Abbasi, and K. Muhammad, "Structure-based virtual screening identifies multiple stable binding sites at the RecA domains of SARS-CoV-2 helicase enzyme," *Molecules*, vol. 26, no. 5, 2021, doi: 10.3390/molecules26051446.
- [52] F. Gaudreault, L. P. Morency, and R. J. Najmanovich, "NRGsuite: A PyMOL plugin to perform docking simulations in real time using FlexAID," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 23, pp. 3856–3858, 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btv458.
- [53] A. CHIKHI, "Calculs et modelisations des interactions peptide deformylase – substances antibacteriennes a l'aide de techniques de docking" (arrimage) moleculaire," pp. 1–126, 2007.
- [54] D. Rognan, "Criblage virtuel par docking moléculaire," no. 1, pp. 3–13, 2004.
- [55] R. Algerienne and D. Et, "M inistère de l ' E nseignement S upérieur et de la R echerche S cientifique Université 8 mai 1945 Guelma Mémoire de fin d ' études Master Etude par Docking Moléculaire de l ' activité inhibitrice des F uranocoumarines C ontenues dans le J us de P amplemo," 2020.
- [56] J. Chen *et al.*, "Potential mechanisms of Guizhi decoction against hypertension based

- on network pharmacology and Dahl salt-sensitive rat model,” *Chin. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–19, 2021, doi: 10.1186/s13020-021-00446-x.
- [57] Z. Wang *et al.*, “Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 18, pp. 12964–12975, 2016, doi: 10.1039/c6cp01555g.
- [58] K. Onodera, K. Satou, and H. Hirota, “Evaluations of molecular docking programs for virtual screening,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 47, no. 4, pp. 1609–1618, 2007, doi: 10.1021/ci7000378.
- [59] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui, “Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery,” *Curr. Comput. Aided-Drug Des.*, vol. 7, no. 2, pp. 146–157, 2012, doi: 10.2174/157340911795677602.
- [60] A. N. Jain, “Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search,” *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 21, no. 5, pp. 281–306, 2007, doi: 10.1007/s10822-007-9114-2.
- [61] S. Maroua, “Remerciements.”
- [62] Y. Hou, Y. Guo, C. Wu, N. Shen, Y. Jiang, and J. Wang, “Prediction and identification of T cell epitopes in the H5N1 influenza virus nucleoprotein in chicken,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039344.
- [63] J. Fan, A. Fu, and L. Zhang, “Progress in molecular docking,” *Quant. Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 83–89, 2019, doi: 10.1007/s40484-019-0172-y.
- [64] I. De, A. N. Der, A. E. T. Liaison, and O. E. T. L. De, “F ORCES ET LIAISONS DE VAN DER WAALS A) Généralités B) Interactions de Van der Waals C) Aspect énergétique D) Conséquences de l ’ existence des interactions de Van der Waals,” pp. 1–6, 2019.
- [65] A. Tkatchenko, L. Romaner, O. T. Hofmann, E. Zojer, C. Ambrosch-Draxl, and M. Scheffler, “Van der waals interactions between organic adsorbates and at organic/inorganic interfaces,” *MRS Bull.*, vol. 35, no. 6, pp. 435–442, 2010, doi: 10.1557/mrs2010.581.
- [66] Y. Zhou, T. Parisini, and M. M. Polycarpou, “Detection of Drift Sensor Faults in a Class of Nonlinear Uncertain Systems,” no. Cdc, pp. 3169–3174, 2015.
- [67] S. K. Burley *et al.*, “Protein Data Bank: The single global archive for 3D macromolecular structure data,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. D1, pp. D520–D528, 2019, doi: 10.1093/nar/gky949.
- [68] “GitHub - mimminou/PDBASER: A fast Protein Chain / Ligand Extractor and organizer.” <https://github.com/mimminou/PDBASER?fbclid=IwAR0TAK-5i9BAzTc5qSNPoszqgjkVpGToGamBGOD9STqeWAuG7GGZwLk4qyY> (accessed Jul. 01, 2021).
- [69] N. M. O’Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, and G. R. Hutchison, “Open Babel: An open chemical toolbox - 1758-2946-3-33.pdf,” *J. Cheminform.*, vol. 3, no. 33, pp. 1–14, 2011, [Online]. Available:

<http://www.jcheminf.com/content/3/1/33><http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1758-2946-3-33.pdf>.

- [70] S. Sharma, A. Sharma, and U. Gupta, "Molecular Docking Studies on the Anti-Fungal Activity of *Allium Sativum* (Garlic) Against Mucormycosis (Black Fungus) by BIOVIA Discovery Studio Visualizer 21.1.0.0," pp. 1–9, 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-888192/v1>.
- [71] D.-S. C. Jie Dong, Ning-Ning Wang, Zhi-Jiang Yao, Lin Zhang, Yan Cheng, Defang Ouyang, Ai-Ping Lu, "ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database.," *J. Cheminform.*, 2018.
- [72] B. A. Reva, A. V. Finkelstein, and J. Skolnick, "What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å?," *Fold. Des.*, vol. 3, no. 2, pp. 141–147, 1998, doi: 10.1016/S1359-0278(98)00019-4.
- [73] A. Chikhi and A. Bensegueni, "Comparative Study of the Efficiency of Three Protein-Ligand Docking Programs Journal of Proteomics & Bioinformatics - Open Access," vol. 1, no. June, pp. 161–165, 2008, doi: 10.4172/jpb.1000022.

Identification of potential SARS-CoV-2 nsp13 inhibitors: a molecular docking approach

Laboratory of Applied Biochemistry Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology Faculty of Natural and Life Science University Mentouri Brothers Constantine.1
Algeria

Abstract

To date Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has killed quite 3.9 million people around the world according to World Health Organization (WHO) in the lack of approved treatment against COVID-19 disease caused by this virus, this number continues to rise. A spark of hope came with the first approved vaccine but the pandemic keeps spreading with a more virulent, new emerging variant. It appears that another approach investigating different targets than vaccines must be engaged. In this state of mind, we focused our study on the “*in silico*” inhibition of the *Helicase* (nsp 13); an essential enzyme for viral replication and one of the most important potential Cov’s drug targets, due to its high conservation degree.

In the purpose of spotting and evaluating potential SARS-CoV-2 nsp13 inhibitors we used molecular docking approach with *Surflex* program; it consists of predicting and reporting the protein ligand interactions. We chose 5RLJ PDB code as nsp13 receptor and this later was docked according to two approaches, the first one was based on natural molecules, which have structural similarities with VW4; the reference ligand for this PDB ID. in the second approach we used several substituted molecules of VW4. Interactions were visualized using *Biovia discovery studio* 2021, the affinity was improved from 3.58 M^{-1} (for the VW4 ligand), To 6.98 M^{-1} . Among the natural molecules the rosmarinic acid appears to have the best potential act as SARS-CoV-2 nsp13 inhibitor, for the substituted compounds T1 gave the best binding score. Finally, we predict the assessment of drug ability of those compounds according to Admetlab2.0 server.

Key words: *In silico*, Molecular docking, Surflex, SARS-CoV-2, Helicase nsp13.

1. INTRODUCTION

Coronaviruses (CoVs) are a group of genetically related viruses that cause disease in mammals and birds. In humans, they cause severe acute respiratory syndrome (SARS) [1]; SARS-CoV was known for the first time in 2003 in China, a decade later (September 2012) a similar CoV emerged in the middle east (MERS-CoV) and has a higher case-fatality rate than the SARS-CoV [2], the outbreak of the novel coronavirus known as SARS-CoV-2 in 2019 caused dramatic consequences in human lives over its pandemic potential [3].

CoVs are enveloped viruses with a positive sense RNA genome, they belong to the Nidovirales order, Coronaviridae family, and the subfamily of β Coronavirinae. They have one of the largest known RNA genomes (~29.7 kb) among RNA viruses [4].

Coronavirus infection starts with the receptor binding to the S protein and entering by

membrane fusion, after uncoating, the genome RNA is used as a template to synthesize two large polyproteins PP1a and PP1ab. After being proteolytically processed, 16 non-structural proteins (*Nsps*) are produced including primase (Nsp8), RNA-dependent RNA polymerase (Nsp12) and helicase (Nsp13). These three enzymes and other Nsps are components of a Replication and Transcription Complex (RTC) which is essential for the life cycle of SARS-CoV[4].

The helicases are ubiquitous nucleic acid unwinding enzymes. They transform the chemical energy of nucleotide triphosphate hydrolysis (NTPase) to mechanical energy that translocates through nucleic acids, unwinding the helical structure as it progresses [5][6], due to this crucial role during genome replication, repair and recombination; defects in helicase function can lead to stop SARS-CoV proliferation.



Fig 2. cartoon representation of the x-ray structure of sars-cov-2 nsp13 in complex with the pdb ligand UV4 (pdb code 5RLJ).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

2.1.1. Software

Surflex-Dock v 2.706.13294 2013 Surflex is a fully automatic flexible molecular docking algorithm based on an idealized active site ligand (a protomol) .[7]

Protein Data Bank: The PDB is the single global archive of experimentally determined three-dimensional (3D)

structure data of biological macromolecules[8]. The data, obtained by Xray crystallography or NMR spectroscopy and submitted by scientists from all around the world, is free access.

Pdbaser v 1.6 is an open-source program designed to provide a fast way to separate ligands and chains from proteins while keeping their spatial coordinates unchanged for molecules extraction.[9]

Open Babel v 3.1.1 It is free and open-source software chemical expert

Chem3D v 19.1 Is a software program used by chemists and biologists worldwide

Discovery Studio 2021 *The Biovia Discovery Studio Visualizer* is a free, feature-rich molecular modelling application for viewing, sharing and analysing protein and small molecule[11].

ADMETlab 2.0 is a free web server that calculates physicochemical and predict pharmacokinetic and toxicity parameters of molecules selected by molecular docking [12].

2.2 Methods

2.2.1 Assessment of Docking Quality “RMSD”

The ability of predicting correct ligand poses was validated using the *RMSD test (Root mean square deviation)* which corresponds to the average of the deviation between the ligand placement calculated by the software and the original one downloaded from the Pdb ; in other words *RMSD* means the difference between predicted and observed conformation .The smaller the *RMSD* is between two structures, the more similar they are [13]. So, we downloaded randomly 100 complex crystal structures from the pdb and their rmsd was calculated.

system mainly used to interconvert chemical file formats [10]

to draw molecular structures and saving them in several formats.

2.2.2 Preparation of the receptor

In this study we selected helicase “nsp13” as target; its 3D structure has been downloaded from the PDB under the code 5RLJ (Fig 1). The choice of this particular ID was dictated by its high resolution (1.88 Å); this code represents the ‘3D crystal structure of SARS-CoV-2 helicase in complex with a co-crystallized inhibitor that has the code VW4.’

5RLJ is a homodimer enzyme composed of 601 amino acids with two identical chains (A, B), using *Pdbaser* program we had removed its chain A, water and different ligands in order to keep only one chain with its free active site for an easy use of molecular docking. Atoms of hydrogen were added to the chain B using *Open Babel* program, thereby the prepared enzyme was exported in a *mol2* file format.

2.2.3 Preparation of ligands

To prepare several types of ligands we proceeded according to two approaches; natural products and substitution molecules.

2.2.3.1 Natural products

Aromatherapy has experienced a revival since the end of the 20th century. Used for thousands of years; plants offer, through their many therapeutic properties, a serious alternative to patients increasingly turning to natural medicine. It's in this sense that we have selected eight molecules from plants widely used in Algeria during this pandemic[14], such as Oregano, thyme, Basil, Clove, Ginger..., their most common compounds (caffeic ac, curcumene ac, coumaric ac, gallic ac, menthol, ferulic ac, rosmarinic ac and sinapic ac) were drawn and exported in *mol2* format using *Chem3D* software; and docked with 5rlj.

2.2.3.2 Substitution approach

We used the 3D structure of VW4 inhibitor for both active site determination and as substitution ligands scaffold.

2.2.4 The protomol generation

The Surflex program generates its own theoretical active-site, it is called a "protomol".

2.2.5 The molecular docking

Studying molecular recognition using computational tools aims to predict the binding mode of complex protein-ligand. Therefore, we docked the compounds resulting of earlier substitution protocol by *Surflex* program which allows having the best twenty (20) positions of

each ligand in the studied active site, classified by their affinity score.

2.2.6 Designing of new substitutes molecules of VW4

In order to identify novel and more efficient nsp13 inhibitor, we modified the structure of VW4 using *Chem3D* program in this context, several types of substitutions were carried out. (mono, di, tri and quadric substitution) The geometry of the resulting compounds was optimized by minimizing energy and finally they were exported in *mol2* format. (Fig 2)

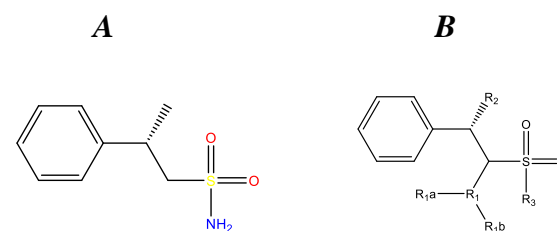


Fig 2: A: Chemical structure of **VW4**

B: position of R substitutions

3.RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 Surflex reliability testing

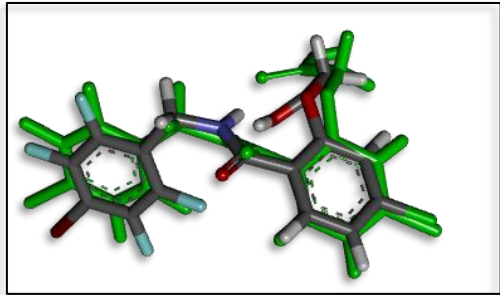
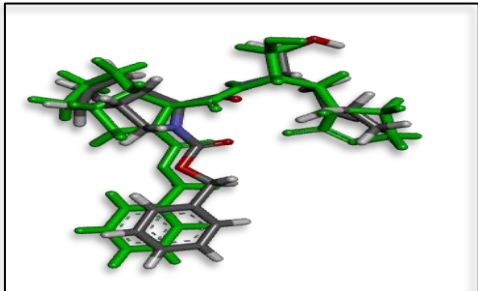
According to the results obtained by Chikhi and Bensegueni [15],The *RMSD* results allowed us to note that the *Surflex* software shows a performance to reproduce the experimental poses, indeed; 81% of the *RMSD* values are less than 2 Å.

3.2 Visual Analysis

It is an essential step to confirm the results of *RMSD*. In this context, we have visualized two complexes in order to ensure

the performance of *Surflex*. the complexes 4LB4 and 7LYH. As shown in Figure 2, low obtained *RMSD* values result in a superposition between the models of the simulated ligands by *Surflex* (Tab 1).

Tab 1: Visual analysis of RMSD: Superposition of the crystal conformation of the ligands with the best predicted poses (green colour).

PDB code	Ligand code	RMSD (Å)	Superposition
4LB4	1WX	0,70	
7LYH	YHJ	1.35	

3.3 Interaction's study

The residues GLY 285, THR286, GLY 287, LYS 288, SER 289, HIS 290,

PHE 291, LYS320 and ARG 442 were found to be present in the binding pocket of the nsp13 enzyme. (Fig 3)

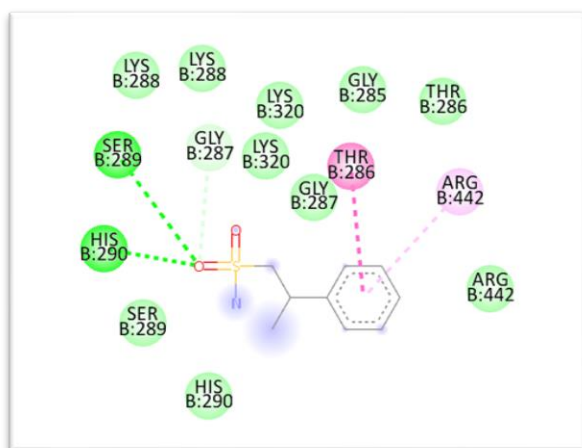


Fig 3: Surface representation of VW4 and most relevant binding residues.

3.3.1 Nsp13/VW4 interactions

First, we studied the way these two molecules react between them, as shown in Fig 4 and table 2 it's appeared that VW4 is stabilized in the active site by establishing essentially four hydrogen bonds with its amino acids' residues (SER 269, HIS 290, LYS 320 and GLY 287) and secondary by forming three hydrophobic bonds (ARG 442 (alkyl and Pi-alkyl) and ARG 443 (Pi-alkyl)).

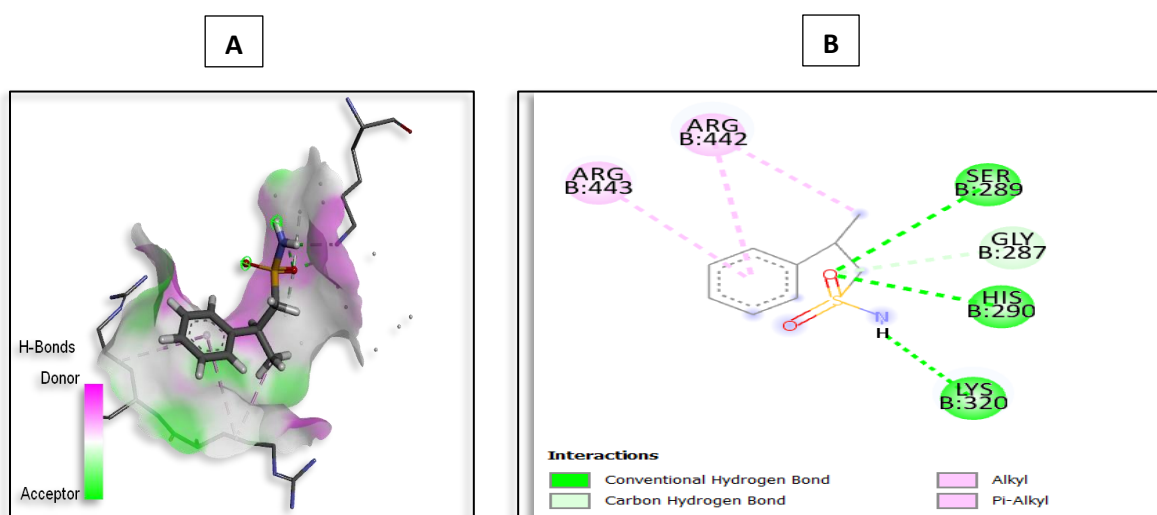


Fig 4: (A) illustration of the active site surface hydrogen bonds predicted between the nsp13 and its pdb ligand; VW4, (B) hydrogen bond (green dotted lines represents) and hydrophobic interaction (pi-alkyl is shown in purple colour dotted lines).

The table below illustrates links types and distances of nsp13-VW4 complex

Tab 2: types and distances of interactions between nsp13 and VW4

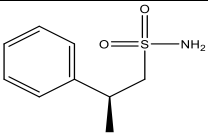
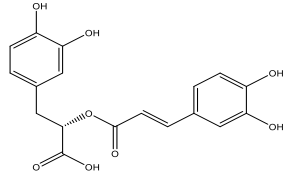
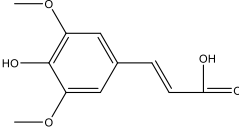
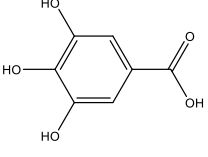
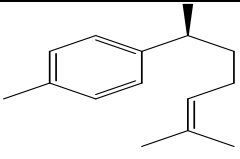
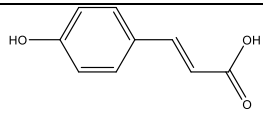
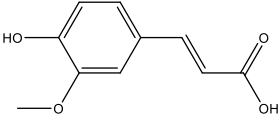
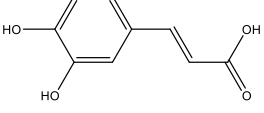
<i>Interactions</i>	<i>Involved aa</i>	<i>H Donor</i>	<i>H acceptor</i>	<i>Distance(A°)</i>
Hydrogen	SER 289	Ser: HN	Ligand: O2	2.77
//	HIS 290	His: HN	Ligand: O2	1.97
//	LYS 320	Ligand: H	Lys: NZ	2.14
Carbon hydrogen	GLY 287	GLY: HA1	Ligand: O2	2.27
Hydrophobic Alkyl	ARG 442	Ligand:C1 alkyl	ARG alkyl	4.17
Hydrophobic PI-alkyl	ARG 442	Ligand: Pi-orbital	ARG alkyl	4.92
//	ARG 443	//	//	4.65

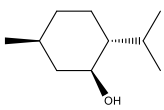
3.3.2 Nsp13/natural compounds interactions

As displayed in table 3 the Rosmarinic acid has shown the highest binding score, this is due to the establishing of new links including six hydrogen bonds

with the active site residues like it is mentioned in figure 5. The table 4 illustrates the amino acids involved in every interaction and its distance.

Tab 3: chemical structure and scores of the natural compounds docked by Surflex.

<i>Compound</i>	<i>Score</i> <i>M-1</i>	<i>2D Structure</i>
VW4	3.58	
Rosmarinic Acid	6.98	
Sinapic acid	4.69	
Gallic-acid	4.44	
α curcumene acid	3.95	
Coumaric-acid	3.70	
Ferulic acid	3.61	
Caffeic acid	3.00	

Menthol	2.63	
---------	------	--

The improvement of the predicted binding score is due to the establishing of new links including six hydrogen bonds with the active site residues like it is mentioned in figure 5.

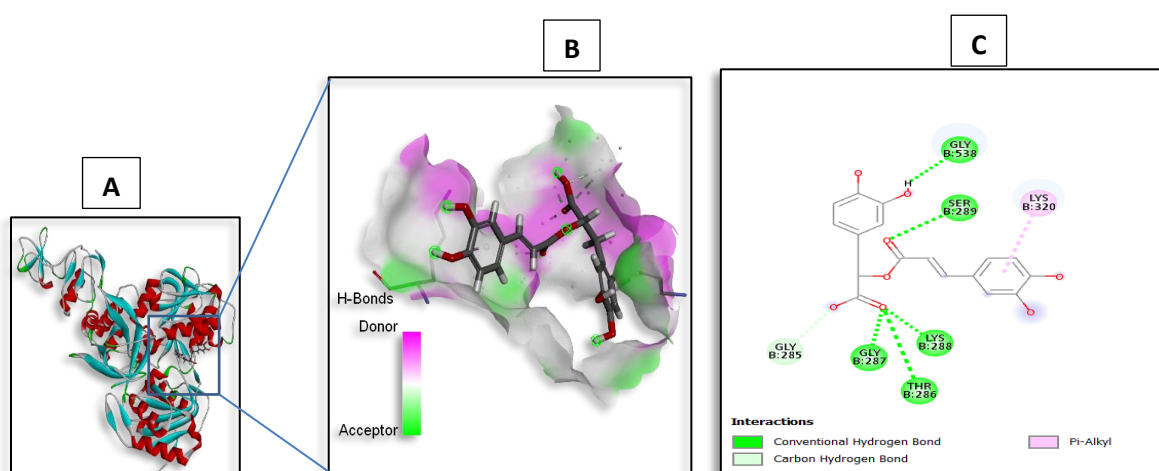


Fig 5: (A) Rosmarinic acid (stick model) interactions with 5RLJ; (B) active site surface of the H bonds of the interaction; (C) hydrogen bond (green dotted lines represents) and hydrophobic interaction (pi-alkyl is shown in purple colour dotted lines).

The table 4 illustrates the amino acid involved in every interaction, its type and its distance.

Tab 4: types and distances of interactions between nsp13 and rosmarinic acid

<i>Interactions</i>	<i>Involved aa</i>	<i>H Donor</i>	<i>H acceptor</i>	<i>Distance(A°)</i>
Hydrogen	THR 286	THR: HN	: O	3.02
//	GLY 287	GLY: HN	: O	1.83
//	LYS 288	LYS: HN	: O	1.98
//	SER 289	SER: HG	: O	2.11

	//	SER: HN	: O	1.92
//	GLY 538	: H	GLY: O	1.88
carbon hydrogen	GLY 285	: HA2	: O	2.18
Hydrophobic	LYS 320	: Pi-orbital	LYS: alkyl	3.56
PI-alkyl				

3.3.3 Nsp13/substituted compounds interactions

As said in preparation of ligands, we used VW4 as scaffold for new molecules substitution; sixteen molecules were prepared and docked, the most promising molecules present remarkable improvement in predicted binding score.

It should be noted that the improvement is due to the setting up of new links and interactions because of the structural modifications performed.

The compound T1 was the most promising potent inhibitor among the substituted ligands; Its binding score was improved from 3.58 (for the vw4 ligand) to 6.85 M^{-1} (Table 5).

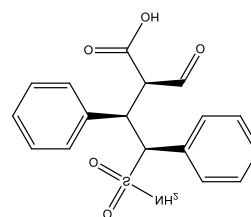


Fig 6: chemical structure of T1 compound

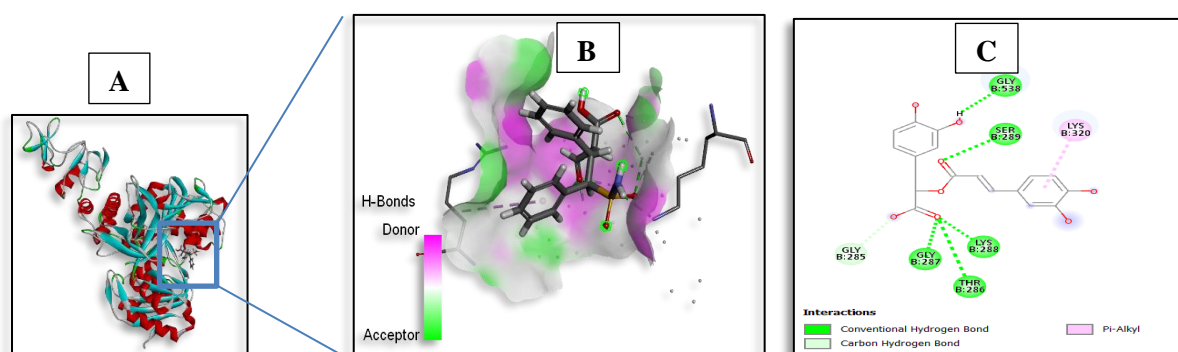


Fig 7: (A) T1 compound (stick model) interactions with 5RLJ. (B) active site surface of the H bonds of the interaction; (C) hydrogen bond (green dotted lines represents) and hydrophobic interaction (pi-alkyl is shown in purple colour dotted lines).

Tab 5: Types and distances of interactions between nsp13 and T1 compound

<i>Interactions</i>	<i>Involved aa</i>	<i>H Donor</i>	<i>H acceptor</i>	<i>Distance(A°)</i>
Hydrogen	THR 286	THR: HN	: O	2.65
//	GLY 287	GLY: HN	: O	1.94
//	LYS 288	LYS: HN	: O	2.12
//	SER 289	SER: HG	: O	2.82
//	HIS 290	HIS: HN	: O	1.75
//	LYS 320	: H	LYS: NZ	2.19

4. ADME study

Using ADMETlab 2.0 server, we calculated the physicochemical property and predicted the pharmacokinetic parameters of the most promising hits (Rosmarinic acid and T1 compound). That helps us to check their ability of being suitable for use as medicinal products. The same parameters were also studied for VW4

for comparison. The results showed that both compounds successfully passed ADME tests (Tab 6,7), in fact the three compounds comply perfectly with Lipinski rule, which indicates that compounds that do not match at least three of the five criteria are likely to cause oral administration difficulties. This allows us to conclude that our molecules have a good oral bioavailability.

TAB 6: Physicochemical property

Properties	VW4	Rosmarinic acid	T 1	Comment
Molecular Weight (g/mol)	199.07	360.08	347.08	Optimal 100-600

nHA	3	8	6	Number of hydrogen bond acceptors.
nHD	2	5	3	Number of hydrogen bond donors.
nRot	3	7	7	Number of rotatable bonds
Log P	1.14	1.77	1.28	Log of the octanol/water partition coefficient
SA score	2.406	2.903	3.521	<ul style="list-style-type: none"> ■ Synthetic accessibility score is designed to estimate ease of synthesis of drug-like molecules. ■ SAscore ≥ 6, difficult to synthesize; SAscore

TAB 7: medicinal chemistry

Properties	VW4	Rosmarinic acid	T 1	Comment
Lipinski Rule	Accepted	Accepted	Accepted	<ul style="list-style-type: none"> ■ $MW \leq 500$; $\log P \leq 5$; $Hacc \leq 10$; $Hdon \leq 5$ ■ If two properties are out of range, a poor absorption or permeability is possible, one is acceptable
CYP inhibitor	NONE	none	None	CYP1A2 CYP2C19 CYP2D6 CYP3A4

The finding results suggest that our compounds have a favourable effect on the Cyp isoforms.

5. Toxicity study

we evaluated the potential

toxicity of the three compounds (VW4, rosmarinic acid and T1 compound). As displayed in table 06, the reference

ligand (VW4) presents carcinogenic risk. The two other compounds show no risk.

TAB 8: Toxicity

Properties	VW4	Rosmarinic acid	T 1
Respiratory Toxicity	No risk	No risk	No risk
Carcinogenicity	++	No risk	No risk

The obtained results showed that both compounds have successfully passed ADME/Toxicity tests.

6. CONCLUSION

In this study, we used Surflex program for molecular docking approach to predict the affinity and interaction modes of both natural and substituted molecules. First, the docking protocol was validated by

applying the RMSD test and the visuals analysis. This approach allowed us to suggest Rosmarinic acid and T1 compound as potential new inhibitors of sars-cov-2 nsp 13 binding site. These proposed compounds were predicted to have good ADME.

REFERENCES

- [1] T. Burki, "The origin of SARS-CoV-2," *Lancet. Infect. Dis.*, vol. 20, no. 9, pp. 1018–1019, 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30641-1.
- [2] J. A. Al-Tawfiq, "Asymptomatic coronavirus infection: MERS-CoV and SARS-CoV-2 (COVID-19)," *Travel Med. Infect. Dis.*, vol. 35, no. February, p. 101608, 2020, doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101608.

- [3] C. Wu *et al.*, “Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 10, no. 5, pp. 766–788, 2020, doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008.
- [4] Z. Jia *et al.*, “Delicate structural coordination of the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 12, pp. 6538–6550, 2019, doi: 10.1093/nar/gkz409.
- [5] J. Chen *et al.*, “Article Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex II Article Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex,” *Cell*, vol. 182, no. 6, pp. 1560-1573.e13, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.07.033.
- [6] A. N. Spratt *et al.*, “Coronavirus helicases: attractive and unique targets of antiviral drug-development and therapeutic patents Austin,” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1080/13543776.2021.1884224.
- [7] A. N. Jain, “Surflex: Fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine,” *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 4, pp. 499–511, 2003, doi: 10.1021/jm020406h.
- [8] S. K. Burley *et al.*, “Protein Data Bank: The single global archive for 3D macromolecular structure data,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. D1, pp. D520–D528, 2019, doi: 10.1093/nar/gky949.
- [9] “GitHub - mimminou/PDBASER: A fast Protein Chain / Ligand Extractor and organizer.” <https://github.com/mimminou/PDBASER?fbclid=IwAR0TAK-5i9BAzTc5qSNPoszqgjkVpGToGamBG0d9STqeWAuG7GGZwLk4qyY> (accessed Jul. 01, 2021).
- [10] N. M. O’Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, and G. R. Hutchison, “Open Babel: An open chemical toolbox - 1758-2946-3-33.pdf,” *J. Cheminform.*, vol. 3, no. 33, pp. 1–14, 2011, [Online]. Available: <http://www.jcheminf.com/content/3/1/33%0Ahttp://www.biomedcentral.com/content/pdf/1758-2946-3-33.pdf>.
- [11] S. Sharma, A. Sharma, and U. Gupta, “Molecular Docking Studies on the Anti-Fungal

Activity of *Allium Sativum* (Garlic) Against Mucormycosis (Black Fungus) by BIOVIA Discovery Studio Visualizer 21.1.0.0,” pp. 1–9, 2021, [Online]. Available: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-888192/v1>.

- [12] D.-S. C. Jie Dong, Ning-Ning Wang, Zhi-Jiang Yao, Lin Zhang, Yan Cheng, Defang Ouyang, Ai-Ping Lu, “ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database.,” *J. Cheminform.*, 2018.
- [13] B. A. Reva, A. V. Finkelstein, and J. Skolnick, “What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å?,” *Fold. Des.*, vol. 3, no. 2, pp. 141–147, 1998, doi: 10.1016/S1359-0278(98)00019-4.
- [14] A. Helali, C. Mokhtari, M. Ghoul, and M. Belhadef, “Prévenir l’infection par le COVID-19 : Quelle place pour les plantes médicinales selon la population algérienne ? Prevent COVID-19 infection: What place for medicinal plants according to the Algerian population?,” vol. 03, no. June, p. 0, 2020.
- [15] A. Chikhi and A. Bensegueni, “Comparative Study of the Efficiency of Three Protein-Ligand Docking Programs Journal of Proteomics & Bioinformatics - Open Access,” vol. 1, no. June, pp. 161–165, 2008, doi: 10.4172/jpb.1000022.

**Présenté par : BOUKRIA SIHEM
BESSA CHAFIKA**

Thème : Identification de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'hélicase NSP 13 du SARS-CoV-2 : Etude in silico

Mémoire de fin de cycle présenté en vue de l'obtention du diplôme de master en biochimie appliquée

Résumé :

À ce jour, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (sars-cov-2) a fait près de 3,9 millions de morts dans le monde selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). En l'absence de traitement approuvé contre la maladie COVID-19 causée par ce virus, ce chiffre continue d'augmenter. Une brise d'espoir souffle avec le premier vaccin approuvé, mais la pandémie continue à se propager avec de nouveaux variants émergents. Il semble qu'une autre approche, doit être engagée. Dans cet état d'esprit, nous avons concentré notre étude sur l'inhibition "*in silico*" de l'hélicase (nsp 13) ; une enzyme essentielle pour la réplication virale et cible plausible de médicaments contre le SARS-Cov-2, en raison de son haut degré de conservation.

Dans le but de repérer et d'évaluer les inhibiteurs potentiels de l'nsp13 du sars-cov-2, nous avons utilisé l'approche de docking moléculaire avec le programme *Surflex* ; elle consiste à prédire et à signaler les interactions protéine-ligand. Nous avons choisi le code PDB 5RLJ comme récepteur nsp13, ce dernier a été docké selon deux approches, la première était basée sur des molécules naturelles, dans la seconde approche nous avons utilisé plusieurs molécules substituées du VW4, qui est le ligand de référence pour cette PDB ID. Les interactions ont été visualisées en utilisant *Biovia Discovery studio 2021*, l'affinité a été améliorée de $3,58 \text{ M}^{-1}$ (pour le ligand VW4), à $6,98 \text{ M}^{-1}$. Parmi les molécules naturelles, l'acide rosmarinique semble avoir le meilleur potentiel d'inhibition de l'nsp13. Pour les composés substitués ; T1 a donné le meilleur score d'affinité (6.58 M^{-1}).

Enfin, Une évaluation positive des propriétés pharmacologiques par le serveur ADMETLAB 2.0 nous a donné de bonnes perspectives sur ces deux composés.

Key words: *In silico*, Docking Moléculaire, Surflex, SARS-CoV-2, Helicase nsp13

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr	MOKRANI E.H.	M.C.B UFM Constantine-1
Rapporteur :	Mme TENIOU. S	M.A.A UFM Constantine-1
Examineur :	Mme DEMMAK. R.G.	M.C.B USB Constantine- 3

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biochimie appliquée

Date de soutenance : 08 septembre 2021

