



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des 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 :

**Recherche par docking moléculaire de nouveaux inhibiteurs de
la protéase de type papaine (PLpro) du SARS-CoV-2**

Présenté et soutenu par :

Le : 13/07/2021

- BRIKA Aya.
- CHARA Chaima.

Jury d'évaluation :

- **Président du jury :** Mr. BENSEGUENI A. (Professeur à UFM Constantine 1).
- **Rapporteur :** Mr. CHIKHI A. (Professeur à UFM Constantine 1).
- **Examineur :** Mr. MOKRANI E.H. (Maitre de conférences B à UFM Constantine 1).

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

الحمد لله

« لئن شكرتم لأزيدنكم »

Avant tout, nous remercions Allah qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail.

Après un long parcours notre mémoire touche à sa fin. Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail.

*Nous tenons à remercier notre encadreur **Mr. CHIKHI A.** Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour son aide précieuse, pour sa disponibilité pour tout le temps qu'il nous a consacré à nous former, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi de ce travail.*

*Nos profonds remerciements à **Mr. BENSEGUENI A.** Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. Pour l'honneur de présider le jury de soutenance.*

*Nos profonds remerciements également à **Mr. MOKRANI E.H.** Maître de conférences B à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1*

*Nos vifs remerciements aussi à **Mr. BOUDERSA Y.** Ingénieur d'état au laboratoire universitaire à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. Pour son aide et pour ses remarques pertinentes.*



Dédicace



C'est avec profonds et sincères mots je dédie ce mémoire de fin d'études

À mon *cher père*.

À ma *chère mère*.

Pour leurs sacrifices, leurs amours et leurs soutiens.

Je leur dois beaucoup d'amour et respect que dieu me les garde.

À mes frères: *Mohamed & Yahia*.

À mes sœurs: *Imene & Israa*.

Pour leurs encouragements permanents.

À ma cher binôme : *Chaïma*

Pour sa sympathie, pour son soutien indéfectible et sa patience infinie.

À mes amies *Aïcha et Asma*.

À tous ceux qui sont chers.

Et à tous mes collègues de la promotion 2020/2021 biochimie appliquée avec
lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.





Dédicace



Je dédie ce travail

À ma *chère grand-mère*

C'est la personne la plus idéale dans ce monde.

Qui me donne tout l'amour et grâce à ses prières, j'ai réussi.

À mon *cher père* et ma *chère mère*

Qui m'ont toujours poussé et motivé.

Que dieu vous procure longue vie et bonne santé.

À mes chères sœurs: *Roufaïda, Inal, Malak* et *Rahma*.

À ma nièce *Assil*.

À mon cher *Seddik* qui est mon frère avant qu'il soit mon oncle,

Pour son soutien et son aide illimité.

Et à toute ma famille pour leurs amours et leurs encouragements.

À ma cher binôme *Aya*

Pour son soutien, sa persévérance, sa patience et sa compréhension tout au long
de ce travail

Je te souhaite un avenir plein de succès et de bonheur.

À tous mes collègues et mes amis.

Chaïma



Résumé

En décembre 2019, un nouveau coronavirus était identifié dans la ville du Wuhan en Chine. Ce virus, responsable du syndrome respiratoire aiguë sévère (SARS), se propage rapidement et provoque un effet catastrophique sur la population mondiale. Faisant appel aux méthodes de modélisation moléculaire et, plus particulièrement, au docking moléculaire par le logiciel Surflex, nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de l'enzyme PL protéase. Nous avons effectué des mono-substitutions et des bi-substitutions en introduisant des modifications dans la structure de l'inhibiteur de référence « (3R)-3-((S)-2-ethoxypentanamido)-1-(1-(2-fluorophenyl)ethyl)-3-methylpyrrolidinium » dont l'affinité est de 3.92 M^{-1} afin d'obtenir des composés présentant des affinités supérieures. Les résultats de cette opération ont permis de sélectionner les deux meilleurs composés dont le B11 avec une affinité de 5.74 M^{-1} et le composé B'4 avec 7.17 M^{-1} . Ensuite, nous avons évalué les propriétés physico-chimiques ainsi que le profil ADMET de ces composés via le serveur ADMETlab. Les résultats du profil ADMET n'étant pas satisfaisants pour les deux composés, nous avons effectué d'autres modifications pour essayer de les améliorer. Nous avons obtenu les composés C1 et C2 avec des affinités acceptables égales à 6.63 et 5.63 M^{-1} respectivement et présentant un bon profil ADMET. Ils peuvent être proposés comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de la PLpro. Cependant, des tests *in vitro* et *in vivo* sont indispensables pour valider ces deux molécules en tant qu'inhibiteurs de l'enzyme.

Mot clés: Coronavirus, SARS, docking moléculaire, Surflex, PL protéase, ADMET.

Abstract

In December 2019, a new coronavirus was identified in the city of Wuhan in China. This virus, which causes severe acute respiratory syndrome (SARS), spreads rapidly and has a catastrophic effect on the world population. Using molecular modeling methods and, in particular, molecular docking by the Surflex software, we tried to develop new, more effective inhibitors of the enzyme PL protease. Mono-substitutions and bi-substitutions were performed by introducing changes in the structure of the reference inhibitor " (3R)-3-((S)-2-ethoxypentanamido)-1-(1-(2-fluorophenyl)ethyl)-3-methylpyrrolidinium " with an affinity of 3.92 M^{-1} to obtain compounds with higher affinities. The results of this operation made it possible to select the two best compounds including B11 with an affinity of 5.74 M^{-1} and B'4 with 7.17 M^{-1} . We then valuated the physico-chemical properties and the ADMET profile of these compounds via the ADMETlab server. As the results of the ADMET profile were not satisfactory for both compounds, we made other modifications to try to improve them. We obtained the C1 and C2 compounds with acceptable affinities of 6.63 and 5.63 M^{-1} respectively and with a good ADMET profile. They can be proposed as potential new PLpro inhibitors. However, *in vitro* and *in vivo* tests are essential to validate these two molecules as inhibitors of the enzyme.

Keywords: Coronavirus, SARS, molecular docking, Surflex, PL protease, ADMET.

الملخص

في شهر ديسمبر عام 2019 م، ظهر فيروس كورونا المستجد بمدينة ووهان الصينية ، هذا الفيروس المسؤول عن متلازمة العسر التنفسي (سارس) ، انتشر بسرعة في كل أنحاء العالم وأثر تأثيرا كارثيا على سكان العالم.

في بحثنا قمنا باستخدام طريقة النمذجة الجزيئية وبالتحديد الالتحام الجزيئي بواسطة برنامج Surflex لتطوير مركبات جديدة تعمل على تثبيط انزيم PL بروتياز.

قمنا بإجراء استبدال أحادي واستبدال ثنائي وذلك بإدخال تغييرات على هيكل المثبط المرجعي بارتباط M^{-1} 3.92 من أجل الحصول على مركبات ذات ارتباطات أعلى. سمحت نتائج العملية السابقة باختيار أفضل مركبين B11 بارتباط 7.17 و M^{-1} B'4 بارتباط M^{-1} 5.74، ثم قمنا بتقييم الخصائص الفيزيائية و الكيميائية و الصيدلانية ADMET لهذه المركبات عن طريق خادم ADMETlab. نتائج دراسة خصائص المركبين لم تكن كافية فقمنا بتعدلات أخرى لمحاولة تحسين هذه الخصائص . حصلنا على المركبين C1 و C2 برابطة 6.63 و M^{-1} 5.63 على التوالي. هذان المركبان لديهما خصائص صيدلانية ADMET جيدة ويمكن اقتراحهما كمثبطات جديدة محتملة. ومع ذلك، تبقى اختبارات *in vitro* و *in vivo* ضرورية لتثبيت هذين الجزيئين كمثبطات للإنزيم.

الكلمات المفتاحية: فيروس كورونا، سارس، الالتحام الجزيئي، Surflex، PL بروتياز، ADMET.

Table de matière

Résumé.....	I
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux	VI
Liste des abréviations	VII

PARTIE THEORIQUE

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE 1 : LES CORONAVIRUS.

1 Introduction.....	3
2 Définition des coronavirus	4
3 Les types de coronavirus	4
4 SARS-COV2	5
4.1 Structure de SARS-COV2.....	6
4.2 Mécanisme d'infection	7
5 Traitement et vaccination.....	9
5.1 Traitement.....	9
5.2 Vaccination.....	10
5.2.1 Les types de vaccins	11
5.2.2 Effets indésirables	12

CHAPITRE 2: LA PL PROTEASE.

1 Les protéases virales	14
2 Les protéases du SARS-COV2.....	14
3 La protéine Nsp3	15
4 SARS COV2 PLpro	15
4.1 Structure de PLpro.....	16
4.1.1 Le site actif du SARS COV2 PLpro.....	17
4.2 Mécanisme d'action du PLpro	18
4.3 Les inhibiteurs de SARS COV2 PLpro	19
4.3.1 Le choix de l'inhibiteur de référence	20

CHAPITRE 3: DOCKING MOLECULAIRE

1	Introduction	21
2	Les étapes de docking	21
3	Les outils du docking	22
3.1	Le récepteur	22
3.2	Le ligand	22
4	Les types de docking	23
5	Les interactions protéines-ligands	24
5.1	La liaison hydrogène	24
5.2	Interaction ionique	24
5.3	Les interactions hydrophobes	25
5.4	Les interactions de Van der waals	26
6	Les programmes de docking	26
6.1	Surflex	27

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES.

I	Matériels	29
1	Micro-ordinateurs	29
2	Les programmes	29
3	Banques de données et sites internet	30
II	Méthodes	31
1	Les tests de fiabilité des logiciels	31
1.1	Le RMSD (RootMean Square Deviation)	31
1.2	Analyse visuelle.....	31
1.3	Le coefficient de corrélation (r).....	31
2	Préparation des molécules au docking moléculaire	32
2.1	Le choix de la cible thérapeutique	32
2.2	Le choix du complexe 7JN2	32
2.3	Préparation de la protéine	33
2.4	Préparation de ligand	33
2.5	Réalisation du docking	35
3	Proposition des nouveaux inhibiteurs théoriques de la PLpro	35

3.1	Mono-substitution.....	35
3.2	Bi-substitution	366
4	Filtrage ADMET	36
4.1	Drug-likeness Evaluation	37
4.2	ADMET prediction.....	38
4.3	Les tests de toxicité.....	38
4.3.1	Test d'Ames	38
4.3.2	Test d'inhibition de hERG	39
4.3.3	Test d'hépatotoxicité humaine (H-HT)	39
4.3.4	SkinSen (Sensibilisation cutanée, LLNA)	39
4.3.5	DL50 (DL50 de toxicité aigüe)	39
5	Analyse visuelle des interactions établies entre le ligand et les acides aminés du site actif	39

CHAPITRE 5: RESULTATS ET DISCUSSION.

1	Introduction.....	40
2	Tests de fiabilité de programme de docking « Surflex »	40
2.1	Test RMSD	40
2.2	Analyse visuelle.....	41
2.3	Test de corrélation linéaire	43
2.4	Conclusion	45
3	Proposition des nouveaux inhibiteurs	45
3.1	Le choix du complexe 7JN2	45
3.2	Le choix de l'inhibiteur de référence	45
3.3	Substitution de l'inhibiteur de référence	46
3.3.1	Mono-substitution	46
3.3.2	Bi-substitution	48
3.4	Etude des interactions	53
4	L'évaluation des propriétés ADMET	61
4.1	Les propriétés physico-chimiques	61
4.2	Les propriétés pharmacocinétiques	62
4.3	Les tests de toxicité.....	64
5	L'amélioration des propriétés.....	65
5.1	Le composé B'4.....	65

5.2	Le composé B11	70
6	Comparaison entre les propriétés des composés C1 et C2.....	74
7	Conclusion	76
	Conclusion et perspectives.....	77

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure N°1: Particule de coronavirus en microscopie électronique.....	4
Figure N°2: Structure du génome des coronavirus.	6
Figure N°3: Représentation schématique de structure de SARS-COV2.	7
Figure N°4: Le cycle infectieux du SARS COV2.....	9
Figure N°5: Principe d'action des inhibiteurs des protéases.....	14
Figure N°6: Représentation des sites de clivage de protéases de SARS COV2.....	15
Figure N°7 : Alignement du SARS-COV-2 PLpro avec le SARS CoV PLpro.....	16
Figure N°8: Présentation de la structure et de site actif du SARS-CoV-2 PLpro.....	17
Figure N°9: Représentation du site actif de SARS COV2 PLpro.....	18
Figure N°10: PLpro avec l'inhibiteur covalent VIR250 lié à Cys111.....	19
Figure N°11: La structure de l'inhibiteur de référence.....	20
Figure N°12: Représentation schématique des étapes du docking moléculaire.....	22
Figure N°13: La liaison hydrogène.....	24
Figure N°14: La liaison ionique.....	25
Figure N°15: Les interactions hydrophobes.....	25
Figure N°16: Les interactions de Van der waals.....	26
Figure N°17: Utilisation des différents logiciels de docking.....	27
Figure N°18: Les différentes valeurs de r.....	32
Figure N°19 : La structure tridimensionnelle du complexe 7JN2, générée par la PDB.....	33
Figure N°20: La structure 2D de l'inhibiteur de référence avec les différents radicaux.....	34
Figure N°21: La structure 3D de l'inhibiteur de référence.....	34
Figure N°22: Les groupements fonctionnels rajoutés lors de la mono-substitution.....	36
Figure N°23: Les groupements fonctionnels rajoutés lors de la bi-substitution.....	36
Figure N°24: Résultat en pourcentage du test RMSD.....	41
Figure N°25: Superposition de l'inhibiteur de référence et du final-0 calculé par Surflex du complexe 1ZVX (RMSD=0.772Å).....	42
Figure N°26: Superposition de l'inhibiteur de référence et du final-0 calculé par Surflex du complexe 2XEY (RMSD=2.212Å).....	42
Figure N°27: Superposition de l'inhibiteur de référence et du final-0 calculé par Surflex du complexe 1JSV (RMSD=3.254Å).....	42
Figure N°28: Courbe de corrélation linéaire entre log IC50 des 29 complexes et leurs affinités.....	44
Figure N°29: La structure de l'inhibiteur de référence.....	45
Figure N°30: Représentation des radicaux R1, R2, R3 et R4 dans la structure de l'inhibiteur de référence.....	46
Figure N°31: Structure de composé monosubstitué M7.....	49
Figure N°32: Représentation des radicaux R1, R2, R3 et R4 dans la structure du composé monosubstitué M7.....	49
Figure N°33: Structure de composé monosubstitué M51.....	52
Figure N°34: Représentation des radicaux R1, R2, R3 et R4 dans la structure du composé monosubstitué M51.....	52

Figure N°35: La présentation des interactions du ligand de référence avec le site actif de la PLpro en schéma 2D.	53
Figure N°36: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du ligand de référence avec le site actif de PLpro.....	54
Figure N°37: La présentation des interactions du composé monosubstitué M7 avec le site actif de la PLpro en schéma 2D.....	55
Figure N°38: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué M7 avec le site actif de la PLpro.	55
Figure N°39: La présentation des interactions du composé monosubstitué M51 avec le site actif de PLpro en schéma 2D.	56
Figure N°40: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué M51 avec le site actif de PLpro.	57
Figure N°41: La présentation des interactions du composé bi-substitué B11 avec le site actif du PLpro en schéma 2D.	58
Figure N°42: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé bi-substitué B11 avec le site actif de PLpro.....	58
Figure N°43: La présentation des interactions du composé monosubstitué B'4 avec le site actif de PLpro en schéma 2D.	59
Figure N°44: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué B'4 avec le site actif de PLpro.....	60
Figure N°45: Structure de composé bi-substitué B'4.	65
Figure N°46: Structure de composé modifié C1.	65
Figure N°47: La présentation des interactions du composé monosubstitué C1 avec le site actif de PLpro en schéma 2D.	66
Figure N°48: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué C1 avec le site actif de PLpro.	66
Figure N°49: Structure de composé bi-substitué B11.....	70
Figure N°50: Structure de composé modifié C2.	70
Figure N°51: La présentation des interactions du composé monosubstitué C2 avec le site actif de PLpro en schéma 2D.	71
Figure N°52: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué C2 avec le site actif de PLpro.	71

Liste des tableaux

Tableau N°1: Principaux programmes d'amarrage moléculaire.....	26
Tableau N°2: Les caractéristiques du 7JN2.....	33
Tableau N°3: Les caractéristiques du ligand de référence.....	34
Tableau N°4: Valeurs de RMSD des complexes étudiés.....	41
Tableau N°5: Résultats de l'analyse par régression linéaire des 29 complexes.....	43
Tableau N°6: Les fonctions et les affinités des composés monosubstitués.....	46
Tableau N°7: Les fonctions et les affinités des composés bi-substitués de M7.....	50
Tableau N°8: Les fonctions et les affinités des composés bi-substitués de M51.....	52
Tableau N°9: Les liaisons établies par le ligand de référence avec le site actif de PLpro.....	54
Tableau N°10: Les liaisons établies par le composé M7 avec le site actif de la PLpro.....	56
Tableau N°11: Les liaisons établies par le composé M51 avec le site actif de PLpro.....	57
Tableau N°12: Les liaisons établies par le composé B11 avec le site actif de PLpro.....	59
Tableau N°13: Les liaisons établies par le composé B'4 avec le site actif de PLpro.....	60
Tableau N°14: Les propriétés physico-chimiques.....	61
Tableau N°15: Les propriétés pharmacocinétiques ADME.....	63
Tableau N°16: Les résultats de la toxicité.....	64
Tableau N°17: Les liaisons établies par le composé C1 avec le site actif du PLpro.....	67
Tableau N°18: Les propriétés physico-chimiques du composé C1.....	67
Tableau N°19: Les propriétés pharmacocinétiques ADME du composé C1.....	68
Tableau N°20: Les résultats de la toxicité du composé C1.....	69
Tableau N°21: Les liaisons établies par le composé C2 avec le site actif de la PLpro.....	72
Tableau N°22: Les propriétés physico-chimiques du composé C2.....	72
Tableau N°23: Les propriétés pharmacocinétiques du composé C2.....	73
Tableau N°24: Les tests de toxicité du composé C2.....	73
Tableau N°25: Comparaison entre les propriétés des composé C1 et C2.....	74

Liste des abréviations

2D: Deux dimensions.

3CL: 3Chymotrypsine-like.

3D: Trois dimensions.

Å: Angström.

AA: Acide aminé.

ACE2: Angiotensin Converting Enzyme 2.

ADMET: Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité.

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

ARN: Acide Ribonucléique.

ARNm: Acide Ribonucléique messenger.

BBB: Blood-brain-barrier.

BL2: La boucle de blocage 2.

COVID-19: Coronavirus Disease appeared in 2019.

CYP: Cytochrome P.

DL50: Dose létale 50.

ECMO: Extracorporeal Membrane Oxygenation.

Egr-1: Early growth response 1.

EM: Microscope électronique.

EMA: European Medicines Agency.

ERGIC: Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment.

JC: Jésus-Christ (Avant la naissance du Christ).

hERG: Human Ether-à-go-go-Related Gene.

H-HT: Human Hepatotoxicity.

HIA: Human Intestinal Absorption.

HR: Répétition Hepeptidique.

IC50: Inhibitory Concentration 50 %.

IFN: Interferon.

IKK: Inhibiteurs-kB kinases.

INF-I: Interféron de type I.

IRF3: Interferon-regulatory factor-3.

ISG15: Le gène 15 stimulé par l'interféron.

Kcal: Kilocalorie.

KDa: Kilodalton.

LogD: Coefficient de distribution.

LogP: Coefficient de partage.

LLNA: Local Lymph Node Assay.

MERS-COV: Middle East respiratory syndrome coronavirus.

Mg: Milligramme.

Mm: Masse molaire.

NF-KB: Nuclear factor-kappa B.

NIH: National Institutes of Health.

Nsp: Protéine non structural.

OMS: L'Organisation Mondiale de la Santé.

ORF: Open Reading Frame.

PDB: Protein Data Bank.

Plpro: Papain-like protease.

PM: Poids moléculaire.

Pp: Polyprotéines répliques.

RBD: Receptor Binding Domain.

RBM: Receptor Binding Motif.

RIG-I: Le gène I inductible par les rétinoïdes.

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire.

RMSD: RootMean Square Deviation.

TC: Le complexe réplécase-transcriptase.

SARS-CoV: Severe acute respiratory syndrome coronavirus.

TBK1: La TANK-binding kinase-1.

TGF- β 1: Transforming Growth Factor.

TLR : Les récepteurs Toll-like.

TMPRSS2: Transmembrane Protease Serine 2.

TPSA: Polar surface area.

Ub: Ubiquitine.

Ubl: Ubiquitine-like.

Partie théorique

Introduction générale

Introduction générale

Après le SARS-CoV1 en 2002 en Chine, puis le MERS-CoV en 2012 dans la péninsule Arabique responsable des syndromes de détresse respiratoire souvent mortels [1]. En décembre 2019, un nouveau coronavirus était identifié dans la ville de Wuhan en Chine, chez des patients qui présentaient des pneumopathies sévères inexpliquées.[2]

En février 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) attribua le nom de COVID-19 pour désigner la maladie causée par ce virus, initialement appelé nCoV-2019, puis SARS-CoV-2 par le comité international de taxonomie des virus [3], il s'agit de la troisième menace sanitaire mondiale liée à un coronavirus en moins de vingt ans.[1]

Le nouveau coronavirus 2019 (2019-nCoV) du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) comme on l'appelle maintenant, se propage rapidement depuis son origine dans la ville de Wuhan en Chine vers le reste du monde [4] et provoque un effet catastrophique sur la démographie mondiale entraînant plus de 3.75 millions de décès dans le monde.[5]

Dans le but de chercher des traitements du COVID-19, des études de criblage *in silico* et de simulation moléculaire ont été réalisées pour identifier des médicaments contre les protéases du virus comme la PL-protéase (PLpro). La PLpro est un composant essentiel du complexe réplécase-transcriptase. Il traite la polyprotéine virale et a la fonction supplémentaire de retirer l'ubiquitine et l'ISG15 (une enzyme désubiquitinante et dés-ISGylante) pour supprimer l'inflammation et la signalisation antivirale.

Dans le passé, le processus de développement d'un nouveau médicament était long et coûteux. De nos jours, avec le développement de l'outil informatique, de la bio-informatique et particulièrement du docking moléculaire, la recherche devient plus rapide et moins onéreuse. Le docking moléculaire présente un outil exemplaire pour prédire la position la plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur [6]. Nous l'avons utilisé afin de proposer de nouveaux inhibiteurs de notre cible, la protéase de type papaine (PLpro).

Tout d'abord nous avons testé la fiabilité du programme de docking "Surflex" à travers trois tests. Le premier est le calcul de l'écart quadratique moyen (RMSD) entre la position du ligand donné par docking et sa position déterminée expérimentalement. Ce test a été suivi par une analyse visuelle pour vérifier la superposition des deux ligands. Le deuxième test consiste à calculer le coefficient de corrélation linéaire entre les affinités calculées par Surflex et les IC50 des complexes téléchargés à partir de la PDB.

Introduction générale

Ensuite, nous avons choisi un inhibiteur de la PLpro avec les meilleures propriétés possibles et effectué des substitutions structurales par l'introduction de nouveaux groupements chimiques au niveau de la structure de l'inhibiteur de référence. Le docking moléculaire des structures substituées permet d'obtenir des inhibiteurs plus puissants avec une meilleure affinité vis-à-vis de la PL protéase. Il est important de compléter cette étape par une analyse visuelle de leurs interactions avec l'enzyme cible.

Enfin nous avons évalué les propriétés physicochimiques, les propriétés pharmacocinétiques ainsi que la toxicité potentielle des composés mono et bi-substitués ayant présenté les meilleures affinités envers notre cible.

Notre mémoire comprend deux grandes parties :

- 1- Une partie bibliographique qui comprend trois chapitres dont :
 - Le premier chapitre porte sur le coronavirus.
 - Le deuxième donne un aperçu sur notre cible, la « PLpro » et ses inhibiteurs.
 - Le troisième chapitre décrit le docking moléculaire et ses logiciels.
- 2- Une partie pratique formée de deux chapitres dont :
 - Le premier chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude.
 - Le second expose les résultats et leurs interprétations suivis d'une conclusion qui résume le travail et des perspectives.

Chapitre 1: Les coronavirus

1 Introduction

Dès l'antiquité, les pandémies ont affecté les civilisations tout au long de l'histoire humaine, la première épidémie connue se produisant en 430 avant JC, pendant la guerre du Péloponnèse. Beaucoup de ces pandémies ont eu des impacts importants sur la société, provoquant la mort d'une grande part de la population. Parmi ces pandémies: [7]

- **La variole (XVe - XVIIe siècles):** une maladie contagieuse qui tue environ 30% des personnes infectées. Au cours de cette période, la variole a coûté la vie à environ 20 millions de personnes, soit près de 90 % de la population des Amériques.
- **Le choléra (1817 - 1823):** la première pandémie de choléra a débuté en Inde, et s'est propagée dans la plus grande partie de la région, puis dans les régions voisines.
- **La grippe espagnole ou H1N1 (1918 - 1919):** la grippe espagnole de 1918 était une épidémie de virus H1N1 qui a infecté environ 500 millions de personnes, soit un tiers de la population mondiale. La pandémie a fait plus de 50 millions de victimes dans le monde.
- **Le SRAS (2002 - 2003):** le SRAS, ou le syndrome respiratoire aigu sévère, est une maladie causée par l'un des sept coronavirus qui peuvent infecter l'homme. En 2003, une épidémie qui a pris naissance dans la province chinoise du Guangdong est devenue une pandémie mondiale.
- **La grippe A ou H1N1 (2009 - 2010):** une nouvelle forme du virus de la grippe est apparue en 2009, infectant environ 60,8 millions de personnes aux États-Unis, avec des décès dans le monde entier compris entre 151 700 et 575 400. Appelée "grippe porcine" parce qu'elle semble passer du porc à l'homme.
- **Ebola (2014 - 2016):** le virus Ebola, s'est peu propagé par rapport à la plupart des pandémies modernes, mais fut incroyablement mortel. Il a été découvert dans un petit village de Guinée, en 2014 puis s'est propagé à une poignée de pays voisins d'Afrique de l'Ouest. Le virus a tué 11 325 des 28 600 personnes infectées.
- **Le coronavirus ou Covid-19:** l'épidémie actuelle de nouveau coronavirus, qui provoque une maladie connue sous le nom de Covid-19, a révélé les faiblesses de la réaction de la communauté mondiale aux épidémies virales. Le 11 mars 2020, l'OMS a qualifié l'épidémie de pandémie.

2 Définition des coronavirus

Les coronavirus sont des virus à ARN simple brin positif enveloppés. Ils ont la particularité de posséder le plus long génome à ARN parmi les virus à ARN, constitué de 27 000 à 32 000 bases (soit un génome 100 000 fois plus petit que le génome humain).[8]

Les coronavirus appartenant à la famille des *Coronaviridae*, doivent leur nom à leur aspect en microscopie électronique, avec des spicules formant une couronne autour de la particule virale.[9]

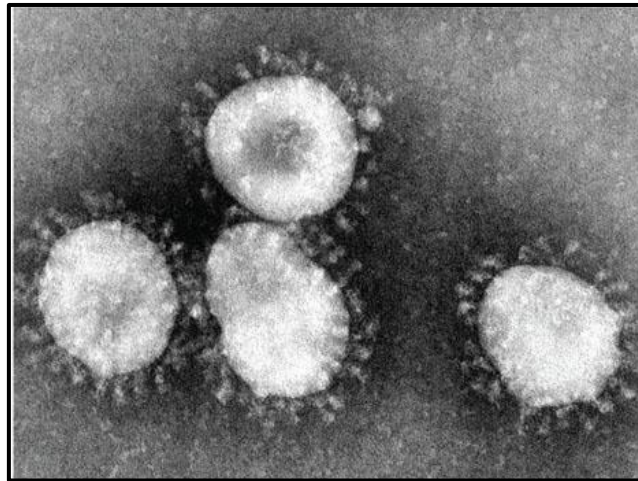


Figure N°1: Particule de coronavirus en microscopie électronique.[10]

Les coronavirus sont des virus sphériques, d'environ 100 nm, enveloppés d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées différentes protéines. Tout comme l'ADN génomique présent dans le noyau de chacune de nos cellules, l'ARN génomique des coronavirus porte l'information génétique indispensable à la production de nouveaux virions.[8]

Le génome des coronavirus présente une remarquable plasticité par mutations, délétions et recombinaisons, ce qui en fait des virus à fort potentiel évolutif. [10]

3 Les types de coronavirus

Il existe quatre sous-groupes principaux de coronavirus, appelés alpha, bêta, gamma et delta.[11][12]

Les coronavirus humains ont été identifiés pour la première fois au milieu des années 1960. Les sept coronavirus qui peuvent infecter les gens sont:

Coronavirus humains courants [11]

1. **229E** (coronavirus alpha) connu depuis les années 1960.
2. **OC43** (coronavirus bêta) connu depuis les années 1960.
3. **NL63** (coronavirus alpha) identifié en 2004.
4. **HKU1** (coronavirus bêta) identifié en 2005.

Autres coronavirus humains: [12]

5. **Le SARS-COV** a été identifié en 2003 comme la cause d'une épidémie de syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) qui a débuté en Chine vers la fin de 2002.
6. **Le MERS-COV** a été identifié en 2012 comme la cause du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS [Middle East respiratory syndrome]).
7. **Le SARS-COV2** est un nouveau coronavirus identifié comme la cause de la maladie à coronavirus de 2019 (COVID-19) qui a débuté à Wuhan, en Chine à la fin de 2019 et s'est propagé dans le monde entier.

Parfois, les coronavirus qui infectent les animaux peuvent évoluer et rendre les gens malades et devenir un nouveau coronavirus humain. Le 2019-nCoV, le SARS-CoV et le MERS-CoV en sont trois exemples récents.[13]

4 SARS-COV2

À la fin de l'année 2019, plusieurs cas de pneumonies atypiques sévères sont recensés dans la ville du Wuhan, l'émergence d'un nouveau coronavirus, similaire au SARS-CoV de 2002, est alors suspectée. Après isolement de la souche infectieuse chez des patients, l'hypothèse d'un nouveau coronavirus est confirmée : il s'agit d'un coronavirus qui partage 80 % de son génome avec celui du SARS-CoV. Initialement appelé nCoV-2019, il sera finalement rebaptisé SARSCoV-2 par le Comité international de taxonomie des virus, et la maladie qu'il induit appelée COVID-19 (coronavirus disease2019). Cette maladie émergente, qualifiée de pandémie le 11 mars 2020 par le directeur général de l'OMS, provoque une crise sanitaire et économique sans précédent depuis plusieurs décennies. Un marché de fruits de mer de la ville du Wuhan semble être l'épicentre de cette nouvelle épidémie.[2]

4.1 Structure de SARS-COV2

Le SARS-CoV2 est un virus à ARN de l'ordre des *Nidovirales*, de la famille des *Coronaviridae*, et de la sous-famille des *Coronavirinae*. Il appartient au groupe des bêta coronavirus.[14]

Le SARS-CoV 2 est un virus enveloppé à ARN monocaténaire positivement polarisé de 29,9 kb. Les deux tiers du génome (la partie 5') codent pour un vaste gène réplicase (composé de ORF1a et ORF1b) qui sera traduit en deux polyprotéines, par la suite clivées en seize protéines non structurales indispensables à la réplication virale (nsl à ns16). Le tiers restant du génome (la partie 3') code essentiellement pour les protéines de structures du virus dont quatre glycoprotéines membranaires : la protéine Spike (S), et les protéines de membrane (M) et d'enveloppe (E), ainsi que la protéine de capsid (N).[9]

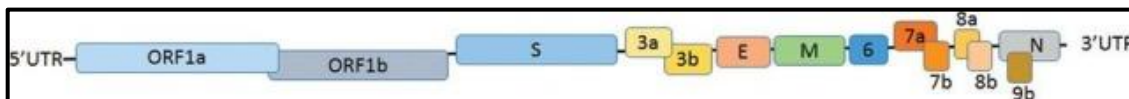


Figure N° 2:Structure du génome des coronavirus.[9]

Les protéines de structures du SARS-COV 2 sont :

- 1. Protéine S (spike protein):** est une protéine de 180-200 kDa, très fortement glycosylée, qui s'assemble sous forme de trimères et est ancrée à la surface de l'enveloppe virale, cette protéine va lier le récepteur de la cellule hôte l'ACE2 et permettre l'entrée du SARS-CoV2 dans la cellule. La protéine S contient 2 sous-unités, S1 et S2, la sous-unité S1 incluant le domaine de liaison au récepteur (RBD, receptor binding domain) contenant le motif de liaison au récepteur ACE2 (RBM, receptor binding motif), le domaine S2 est, quant à lui, un domaine de fusion nécessaire pour la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule. Le blocage de la liaison avec l'ACE-2 à l'aide d'un anticorps neutralisant est une des cibles potentielles pour la vaccination.[15][16]
- 2. Protéine N (protéine de la nucléocapside):** possède plusieurs fonctions, dont la réplication du SARS-CoV2 et l'enroulement de l'ARN viral. La séquence de cette protéine est très bien conservée chez les coronavirus. Elle est fortement exprimée lors d'une infection. La protéine N est d'ailleurs une cible pour des anticorps neutralisants.[17]

3. **Protéine M (protéine membranaire):** protéine de 25 à 35 kDa, elle possède au moins un site de glycosylation (O- ou N-glycosylation selon le genre du virus). La protéine de structure la plus abondante chez le SARS-CoV2. La protéine M est considérée comme le moteur de l'assemblage des particules virales, en raison des diverses interactions intermoléculaires qu'elle établit avec les autres protéines (M-S, M-E, M-N, M-M), les interactions M-M et M-E étant les plus importantes pour l'assemblage. L'interaction entre la protéine S et la protéine M est nécessaire pour garder la protéine S dans le réticulum endoplasmique et assurer son incorporation dans le virion.[18][19]
4. **Protéine E (Enveloppe):** petite protéine membranaire de 8 à 12 kDa, elle est la moins abondante des protéines de l'enveloppe virale, impliquée notamment dans le bourgeonnement du virus vers l'extérieur de la cellule hôte. Elle stabiliserait l'enveloppe virale. Plusieurs études ont montré que la protéine E, ainsi que la protéine M, étaient nécessaires pour produire des particules sub-virales, c'est-à-dire des particules dépourvues de génome et qui ont les mêmes taille et forme qu'une particule virale complète.[15]

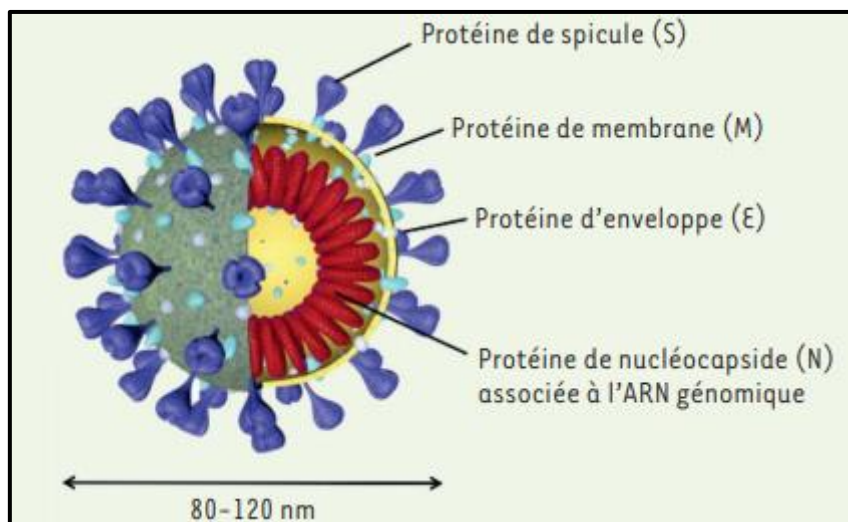


Figure N° 3: Représentation schématique de structure de SARS-COV2. [21]

4.2 Mécanisme d'infection

4.2.1 L'entrée virale

Le cycle de multiplication 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) selon trois phases: précoce-immédiate, immédiate et tardive. 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.[20]

Le virus s'attache spécifiquement au récepteur de la cellule sensible grâce à une interaction de haute affinité entre la protéine S virale et l'ACE2 (Angiotensin-converting enzyme), 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 par le domaine RBD, la sous-unité S2 assure l'endocytose puis la fusion de l'enveloppe virale et la membrane cellulaire.[21][22]

Le clivage de la protéine S par la protéase membranaire TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2) [23] de la cellule hôte active la fusion au niveau de deux sites en tandem, la répétition heptidique 1 (HR1) [24] et HR2 [25] au niveau de la sous-unité S2. Le HR1 et le HR2 interagissent pour former un faisceau à six hélices, ce qui permet au virus et à la membrane cellulaire de s'approcher et de fusionner.

L'ajout d'un site du clivage furine [26] permet un clivage des sous-unités S1/S2 dès la biosynthèse virale [16] et pourrait majorer le potentiel infectant du virus.[27]

4.2.2 La réplication

L'ARN viral de polarité positive est libéré dans le cytoplasme de la cellule infectée. Celui-ci est répliqué en deux brins : un brin de polarité positive qui sera encapsidé dans les virions et un brin de polarité négative qui servira de matrice à la synthèse des protéines virales en utilisant la machinerie de traduction de la cellule [28]. Deux grands cadres de lecture ouverts polycistroniques ORF1a et ORF1b à l'extrémité 5' du génome codent pour 16 protéines non structurales (NSP) formant deux polyprotéines répliques pp1a et pp1b. Les polyprotéines pp1a et pp1ab sont traduites et clivées pour former le complexe réplique-transcriptase (RTC) qui assure la réplication du génome, la synthèse des protéines [29]. Pp1a code les protéines nsp1 à nsp11, et pp1ab pour les protéines nsp1 à nsp16. Ces deux polyprotéines sont clivées grâce aux activités protéasiques de deux protéines différentes, nsp3 et nsp5, produites par autoclivage. Nsp3 clive les jonctions nsp1-2, nsp2-3 et nsp3-4, tandis que nsp5 clive toutes les jonctions des protéines suivantes. Le complexe réalisera également la transcription de l'ensemble des ORF codant les protéines structurales et accessoires, sous la forme d'ARN messagers (ARNm) dits « sous-génomiques ». La nucléocapside virale est assemblée à partir d'ARN génomique et de protéines N dans le cytoplasme.[30]

4.2.3 L'assemblage et la sécrétion des virions

Les protéines S, M et E traduites simultanément, sont ensuite adressées au réticulum endoplasmique de la cellule. Des groupements glycosides sont alors ajoutés aux protéines natives S et M. Celles-ci seront ensuite transportées par voie vésiculaire vers le compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (ERGIC), qui est le site d'assemblage des coronavirus. C'est le lieu d'une multitude d'interactions protéiques et du bourgeonnement des nouvelles particules virales. Cette étape dans l'ERGIC est cruciale pour le bon assemblage des virions. Les virions néoformés seront ensuite sécrétés par exocytose afin d'infecter les cellules environnantes.[31]

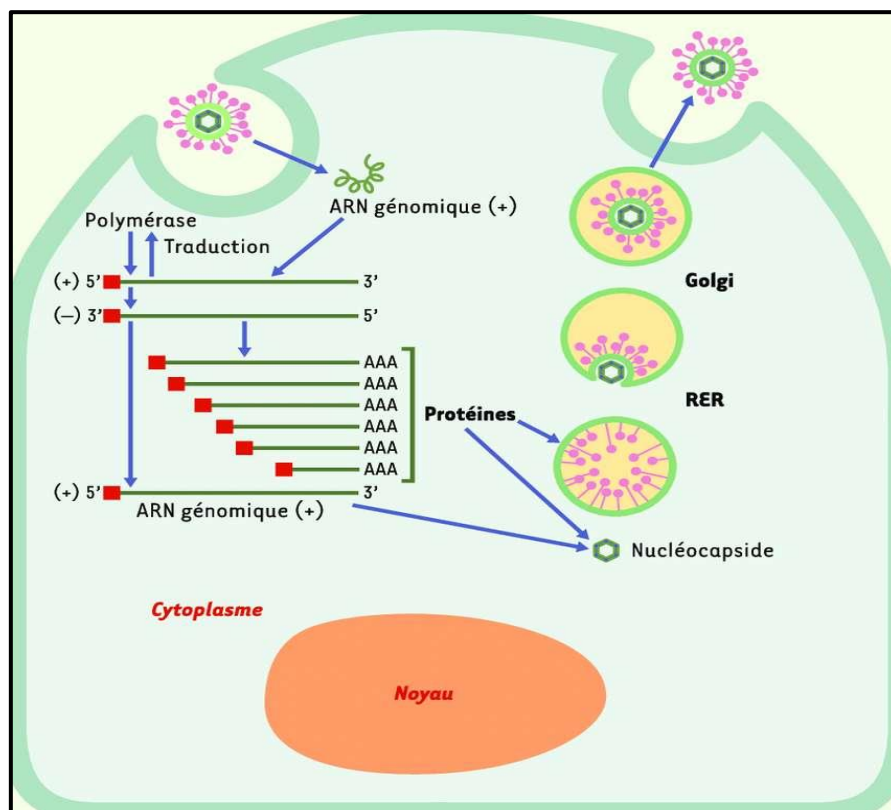


Figure N° 4: Le cycle infectieux du SARS COV2.[28]

5 Traitement et vaccination

5.1 Traitement

Le traitement du COVID-19 dépend de la gravité de la maladie. Les définitions de gravité du CDC sont les suivantes: [12]

- Maladie légère: les patients qui ont des signes et des symptômes de COVID-19 (par exemple: fièvre, toux, mal de gorge, sensation de malaise, céphalée, douleur musculaire) mais sans dyspnée ou imagerie thoracique anormale.
- Maladie modérée: les patients qui ont des signes de maladie des voies respiratoires inférieures par évaluation clinique ou imagerie, et une saturation en oxygène (SpO₂) $\geq 94\%$.
- Maladie sévère: les patients qui ont une fréquence respiratoire $> 30/\text{min}$, une SpO₂ < 94 (ou, chez les patients présentant une hypoxémie chronique, une diminution $> 3\%$ par rapport à la valeur de base).
- Maladie critique: les patients qui ont une insuffisance respiratoire, un choc septique et/ou un dysfonctionnement de plusieurs organes.

Le traitement du COVID-19 est un traitement de support (symptomatique). De nombreux traitements et essais cliniques de vaccins sont actuellement enregistrés, mais les données sur un éventuel traitement efficace restent rares.

Les NIH treatment guidelines (lignes directrices de traitement du NIH) recommandent d'utiliser la dexaméthasone (à la dose de 6 mg 1 fois/jour pendant 10 jours ou jusqu'à la sortie de l'hôpital, selon la première de ces deux éventualités) chez les patients de COVID-19 qui sont sous ventilation artificielle ou qui ont besoin d'une supplémentation en oxygène, mais déconseillent l'utilisation de la dexaméthasone chez les patients qui n'ont pas besoin d'oxygène supplémentaire. Si la dexaméthasone n'est pas disponible, d'autres glucocorticoïdes (par exemple: prednisone, méthylprednisolone, hydrocortisone) peuvent être utilisés.

Le NIH recommande le remdesivir pendant 5 jours ou jusqu'à la sortie de l'hôpital, selon la première de ces éventualités, chez les patients hospitalisés atteints de COVID-19 qui ont besoin d'une supplémentation en oxygène, mais qui ne nécessitent pas de délivrance d'oxygène par un dispositif à haut débit, une ventilation non invasive, une ventilation mécanique invasive ou une oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO). [12]

5.2 Vaccination

En décembre 2020, plus de 200 vaccins candidats contre la maladie COVID-19 étaient en cours de développement. Sur ceux-ci, au moins 52 vaccins candidats sont au stade des essais

sur l'homme. Plusieurs autres vaccins candidats sont actuellement en phase I/II, et entreront dans la phase III au cours des prochains mois.[32]

La principale cible antigénique à l'heure actuelle est la sous-unité S1 de la protéine Spike, à l'instar des vaccins développés pour le SARS-CoV1 et le MERS-CoV [33][34] car son exposition membranaire facilite sa reconnaissance par le système immunitaire. De plus, cibler ce site permettrait d'empêcher l'entrée du virus dans les cellules [35]. Cependant, d'autres sites de la protéine spike ou d'autres protéines non structurales pourraient être de bons candidats [36]. Une fois la cible antigénique définie, plusieurs stratégies vaccinales peuvent être évaluées: vaccination à partir d'ARN, d'ADN, de protéine recombinante, ou de vecteur viral.

La durée de la protection offerte par les anticorps est variable, et les taux d'anticorps anti-SARS-CoV1 n'étaient détectables que durant les deux ans suivant l'infection chez 176 patients infectés.[37]

L'induction d'une réponse mémoire lymphocytaire T pourrait également permettre de prévenir les formes sévères de l'infection, comme prouvé dans l'infection à SARS-CoV-1.[38]

5.2.1 Les types de vaccins

Plusieurs types de vaccins potentiels contre la maladie COVID-19 sont en cours de mise au point, notamment :

- **Des vaccins inactivés ou vivants atténués** contenant une forme inactivée ou atténuée du virus qui ne peut pas causer de maladie mais qui entraîne tout de même une réponse immunitaire.
- **Des vaccins à base de protéines**, qui contiennent des fragments inoffensifs de protéines ou d'enveloppe protéique qui imitent le virus de la COVID-19 pour entraîner une réponse immunitaire en toute sécurité.
- **Des vaccins à vecteurs viraux** qui contiennent un virus inoffensif qui ne peut pas causer de maladie mais qui sert de plateforme pour la production de protéines du coronavirus afin de générer une réponse immunitaire.

- **Des vaccins à ARN et à ADN**, mis au point selon une méthode de pointe consistant à utiliser un ARN ou un ADN génétiquement modifié pour produire une protéine qui entraîne une réponse immunitaire en toute sécurité.[39]

À ce jour, quatre vaccins ont reçu le feu vert de l'Agence européenne du médicament (EMA) pour être administrés aux habitants des pays européens (dont la France) en prévention des formes graves de la Covid-19. Celui de Pfizer-BioNTech premier à avoir été validé le 27 décembre 2020 et le plus administré en France celui de Moderna, d'AstraZeneca (Vaxzevria) et de Johnson&Johnson (Janssen).[40]

D'autres sont en cours d'évaluation par l'EMA: [40]

- Le vaccin **Sputnik V** (Russie).
- Le vaccin **CureVac** (Allemagne).
- Le vaccin **Sanofi-GSK**.
- Le vaccin **Novavax**.
- Le **CoronaVac** (vaccin chinois développé par **Sinovac**).

5.2.2 Effets indésirables

5.2.2.1 Effets indésirables les plus fréquents des vaccins contre le COVID-19

Comme tout vaccin, les vaccins contre la COVID-19 peuvent provoquer des effets indésirables ; la plupart sont d'une intensité légère ou modérée et disparaissent d'eux-mêmes en quelques jours. Comme le montrent les résultats des essais cliniques, des effets indésirables plus graves ou plus durables sont possibles. Les vaccins font l'objet d'une surveillance continue pour détecter les événements indésirables.

Les effets indésirables typiques sont les suivants : douleur au point d'injection, fièvre, fatigue, maux de tête, douleurs musculaires, frissons et diarrhée. La probabilité que l'un de ces effets indésirables survienne après la vaccination varie selon le vaccin concerné.

Les vaccins contre la COVID-19 ne protègent que contre le virus SARS-CoV-2. Il est donc toujours important de se maintenir en forme et en bonne santé.[41]

5.2.2.2 Effets indésirables à long terme

Les effets indésirables surviennent généralement dans les premiers jours suivant l'administration d'un vaccin.

Après la vaccination, il faut généralement quelques semaines pour que l'organisme développe une immunité contre le SARS-CoV-2, le virus responsable de la COVID-19. Il est donc possible qu'une personne soit infectée par le SARS-CoV2 juste avant ou après la vaccination et qu'elle tombe quand même malade de la COVID-19. Cette situation est due au fait que le vaccin n'a pas encore eu le temps de conférer une protection.

Ressentir des effets indésirables après avoir été vacciné signifie que le vaccin fonctionne et que votre système immunitaire réagit comme il faut. Les vaccins sont sans danger, et en vous faisant vacciner, vous vous protégez contre la COVID-19.[41]

Chapitre 2: La PL Protéase

1 Les protéases virales

Les protéases virales sont essentielles à la production de virions par la cellule infectée car elles participent à une étape de maturation en coupant les poly-protéines virales synthétisées à des sites bien précis. Elles sont spécifiques d'un virus donné et agissent sur les protéines virales, ainsi que sur quelques protéines de la cellule hôte, pour favoriser la réplication virale [42]. C'est pour cela qu'elles suscitent un grand intérêt pour stopper la propagation des épidémies virales.

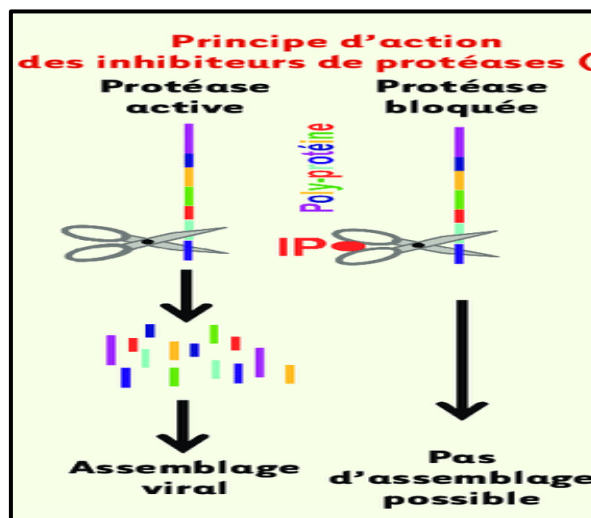


Figure N° 5: Principe d'action des inhibiteurs des protéases.[43]

2 Les protéases du SARS-COV2

Les coronavirus fournissent deux protéases intéressantes pour une intervention thérapeutique à petites molécules: la protéase du type papain-like-protease (PLpro codée dans nsp3) et la protéase du type 3Chymotrypsine-like-protease (3CL ou «Main» codée par nsp5). Les deux enzymes sont des cystéines protéases non structurales qui sont essentielles au cycle de vie viral parce que les mammifères manquent de protéases avec des préférences de substrat similaires, ces deux protéases sont des cibles antivirales intéressantes car elles sont essentielles à la réplication des coronavirus.[44]

3 La protéine Nsp3

Le génome viral du SARS-COV2 code 16 protéines non structurales, dont nsp3 est la plus grande. Il s'agit d'une protéine membranaire à domaines multiples et essentielle au sein du complexe répllication-transcription formé sur les membranes de l'hôte. C'est également une protéase, codant pour la protéase de type papaine (PLpro), qui est requise pour la libération de plusieurs autres protéines non structurales du polypeptide. Les chercheurs ont découvert que la nsp3 est une protéase plus active que la PLpro, qui était incapable de cliver nsp1- nsp2 pour libérer la nsp1, même à des concentrations croissantes de PLpro.[45]

4 SARS COV2 PLpro

La PLpro est une protéase à cystéine localisée dans la protéine non structurale 3 (NSP3) du polypeptide viral, un composant essentiel du complexe réplissime-transcriptase [46]. Il traite la polyprotéine virale en reconnaissant le térapeptide motif Leu-X-Gly-Gly et clive les liaisons peptidiques entre Nsp1 et Nsp2, Nsp2 et Nsp3, et Nsp3 et Nsp4 libérant trois protéines: Nsp1, Nsp2 et Nsp3.[47]

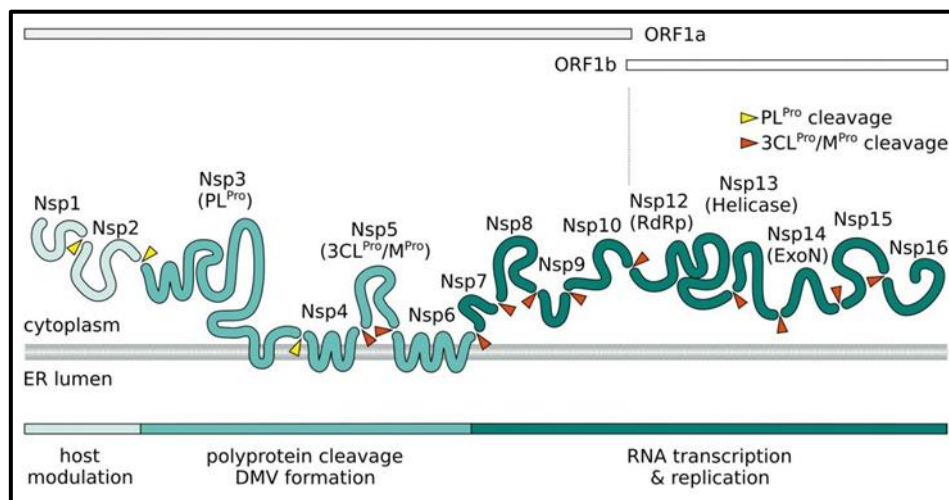


Figure N°6: Représentation des sites de clivage de protéases de SARS COV2.[29]

La PLpro a la fonction supplémentaire de retirer l'ubiquitine et l'ISG15 (une enzyme désubiquitinante et dés-ISGylante) pour supprimer l'inflammation et la signalisation antivirale [48][49]. Par conséquent, l'inhibition de l'activité PLpro peut empêcher la répllication du virus et détruire son rôle dans l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui en fait une cible prometteuse pour les médicaments antiviraux.[50][51]

- L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle caractérisée par l'ajout de chaînes d'ubiquitine (Ub: une protéine de 76 acides aminés) aux résidus lysine d'une protéine, qui régule son activité, notamment via son ciblage vers la dégradation protéasomale.
- L'ISGylation est un processus similaire à l'ubiquitination, où le gène 15 stimulé par l'interféron (ISG15), une petite protéine hautement induite par l'IFN-I, est conjugué à des protéines cibles et module leurs fonctions.

L'ubiquitination et l'ISGylation jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires innées à l'infection virale, et il n'est donc pas surprenant d'observer que plusieurs virus ont développé des stratégies différentes pour contrarier ces voies.[52]

4.1 Structure de PLpro

La séquence SARS-CoV-2 PLpro est identique à 83 % et similaire à 90 % au SARS-CoV. [53]

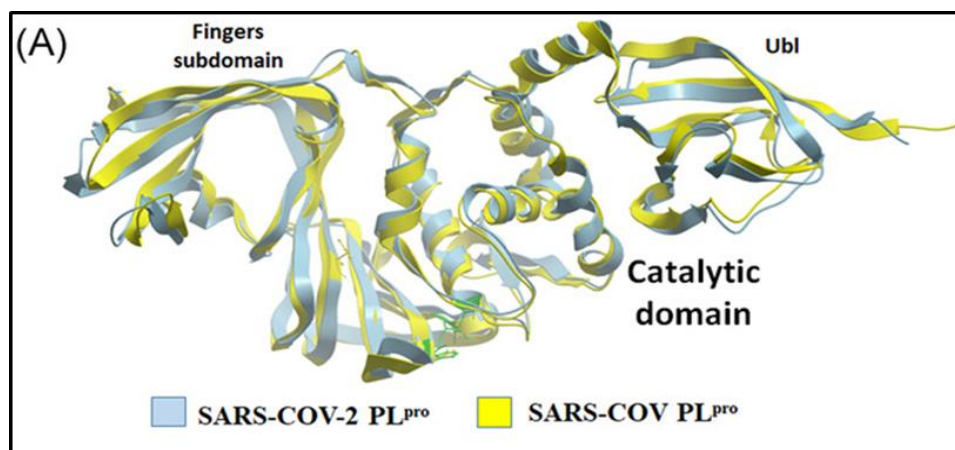


Figure N°7 : Alignement du SARS-COV-2 PLpro avec le SARS CoV PLpro.[54]

Le SARS-CoV-2 PLpro est une enzyme monomère qui peut être divisée en deux domaines principaux : le domaine catalytique et le terminal N-ubiquitine-like domaine (Ubl). Le premier est la partie intéressante en termes de fonctions enzymatiques, ainsi que d'inhibition de la protéine. Il peut être divisé en trois sous-domaines : le pouce, la paume et les doigts (Figure N°8-A).

- Un pouce est composé de six hélices et d'une petite épingle à cheveux. [53]
- Le sous-domaine des doigts est le plus complexe ; il est composé de six brins β et de deux hélices et comprend un site de liaison au zinc. Cet ion zinc structural est coordonné par quatre résidus cystéine situés sur deux boucles (Cys189, 192, 224 et

226) de deux épingles à cheveux. La liaison du zinc est essentielle pour l'intégrité structurale et l'activité de la protéase, mais la conformation de cette région varie le plus entre les différentes structures PLpro.[55]

- Le sous-domaine de la paume est composé de six brins avec les résidus catalytiques Cys111, His272 et Asp286 situés à l'interface entre les sous-domaines du pouce et de la paume. [53]

Le site actif est situé entre la paume et le pouce, utilisant trois résidus principaux, appelés la triade catalytique : Cys111, His272 et Asp286[53], (Figure N°8-B).

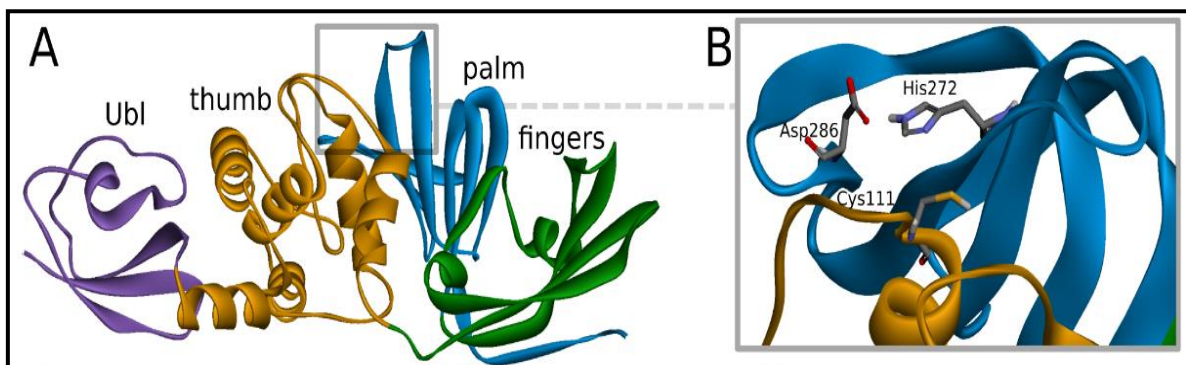


Figure N°8:Présentation de la structure et de site actif du SARS-CoV-2 PLpro.[56]

(A) Structure tertiaire du PLpro et sa division en deux parties principales.

(B) Site actif du PLpro à l'interface entre la paume et le pouce avec les trois acides aminés de la triade catalytique Cys111, His272 et Asp286 (PDB ID: 7jn2).[56]

4.1.1 Le site actif du SARS COV2 PLpro

Le site actif du SARS-CoV-2 PLpro est situé entre la paume et le pouce, il comporte la triade catalytique Cys111(C111)-His272(H272)-Asp286(D286) et autres résidus catalytiquement importants tels que tryptophane93 (W93), tryptophane106 (W106), aspartate108 (D108) et asparagine (N109) sont représentés avec le modèle en bâton.[46]

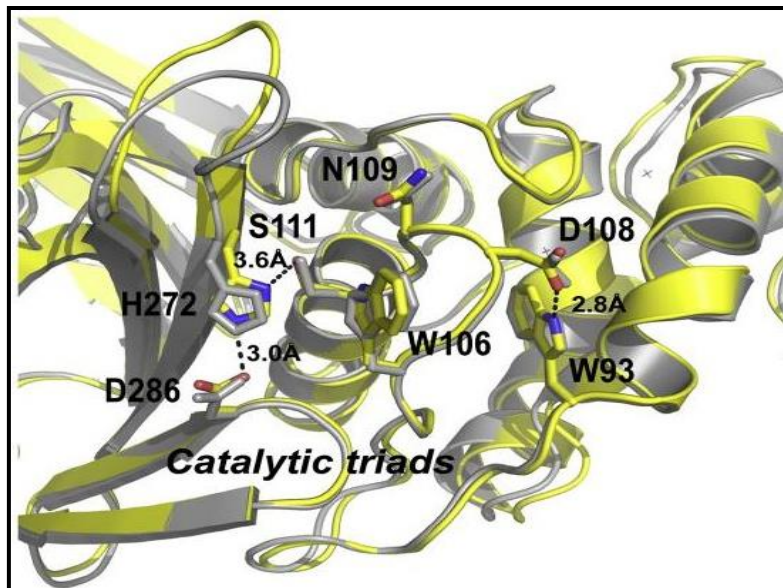


Figure N°9: Représentation du site actif de SARS COV2 PLpro.[46]

4.2 Mécanisme d'action du PLpro

La réponse immunitaire innée de la cellule hôte aux virus commence une fois que les acides nucléiques viraux sont détectés par des récepteurs de reconnaissance de formes tels que les récepteurs Toll-like (TLR) et le gène I inductible par les rétinoïdes (RIG-I). Cet événement déclenche des cascades de signaux, notamment des kinases telles que la TANK-binding kinase-1 (TBK1) et les inhibiteurs- κ B kinases (IKK), conduisant à l'activation de facteurs de transcription tels que l'interféron-regulatory factor-3 (IRF3) et le facteur nucléaire kappa. Ces protéines se transloquent dans le noyau et servent de facteurs de transcription en se liant aux éléments promoteurs dans les gènes cibles, conduisant à l'expression de plusieurs cytokines, y compris les IFN du type I, qui à leur tour déclencheront un grand nombre d'intra et des processus extracellulaires conduisant à l'activation de la réponse immunitaire innée.[57]

- La PLpro CoV2 clive principalement la protéine du type ubiquitine ISG15 des protéines de l'hôte et, par conséquent, possède une plus grande capacité à bloquer la voie IFN du type 1 qui est corrélée à l'initiation de l'immunité innée antivirale.[58]
- La PLpro inactive également TBK1, bloque la signalisation NF- κ B, empêche la translocation d'IRF3 vers le noyau, inhibe la voie de signalisation TLR7 et induit une régulation positive Egr-1-dépendante de TGF- β 1.[59][60]

- Un rôle essentiel dans le traitement des polyprotéines virales, la maturation et l'assemblage du RTC, et elle peut également agir sur les protéines de la cellule hôte en perturbant la machinerie de réponse virale de l'hôte pour faciliter la prolifération et la réplication virales. En raison de la centralité de PLpro pour la réplication virale, c'est un excellent candidat pour le ciblage thérapeutique.[53]

4.3 Les inhibiteurs de SARS COV2 PLpro

Il existe deux classes principales d'inhibiteurs du SRAS-CoV-2 PLpro, avec à la fois des structures tertiaires résolues de complexes protéine-inhibiteur et des résultats d'études in vitro concernant leurs affinités de liaison.

- **Les inhibiteurs covalents** : représentent l'un des types de composés les plus importants étudiés jusqu'à présent. Dans ce groupe, la direction principale semble se concentrer sur les échafaudages peptidiques [61]. Il existe également d'autres propositions d'inhibiteurs covalents non peptidiques, tels que l'ebiselen [62], ses dérivés [63] et le disulfirame [64]. Dans le cas des inhibiteurs peptidiques, la liaison covalente est formée avec l'un des acides aminés de la triade catalytique-Cys111. Comme les structures de ces composés forment des chaînes assez longues, la grande partie de la molécule est placée hors du site actif et se trouve sous la boucle de blocage 2 (BL2) dans le sous-domaine de la paume [61], (Figure N°10).

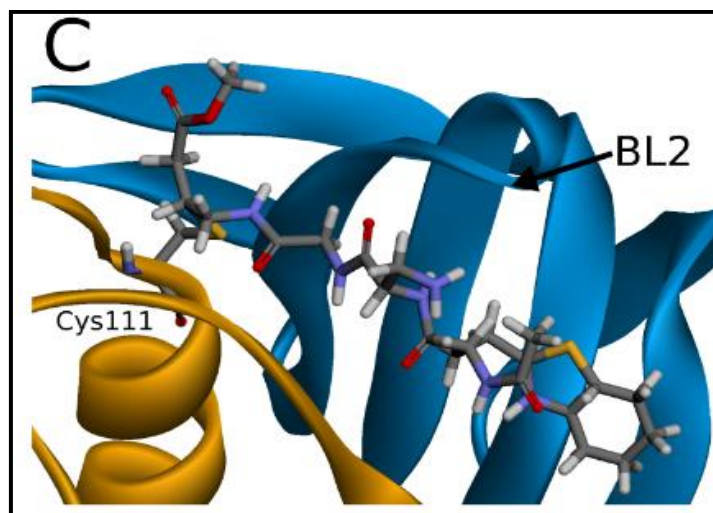


Figure N°10: PLpro avec l'inhibiteur covalent VIR250 lié à Cys111.[56]

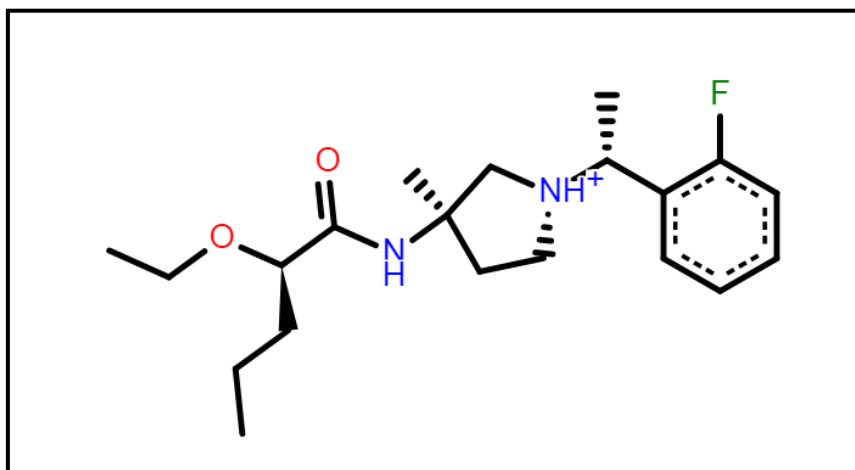
- **Les inhibiteurs non covalents** : sont le deuxième type principal de médicaments anti-SARS-CoV-2 potentiels. Dans ce groupe, les composés les plus importants et les plus étudiés comprennent des inhibiteurs connus pour agir sur le SARS-CoV PLpro et leurs dérivés. Une telle direction est raisonnable en raison de la similitude séquentielle élevée (90 %) et de l'identité (83 %) du PLpro entre le SARS-CoV et le SARS-CoV-2 [53]. Les inhibiteurs non covalents du SRAS-CoV PLpro sont en grande partie membres d'un groupe structurel de composés, à savoir les dérivés du N-[1-(naphtalen-1-yl)éthyl]benzamide (par exemple: GRL0617).[65]

4.3.1 Le choix de l'inhibiteur de référence

Nous avons consulté une base de données sur les inhibiteurs potentiels de la protéase de type papaine SARS-CoV-2. Cette base de données contient 950 inhibiteurs, C'est le résultat d'une campagne de criblage virtuel menée sur un ensemble de plus de 15 millions de composés de la bibliothèque de médicaments similaires d'ENAMINE REAL [66]. Elle est accessible facilement et gratuitement via le site web: <https://plpro-inhibitors.cent.uw.edu.pl/>.

Nous avons choisi notre inhibiteur par la dépendance de:

- ✓ L'énergie de la liaison avec la PLpro (= -24,96 kcal/mol), avec un IC50 (=370.5 nM).



FigureN°11: La structure de l'inhibiteur de référence.

Chapitre 3: Docking moléculaire

1 Introduction

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, allant de l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique jusqu'au patient, dans lequel les essais cliniques succèdent au développement préclinique.[6]

Le docking moléculaire *in silico* a pour but de prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*. [67]

2 Les étapes de docking

Docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interactions entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire (cible de docking) dont la structure tridimensionnelle est connue et d'une petite molécule (ligand).[68]

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes :

2.1 Le docking

Est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interaction les plus favorables.

2.2 Le scoring

Est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine dans chacun des complexes sélectionnés lors de l'étape précédente.

Cette tâche est accomplie par des outils informatiques nommés fonctions de score. Celles-ci évaluent d'abord les différentes contributions énergétiques (et parfois entropiques) pour la stabilisation du complexe protéine-ligand, et ordonnent ensuite ces complexes, permettant ainsi l'identification des modes d'interaction les plus probables.[69]

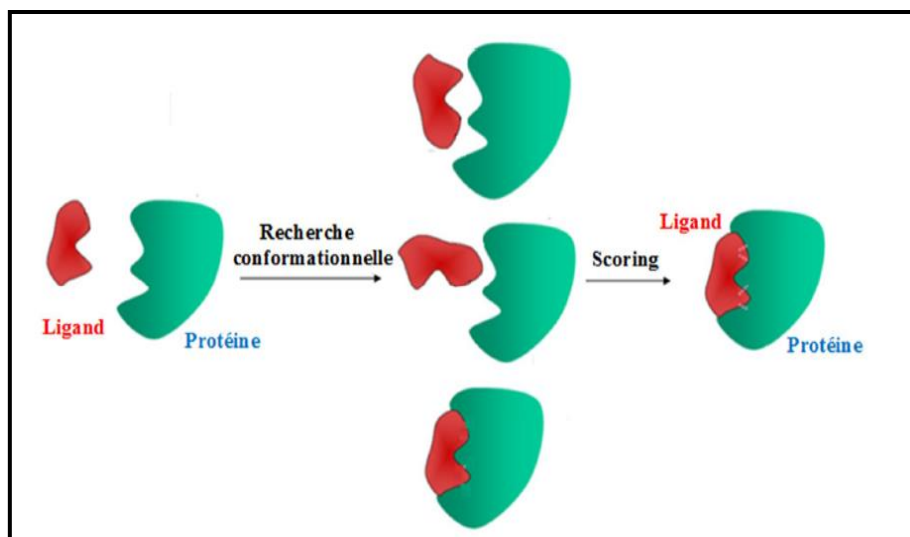


Figure N°12: Représentation schématique des étapes du docking moléculaire.

3 Les outils du docking

Pour mener à bien des études d'arrimage, il est indispensable d'avoir deux structures, un récepteur et un ligand.[70]

3.1 Le récepteur

Les récepteurs sont des macromolécules impliquées dans la signalisation chimique des signaux inter et intracellulaires, ils peuvent être situés sur la membrane de surface cellulaire ou dans le cytoplasme.[71]

La plupart des structures sont extraites de la banque de données des protéines (PDB) c'est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques, elle contient principalement des protéines mais aussi des acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Actuellement elle compte 178451 structures biologiques et est accessible facilement et gratuitement via le site : <https://www.rcsb.org/>. [72]

3.2 Le ligand

Les molécules qui se lient à un récepteur sont appelées ligands. La liaison peut être spécifique et réversible. Un ligand peut activer ou inactiver un récepteur, l'activation peut augmenter ou diminuer une fonction cellulaire particulière. Chaque ligand peut interagir avec plusieurs sous-types de récepteurs.[71]

En arrimage moléculaire, le ligand doit également être sous forme 3D. A ce titre il y a deux grandes sources de structures chimiques des ligands. La première consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer sous différents formats (pdb, mol2, mol...etc) grâce à des programmes de construction moléculaire 3D tels que : ChemDraw, Titan... etc. La seconde consiste à consulter des bases de données de structures chimiques appelées chimiothèques, telles que Pubchem, Zinc, la Chimiothèque Nationale Française...etc.[73]

4 Les types de docking

4.1 Docking rigide

Dans le cas des méthodes de docking rigide, la recherche de la pose optimale se limite au positionnement. Cette opération consiste en la recherche exhaustive dans l'espace discrétisé des 6 degrés de liberté. Certains programmes, s'ils n'appartiennent pas à la famille des techniques de docking rigide, utilisent plusieurs étapes successives d'optimisation dont les premières peuvent s'apparenter à du docking rigide. Par exemple, le programme Glide, utilise initialement, dans son approche multi-étapes, une recherche systématique pour positionner le ligand de façon approchée au sein du site actif de la protéine.[74]

4.2 Docking flexible

Lorsque les méthodes de docking prennent en compte la flexibilité du ligand, deux étapes sont effectuées successivement pendant toute la durée du docking. La première étape correspond à une exploration de l'espace conformationnel de manière à retrouver, parmi les conformations proposées, la conformation bioactive. Pendant la deuxième étape une fonction de score évalue ces conformations. Il existe plusieurs types d'algorithmes pour le traitement de la flexibilité du ligand : les méthodes systématiques (fragmentation/reconstruction), les méthodes aléatoires, et les méthodes de simulation (dynamique moléculaire).[75]

4.3 Docking semi-flexible

Lorsque l'espace conformationnel des ligands est exploré, le nombre de degrés de liberté de l'espace de recherche peut être conséquent dans le cas de molécules très flexibles. Dans un tel contexte, l'emploi de méthodes de recherche exhaustives apparaît souvent inapproprié car nécessitant des simplifications importantes au niveau de l'échantillonnage. D'autres algorithmes, dits de fragmentation, sont employés pour construire de façon incrémentielle le

ligand au sein du site actif de la protéine. L'espace des conformations du ligand est alors restreint au voisinage d'un ensemble initial d'états simplifiés. Cette stratégie de recherche par construction, qui se présente sous diverses variantes, est notamment adoptée par les programmes DOCK, FlexX, et Hammerhead.[74]

5 Les interactions protéines-ligands

La stabilité de ligand au sein du site actif de la protéine est gouvernée par des interactions de nature non covalente. [76]

5.1 La liaison hydrogène

La liaison hydrogène est une force attractive qui s'opère entre deux groupes d'atomes accepteurs et donneurs impliquant un atome d'hydrogène. Le donneur est l'atome d'hydrogène lié de manière covalente à un atome électronégatif, typiquement azote, oxygène, fluor. Tandis que l'accepteur est un autre atome électronégatif, uniquement azote, oxygène ou fluor. Les valeurs des angles et des distances varient respectivement de 90 à 180 degrés et de 1.2 à 4.0 Å. Pour que la liaison hydrogène puisse s'établir il faut que les conditions citées avant soient réalisées.[77][78]

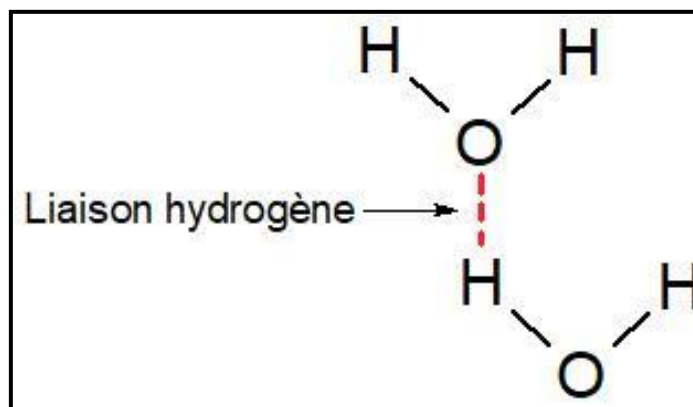


Figure N°13: La liaison hydrogène.[78]

5.2 Interaction ionique

Les liaisons ioniques connues aussi sous le nom de ponts salins résultent d'une force d'attraction électrostatique entre deux atomes de charges opposées, la distance pour une liaison saline doit être inférieure à 4.0 - 4.5 Å et sa force reste très importante pour une interaction non covalente qui peut atteindre 10 Kcal/mol.[79]

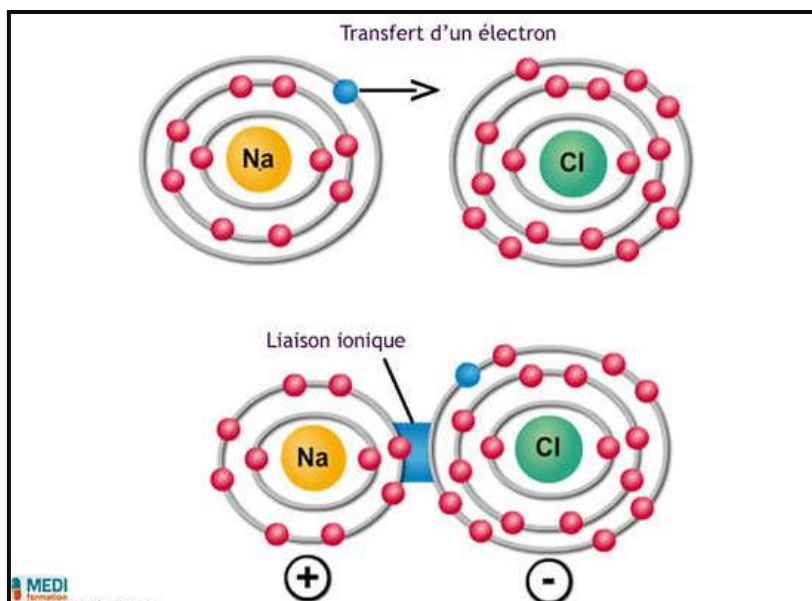


Figure N°14: La liaison ionique.

5.3 Les interactions hydrophobes

Les interactions hydrophobes sont créées par le regroupement des molécules non polaires qui ne sont pas capables de former des liaisons hydrogènes et ne peuvent donc pas s'hydrater, ces molécules possèdent une très faible affinité pour le solvant où elles sont dissoutes (eau). Ce type d'interactions est le plus fréquent dans les études d'interactions protéine-ligand pour augmenter l'affinité du ligand.[79][80]

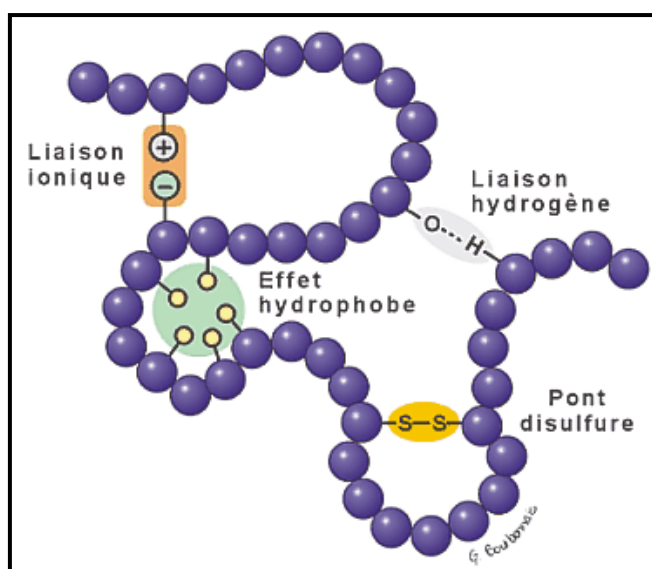


Figure N°15 : Les interactions hydrophobes.

5.4 Les interactions de Van der waals

L'interaction de van der waals est une faible force d'attraction entre des molécules électriquement neutres qui entrent en collision ou passent très près les unes des autres. La force de van der waals est causée par des attractions temporaires entre les régions riches en électrons d'une molécule et les régions pauvres en électrons d'une autre. Ces attractions sont très courantes mais sont beaucoup plus faibles que les liaisons chimiques.[81]

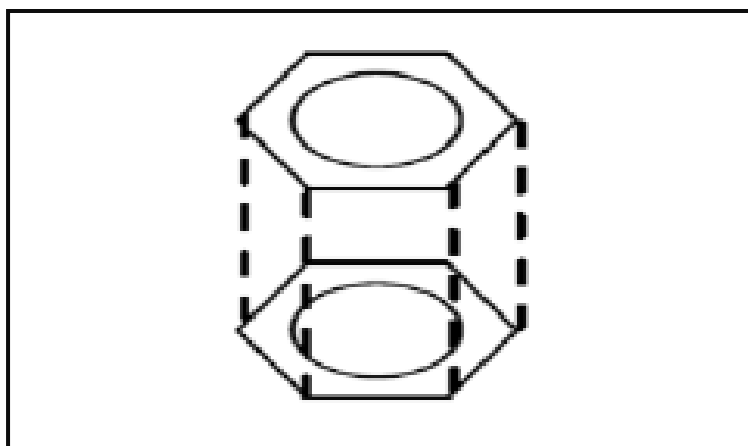


Figure N°16: Les interactions de Van der waals.

6 Les programmes de docking

À l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaire (commerciaux ou non) sont disponibles [6]. Les plus fréquemment cités sont respectivement : AutoDock[82], GOLD[83], FlexX[84], DOCK[85]et ICM[86].

Tableau N°1: Principaux programmes d'amarrage moléculaire.[76]

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

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

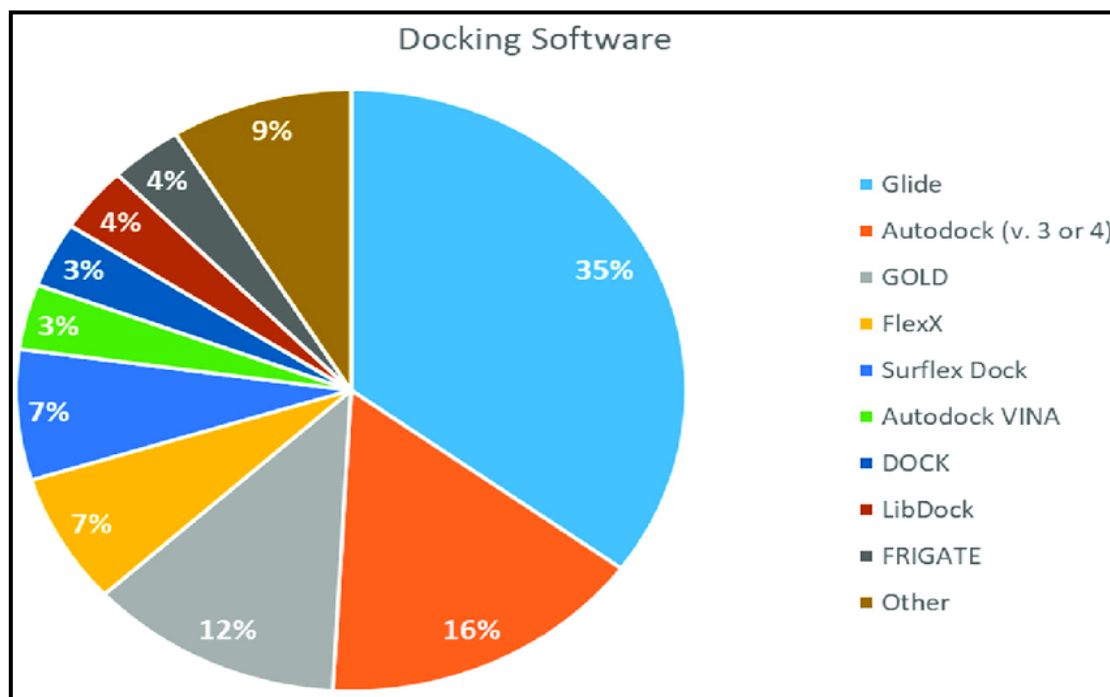


Figure N°17: Utilisation des différents logiciels de docking. [87]

6.1 Surflex

Parmi les programmes de docking moléculaire, nous avons utilisé le programme Surflex pour réaliser le travail de recherche.

Le programme Surflex comprend deux parties. L'une pour des études de similarité tridimensionnelle des molécules, l'autre pour des études de docking. Seule la partie docking est abordée ici. Elle se base sur la construction d'une pseudo-molécule comme cible sur

laquelle aligner le ligand. Il s'agit de fragments de molécules placés dans le site actif de manière à occuper idéalement et de manière redondante celui-ci à partir de critères morphologiques. Il est important de préciser que cette pseudo molécule peut être construite à partir du ligand dans le site, à condition de bénéficier d'une structure, ou bien à partir du récepteur sans aucun ligand : il utilise dans ce cas 3 types de fragments CH₄, C=O et N-H mais il est nécessaire de connaître l'emplacement du site actif.

L'étape de Docking s'effectue suivant deux méthodes :

- La première est une méthode incrémentale dite Hammerhead. Dans ce cas le programme fractionne le ligand et cherche à trouver le meilleur appariement pour chaque fragment, il essaye d'adapter les fragments à ceux de la pseudo-molécule. Les fragments ayant la plus haute affinité sont utilisés pour reconstruire le ligand.
- La deuxième méthode dite "molécule entière" reprend la même étape de fractionnement que précédemment. Le changement se fait au niveau des fragments du ligand conservés. Dans la méthode Hammerhead ne sont conservés pour l'étape de docking que les meilleurs fragments qui s'alignent avec ceux de la pseudo-molécule. Ici tous les fragments sont pris en compte pour la recherche de configuration optimale du ligand.[88]

Partie pratique

Chapitre 4:

Matériels et méthodes

I. Matériels

1 Micro-ordinateurs

Dans notre étude, nous avons utilisé deux micro-ordinateurs présentant les performances suivantes :

- Un 1^{er} PC Acer avec 4 GO de RAM et un processeur intel(R) Core(TM) i3-4005U CPU @ 1.70 GHz 1.70 GHz.
- Un 2^{eme} PC Sony avec 6 GO de RAM, et un processeur intel(R) Core(TM) i5-3230M CPU @ 2.60 GHz 2.60 GHz

La réalisation des calculs de docking moléculaire a nécessité l'utilisation d'un ensemble de programmes informatiques installés sous les deux systèmes d'exploitation Windows 10 et Windows 7. Ainsi, la consultation de plusieurs sites internet et certaines bases et banques de données.

2 Les programmes

Nous avons réalisé notre expérience par docking moléculaire en utilisant les programmes suivants :

2.1 Surfex-dock version 1.3 (2005)

Logiciel principal de docking, est un algorithme de docking rapide capable d'arrimer les ligands dans un environnement constitué d'acides aminés avec une bonne précision. Les paramètres standards de Surfex ont été utilisés par défaut dans cette étude.

Le docking est réalisé en 3 étapes: [89]

- 1- Choix de la manière d'identifier le site actif soit à partir d'un ligand ou du récepteur.
- 2- Construction d'une pseudo-molécule (protomol) qui va servir de cible aux différents ligands.
- 3- Arrimage d'un ou de plusieurs ligands.

2.2 Open Babel version 2.4

Système utilisé pour la conversion des fichiers d'un format à un autre. La conversion concerne tous les types de formats de molécules (pdb, sdf, smiles, mol2...etc).

2.3 Biovia Discovery studio visualizer version 2021

Utilisé pour construire la structure de ligand de référence, l'étude des interactions ligand-protéine et leur présentation en 2D, il donne aussi la distance de ces liaisons avec le nom des acides aminés du site actif. Il a été également utilisé pour réaliser les différentes substitutions.

2.4 MSViewerlite version 4.2

Il a concerné la séparation des complexes et la visualisation de la superposition des ligands de référence et ceux de Surfex pour confirmer les résultats de RMSD.

2.5 Excel Microsoft 2010

Pour tracer la courbe et le coefficient de corrélation linéaire.

3 Banques de données et sites internet

3.1 La PDB (Protein Data Bank)

Est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X, par spectroscopie RMN ou par microscope électronique (EM). [90]

3.2 Serveur ADMETlab

Est un serveur en ligne permettant d'effectuer une évaluation de Druglikeness, une prédiction de ADMET permettant de calculer les propriétés physicochimiques ainsi que les propriétés pharmacocinétiques des composés à partir du format smiles. On peut consulter ce serveur via le lien : <http://admet.scbdd.com/>.

3.3 SARS-CoV-2 Papain-like-Protease Potential Inhibitors Database

Est une base de données sur les inhibiteurs potentiels de la protéase de type papaine SARS-CoV2. À partir de cette base, nous avons choisi notre inhibiteur de référence. Elle est accessible gratuitement via le lien : <https://plpro-inhibitors.cent.uw.edu.pl/>.

3.4 SuissADME

Est un serveur en ligne pour le calcul des propriétés ADMET des molécules, nous avons utilisé ce serveur pour évaluer l'accessibilité à la synthèse et la solubilité des composés.

II. Méthodes

1 Les tests de fiabilité des logiciels

Les performances d'un programme de docking peuvent être jugées au moyen de différents critères : détermination du RMSD suivi d'une analyse visuelle et du coefficient de corrélation.

1.1 Le RMSD (RootMean Square Deviation)

Correspond à la moyenne de la déviation de chacun des atomes d'une position d'un ligand simulée (après docking) par rapport à ceux de la pose de référence du même ligand (obtenue par cristallographie). La norme actuelle pour évaluer les performances d'un programme de docking est de faire un test à partir de plusieurs complexes protéines-ligands cristallisés [91][92]. Ce test a été réalisé sur 100 complexes disponibles au niveau de la PDB. La prédiction est acceptable si la valeur du RMSD ne dépasse pas 2 Å. La liste des complexes protéines-ligands étudiés sera retrouvée dans l'annexe N°1.

Les calculs de RMSD ont été réalisés par le logiciel Surfex par la commande suivante :

```
surfex-dock rms ligand.mol2 final-0.mol2
```

Si le $2 < \text{RMSD} < 3$ on continue avec la commande suivante :

```
surfex-dock oprms ligand.mol2 final-0.mol2
```

1.2 Analyse visuelle

Cette étape est nécessaire pour vérifier la superposition de la position du ligand simulé par docking avec la position de référence.

1.3 Le coefficient de corrélation (r)

Ce test consiste à calculer le coefficient de corrélation linéaire en traçant la droite de régression linéaire entre les affinités des inhibiteurs calculées par Surfex et les valeurs de leur IC50 déterminées expérimentalement dans la littérature par des essais in vitro. Il prend des valeurs situées entre -1 et 1 [93], s'il n'y a pas de relation linéaire entre les deux séries de données, le coefficient de corrélation est très proche de zéro, et on dira que les deux variables ne sont pas corrélées.

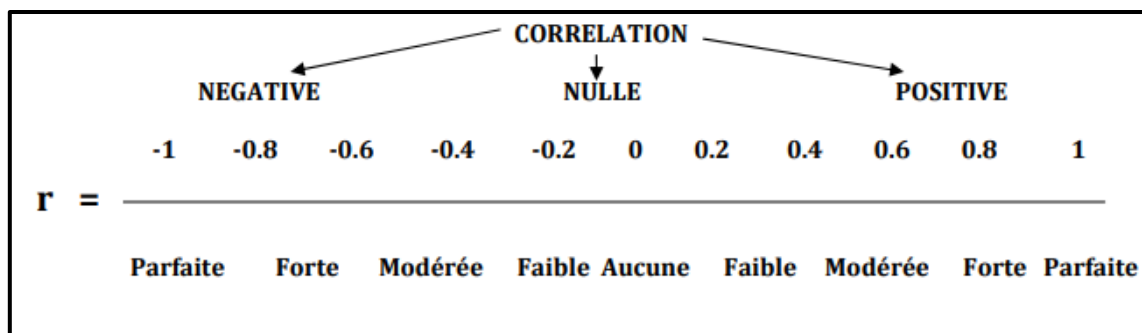


Figure N°18: Les différentes valeurs de r.

Ce test a été réalisé sur 29 complexes téléchargés à partir de PDB, les résultats sont représentés dans le chapitre des résultats et discussion.

2 Préparation des molécules au docking moléculaire

2.1 Le choix de la cible thérapeutique

Notre cible thérapeutique est l'enzyme papain-like-protease (PLpro) dont la structure 3D a été téléchargée sous format pdb via la banque de données Protein Data Bank. Parmi les complexes disponibles nous avons choisi celui portant le code **7JN2**.

2.2 Le choix du complexe 7JN2

Parmi les complexes disponibles nous avons choisi celui portant le code **7JN2** avec une résolution de 1.93 Å, la présence d'un inhibiteur co-cristallisé dans ce complexe donne une idée sur le site actif.

➤ La résolution

La résolution en angström de la protéine est une des données reflétant la qualité des structures ayant permis de construire le modèle cristallographique. Généralement, une résolution proche de 1 Å permet de distinguer tous les atomes y compris les hydrogènes. Une résolution de l'ordre de 6 Å permet seulement de distinguer des structures de types «hélice α » ou «feuille β » par exemple.

Les caractéristiques du complexe 7JN2 sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau N° 2: Les caractéristiques du 7JN2.

Code PDB	Résolution	Nombre de chaînes	Classification	Nombre des AA	Organisme
7JN2	1.93	1(A)	EC: 3.4.22	318	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

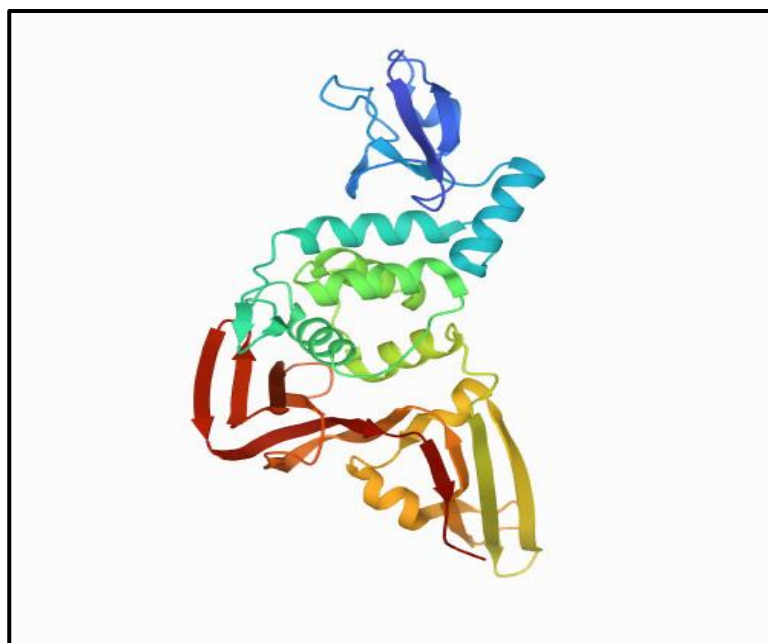


Figure N°19 : La structure tridimensionnelle du complexe 7JN2, générée par la PDB.

2.3 Préparation de la protéine

Nous avons téléchargé le complexe 7JN2 sous format pdb. À l'aide du programme MSViewerlite, nous avons retenu uniquement la chaîne des acides aminés et enregistré sous format pdb après élimination du ligand et des molécules d'eau afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre. Ensuite il faut convertir la molécule en format mol2 par le logiciel openBabel pour le docking via Surflex.

2.4 Préparation de ligand

L'inhibiteur de PLpro a été dessiné et enregistré sous format pdb puis converti au format mol2 pour l'utilisation par Surflex, sur lequel deux types de substitutions ont été effectuées

CHAPITRE 4 MATRIELS ET METHODES

une mono-substitution, puis une bi-substitution à l'aide du programme Biovia Discovery studio visualize, sur ses quatre radicaux R1, R2, R3 et R4.

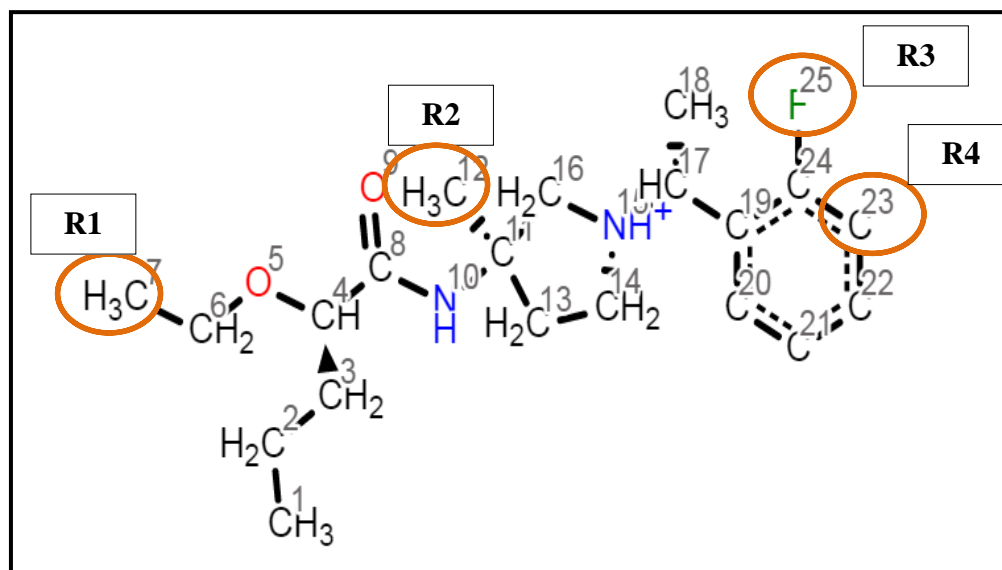


Figure N°20: La structure 2D de l'inhibiteur de référence avec les différents radicaux.

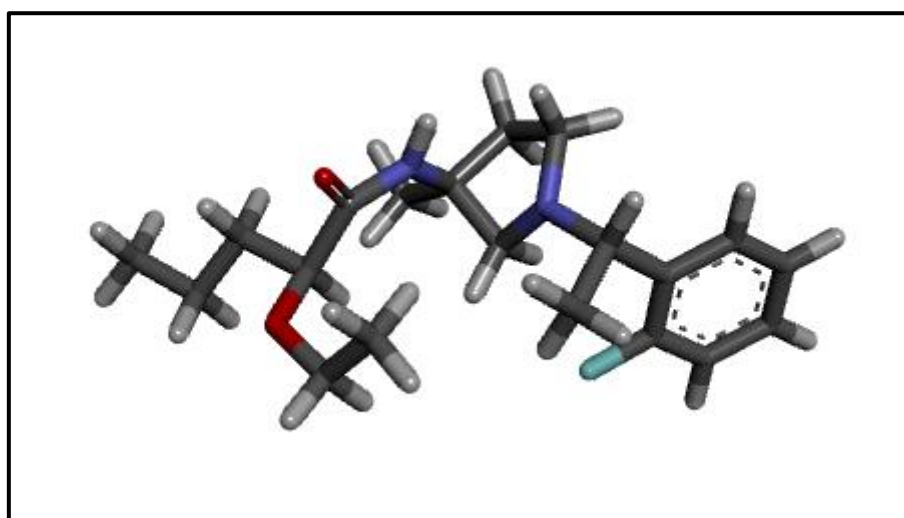


Figure N°21: La structure 3D de l'inhibiteur de référence.

Tableau N°3: Les caractéristiques du ligand de référence.

PM	Donneurs de H	Accepteurs de H	Liaisons rotatives	Log P	Affinité
351.486	2	2	9	2.255	3.92 M ⁻¹

2.5 Réalisation du docking

- L'identification du site actif: l'utilisateur emploie une pseudo-molécule (protomol) comme la cible à laquelle se rallie le ligand dans le site actif d'une protéine. Pour la création du protomol nous avons utilisé la commande suivante :

```
surflex-dock proto ligand.mol2 proteine.mol2 pl
```

- Le docking moléculaire : exige un ligand, un protomol et une protéine sous format mol2. En utilisant la commande :

```
surflex-dock dock ligand.mol2 pl-protomol.mol2 proteine.mol2
```

Le résultat est donné sous la forme des 10 meilleurs « conformères » au format mol2.

- Le calcul de RMSD :

```
surflex-dock rms ligand.mol2 final-0.mol2
```

3 Proposition des nouveaux inhibiteurs théoriques de la PLpro

3.1 Mono-substitution

Sur le ligand de référence nous avons réalisé 64 mono-substitutions par l'ajout des groupements fonctionnels tels que l'hydroxyle, le carboxyle, le thiol...etc, dans 4 positions différentes afin d'améliorer son affinité envers la cible. La substitution sera effectuée à l'aide du programme Biovia Discovery studio visualizer.

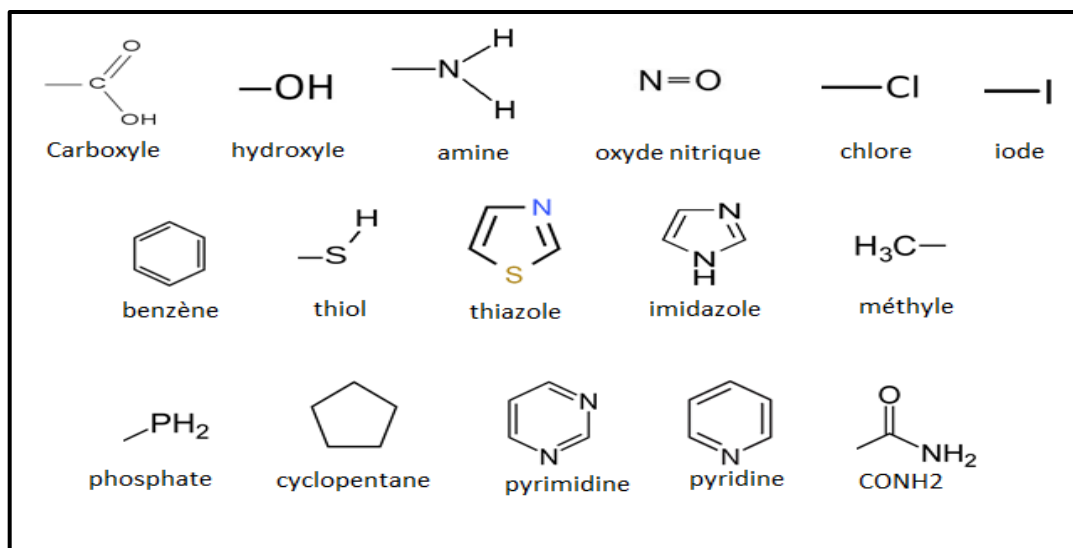


Figure N°22: Les groupements fonctionnels rajoutés lors de la mono-substitution.

3.2 Bi-substitution

Nous avons choisi les deux composés monosubstitués ayant les meilleures affinités pour la bi-substitution, ont ajoutant d'autres groupements chimiques. Nous avons effectué 54 bi-substitutions pour un composé et 21 bi-substitutions pour l'autre.

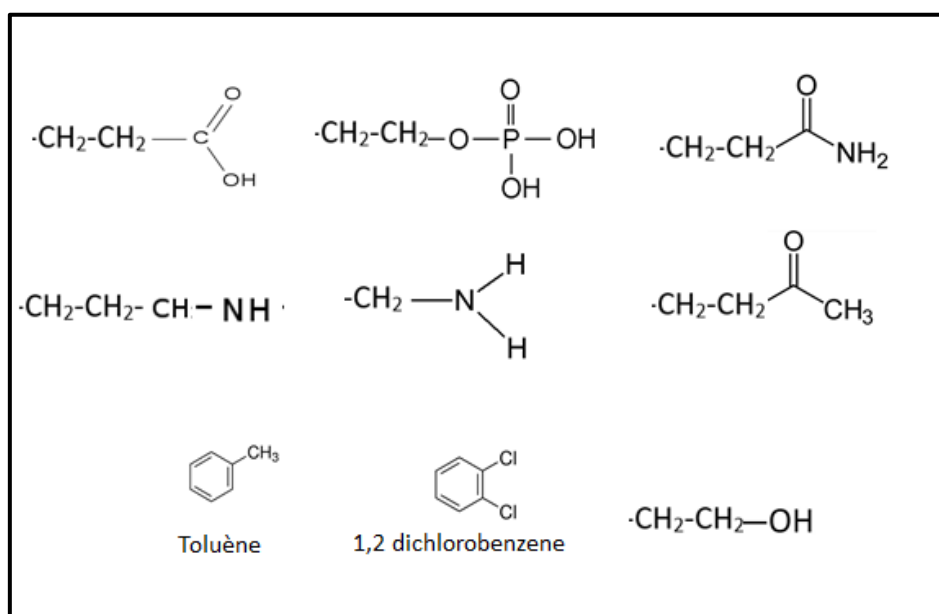


Figure N°23: Les groupements fonctionnels rajoutés lors de la bi-substitution.

4 Filtrage ADMET

L'application du filtre ADME-T dans la conception et le développement du médicament joue un rôle important dans le processus étant donné le nombre important des composés

« lead » et des drogues qui détiennent des propriétés toxiques [94]. Les propriétés des composés peuvent être prédites à l'aide du serveur ADMETlab via le lien : <http://admet.scbdd.com/>.

4.1 Drug-likeness Evaluation

La règle la plus connue rapportant les constitutions chimiques à leurs activités biologiques est la règle de Lipinski, avec d'autres règles comme la règle de Veber, de Ghose, de Varma et Oprea. Le serveur ADMETlab contient le module de prévision de drug-likeness basé sur ces règles.

4.1.1 La règle de Lipinski

En 1997, Lipinski et al, proposent ce qu'on appelle couramment la « règle de Lipinski » ou la « règle de 5 » permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure 2D. Selon cette règle un composé possède toutes les chances d'être absorbé par voie orale s'il respecte au moins 3 des 5 critères suivants : [95]

- Poids moléculaire $M_m \leq 500$.
- LogP (coefficient de partition) ≤ 5 .
- Nombre d'accepteurs de liaisons H ≤ 10 .
- Nombre de donneurs de liaisons H ≤ 5 .
- Nombre de liaisons flexibles ≤ 15 .

➤ Le log P est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. $\log P = \log (C_{oct}/C_{eau})$. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule.

4.1.2 La règle de Veber

Veber a introduit un critère supplémentaire, la surface polaire (TPSA, polar surface area) du composé doit être inférieure à 140 \AA^2 , pour une bonne biodisponibilité par voie orale.[96]

4.1.3 La règle de varma

- Poids moléculaire $M_m \leq 500$.
- TPSA ≤ 125 .
- $-5 < \log D < -2$.
- Nombre d'accepteurs de liaisons H + nombre de donneurs de liaisons H ≤ 9 .
- Nombre de liaisons rotatives ≤ 12 .

4.1.4 La règle de Ghose

- $-0.4 < \log P < 5.6$.
- $160 < M_m < 480$.
- $40 < \text{Réfractivité molaire} < 130$.
- $20 < \text{nombre d'atomes} < 70$.

4.1.5 La règle d'Oprea

- Nombre de liaisons rotatives ≥ 6 .
- Nombre de liaisons rigides ≥ 18 .

4.2 ADMET prediction

Les propriétés d'ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité) des composés principaux ont été calculés utilisant le serveur en ligne ADMETlab. Ce serveur calcule les propriétés pharmacocinétiques comme: l'absorption intestinale (HIA), perméabilité hémato-encéphalique (BBB), l'inhibition de cinq isoformes majeures de cytochromes P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4), la demie-vie ($T_{1/2}$)...etc. Le serveur présente les résultats sous forme d'un chiffre avec une catégorie.

- Catégorie 0 : résultat négatif (pour l'HIA et BBB), non inhibiteur (pour les CYP450).
- Catégorie 1 : résultat positif (pour l'HIA et BBB), inhibiteur (pour les CYP450).

4.3 Les tests de toxicité

Les modèles de prédiction informatique *in silico* offrent un moyen rapide dans le criblage des composés. Ils sont utilisés pour prédire la toxicité des composés afin d'éviter les effets secondaires des candidats médicaments.

Le serveur ADMETlab présente les résultats comme celui-ci :

- Catégorie 0 : résultat négatif.
- Catégorie 1 : résultat positif.

4.3.1 Test d'Ames

Le test d'Ames permet de déterminer le pouvoir mutagène d'une substance en étudiant sa capacité à induire des mutations reverses sur des souches hypersensibilisées de *Salmonella typhimurium*.^[97]

4.3.2 Test d'inhibition de hERG

Le gène hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene) code pour un canal K^+ jouant un rôle central pendant la phase de repolarisation du potentiel d'action cardiaque [98]. La simulation des effets des composés sur le canal hERG offre des informations précieuses pour vérifier les effets secondaires pro arythmiques potentiels.[99]

4.3.3 Test d'hépatotoxicité humaine (H-HT)

Les médicaments pouvant endommagé le foie sont catégorisés comme des agents hépatotoxiques.

4.3.4 SkinSen (Sensibilisation cutanée, LLNA)

Le LLNA repose sur le principe que les sensibilisants induisent une prolifération de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'application de la substance d'essai. Cette prolifération est proportionnelle à la dose appliquée et à la puissance de l'allergène, et permet d'obtenir facilement une mesure quantitative de la sensibilisation.[100]

4.3.5 DL50 (DL50 de toxicité aigüe)

La DL50 est la quantité d'une substance administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai. La DL50 est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une substance.

5 Analyse visuelle des interactions établies entre le ligand et les acides aminés du site actif

À l'aide de biovia Discovery studio visualizer nous avons observé et dénombré les différentes interactions réalisées entre les composés obtenus et les résidus du site actif de l'enzyme PLpro.

Chapitre 5:

Résultats et discussion

1 Introduction

Notre démarche consiste à évaluer, dans un premier temps, la performance de programme de docking moléculaire « Surfex » utilisé dans cette étude dans le but de la découverte de nouveaux inhibiteurs de la PL protéase.

2 Tests de fiabilité de programme de docking « Surfex »

L'étude *in silico* de l'inhibition de l'enzyme papain-like-protease (PLpro) par docking moléculaire nécessite une évaluation de la fiabilité des simulations générées par Surfex par trois tests différents :

- L'écart quadratique moyen ou le RMSD (rootmean square deviation).
- L'analyse visuelle.
- Le coefficient de corrélation linéaire (r).

2.1 Test RMSD

Les performances d'un programme de docking moléculaire sont évaluées par le calcul de la déviation quadratique moyenne ou RMSD entre la position d'un ligand simulée et celle de référence existante dans la PDB. Ce test a été réalisé sur 100 complexes protéine-ligand téléchargés à partir de la PDB. Les résultats sont représentés dans l'annexe N°1.

Les valeurs obtenues sont : 71% des valeurs de RMSD sont inférieures ou égales à 2 Å et 29% dépassent cette valeur norme. Donc le programme surfex simule correctement les interactions Protéine-Ligand. Ce qui est accord avec les résultats de Chikhi A (2007) (RMSD= 88,4 %)[88], de Teniou S (2012) (RMSD=85.5%) [89] et aussi avec les résultats de Boucherit H (2012) (RMSD=66%)[101].

Les résultats sont illustrés dans la figure ci-dessous :

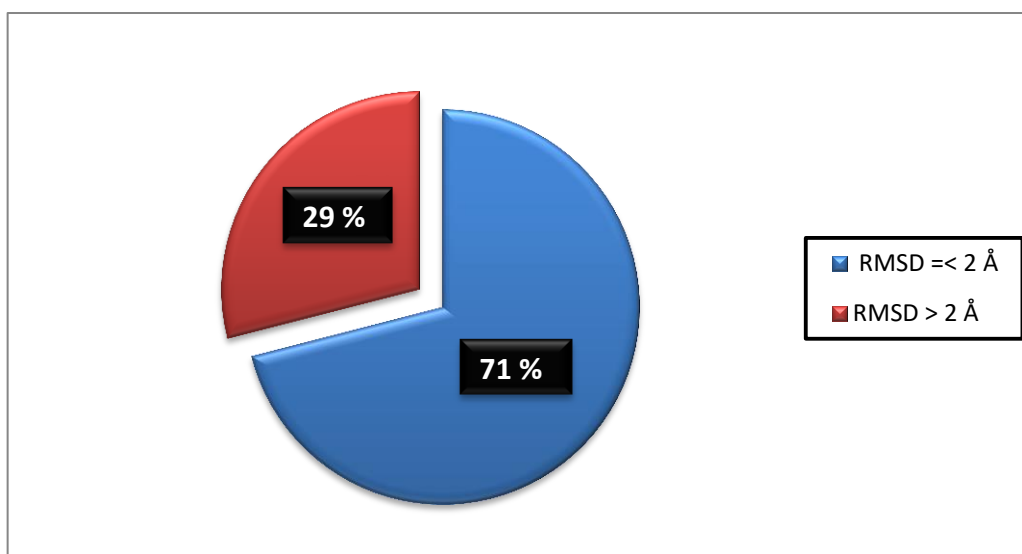


Figure N°24: Résultat en pourcentage du test RMSD.

2.2 Analyse visuelle

L'analyse visuelle est une étape essentielle pour confirmer les résultats du RMSD. Elle permet de déterminer si un ligand simulé se superpose avec le ligand co-cristallisé.

Dans ce contexte, nous avons visualisé spécifiquement trois complexes disponibles dans la PDB : le 1ZVX (le meilleur RMSD), le 2XEY (RMSD intermédiaire), le 1JSV (le mauvais RMSD).

Tableau N°4: Valeurs de RMSD des complexes étudiés.

Complexe	RMSD(Å)	Le ligand
1ZVX	0.772	Coloré en bleu
2XEY	2.212	Coloré en bleu
1JSV	3.254	Coloré en bleu

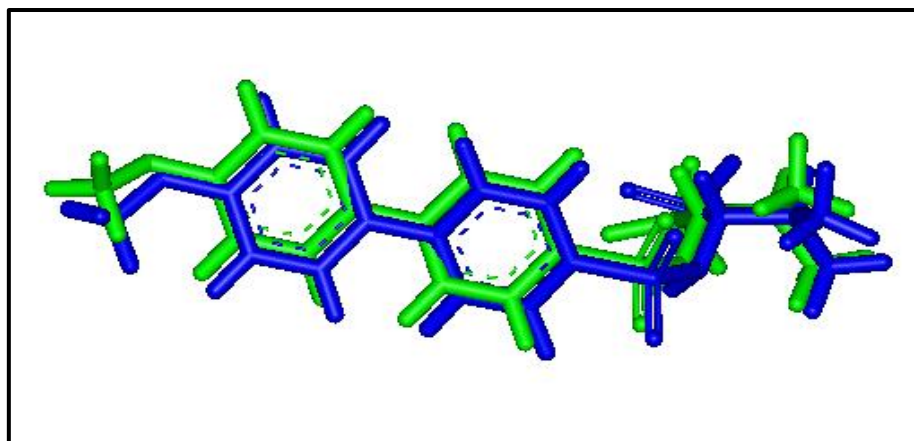


Figure N°25: Superposition de l'inhibiteur de référence et du final-0 calculé par Surflex du complexe 1ZVX (RMSD=0.772Å).

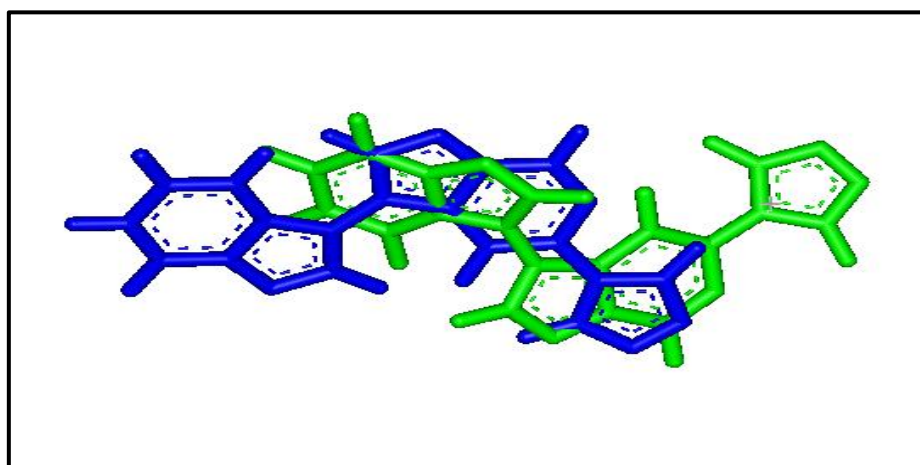


Figure N° 26: Superposition de l'inhibiteur de référence et du final-0 calculé par Surflex du complexe 2XEY (RMSD=2.212Å).

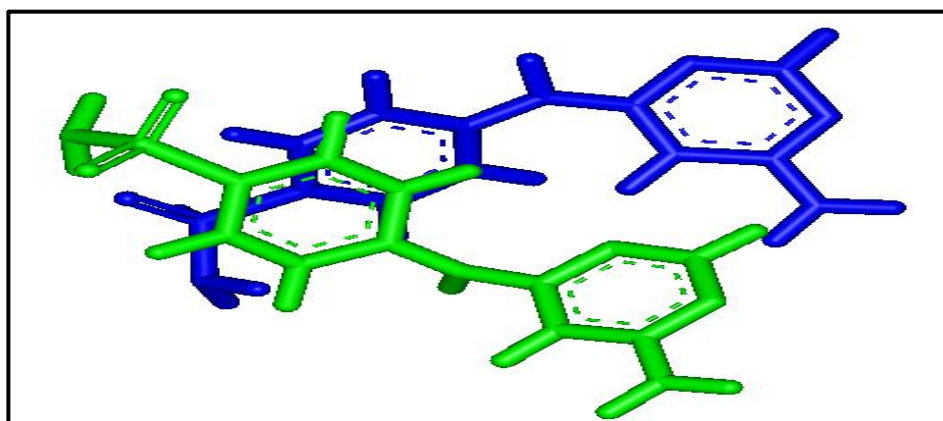


Figure N° 27: Superposition de l'inhibiteur de référence et du final-0 calculé par Surflex du complexe 1JSV (RMSD=3.254Å).

Dans le cas du complexe 1ZVX avec un RMSD égale à 0.772 Å, la visualisation montre que le modèle simulé par le Surflex présente une conformation spatiale parfaitement superposable à celle déterminée expérimentalement par cristallographie qu'on retrouve dans la PDB. Dans le deuxième cas du complexe 2XEY avec un RMSD = 2.212 Å on obtient une différence entre le ligand docké et celui co-cristallisé. Alors que dans le troisième complexe 1JSV (RMSD = 3.254 Å), l'analyse visuelle montre une mauvaise superposition entre les deux ligands.

2.3 Test de corrélation linéaire

Ce test a été réalisé sur 29 complexes (protéines-ligands) différents téléchargés à partir de la PDB.

Dans le tableau ci-dessous nous présentons les valeurs suivantes : IC₅₀ issues de la littérature, les valeurs calculées de log IC₅₀ et les valeurs de final-0 données par Surflex.

Tableau N° 5: Résultats de l'analyse par régression linéaire des 29 complexes.

Composé N°	Code PDB du complexe	IC ₅₀ (nM)	Log IC ₅₀	Final-0 (M ⁻¹)
01	6GIP	40	1.60	8.43
02	5K00	7.09	0.85	13.19
03	2UZB	120	2.07	9.28
04	1IA3	8	0.90	5.48
05	1IA2	23	1.36	5.97
06	2GG5	250	2.39	2.75
07	2UZN	30	1.47	5.04
08	4GL5	112.30	2.05	2.52
09	3FYW	2.9	0.46	7.05
10	1ZVX	1.39	0.14	11.07
11	4DR9	10	1	9.73
12	3QTU	70	1.84	6.91
13	4XE6	19	1.27	5.25
14	3QTX	70	1.84	8.18
15	3QTZ	50	1.69	9.14
16	1M78	52	1.71	5.31
17	2BPM	2	0.30	11.22
18	3MPT	251	2.39	5.58
19	6ND7	181	2.25	4.94

20	6MDB	64	1.8	9.91
21	3S7M	10	1	7.17
22	3RK9	520	2.71	5.17
23	3RPV	70	1.84	5.92
24	3NZB	35	1.54	7.13
25	3PKA	540	2.73	3.41
26	2GG3	580	2.76	5.3
27	3PKB	620	2.79	3.5
28	2GG5	250	2.39	4.56
29	2Q93	560	2.74	2.2

Les résultats obtenus sont représentés par une courbe de corrélation linéaire entre les log IC50 des 29 complexes et leurs affinités en utilisant le programme « Excel».

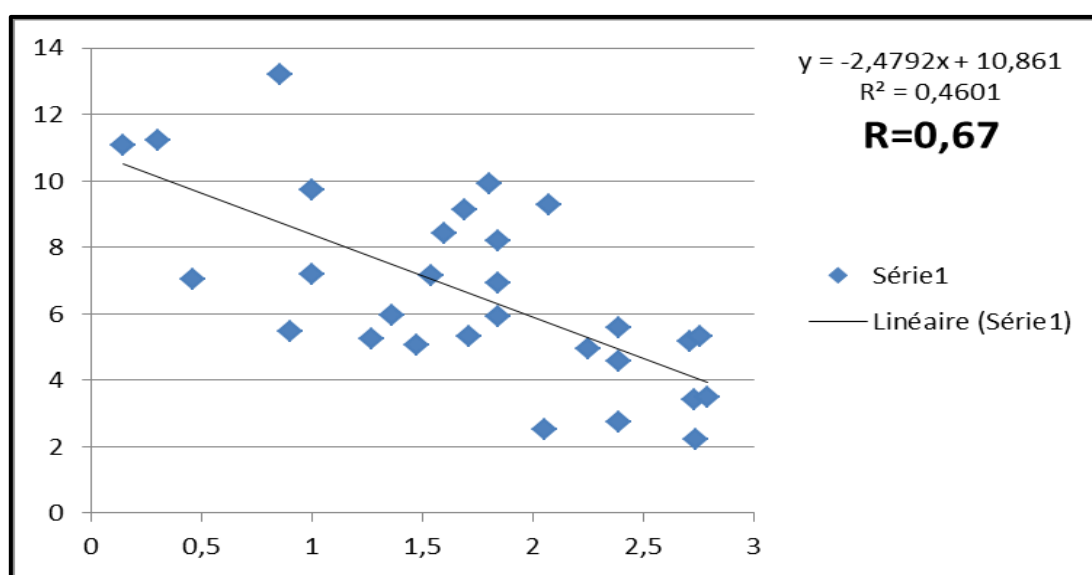


Figure N° 28: Courbe de corrélation linéaire entre log IC50 des 29 complexes et leurs affinités.

L'analyse par corrélation linéaire réalisée entre les affinités et les IC50 (Log IC50) déterminés expérimentalement des complexes étudiés donne un nuage de points avec un coefficient de corrélation égal à 0.67. La corrélation négative témoignant que ces deux variables évoluent dans le sens opposé. Donc le programme Surflext est performant (un coefficient de corrélation nettement supérieur à 0.5), ce qui est en accord avec les résultats de Boucherit H (2012) avec $r = 76$. [101]

2.4 Conclusion

Nous pouvons conclure à partir des résultats obtenus par les trois tests de fiabilité :

RMSD, analyse visuelle et la corrélation linéaire que le programme Surflex est suffisamment performant et qu'on peut l'utiliser sans trop de risque d'erreurs dans nos travaux de docking moléculaire, afin de générer d'autres inhibiteurs de notre cible PLpro.

3 Proposition des nouveaux inhibiteurs

3.1 Le choix du complexe 7JN2

Parmi les complexes disponibles dans la PDB nous avons choisi celui portant le code **7JN2** avec une résolution de 1.93Å et un inhibiteur co-cristallisé dans le site actif.

3.2 Le choix de l'inhibiteur de référence

Nous avons consulté une base de données sur les inhibiteurs potentiels de la protéase de type papaine SARS-CoV2. Nous avons choisi notre inhibiteur « (3R)-3-((S)-2-ethoxypentanamido)-1-(1-(2-fluorophenyl)ethyl)-3-methylpyrrolidinium » par la dépendance de :

- ✓ L'énergie de liaison avec la PLpro (= -24,96 kcal/mol), avec un IC50 (=370.5 nM).

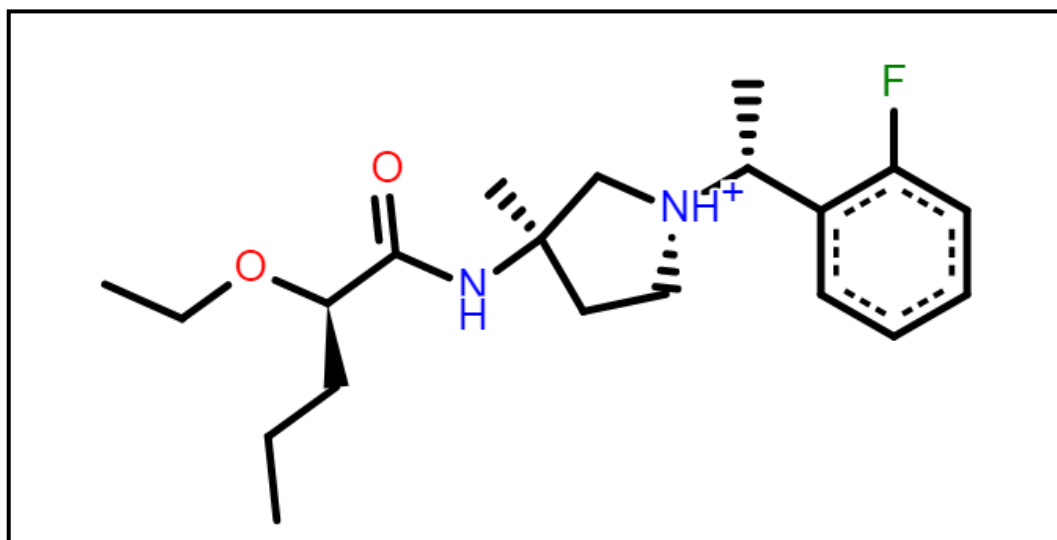


Figure N° 29: La structure de l'inhibiteur de référence.

3.3 Substitution de l'inhibiteur de référence

Pour développer de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme PL protéase nous avons effectué des mono-substitutions et des bi-substitutions en introduisant des modifications dans la structure de l'inhibiteur de référence dont l'affinité est de 3.92 M^{-1} afin d'obtenir des composés présentant des affinités supérieures.

3.3.1 Mono-substitution

Nous avons testé 64 composés monosubstitués par différentes fonctions chimiques telles que : l'amine (NH_2), le carboxyle (COOH), l'hydroxyle (OH)...etc, rajouté aux différentes positions (04 positions) du l'inhibiteur de référence.

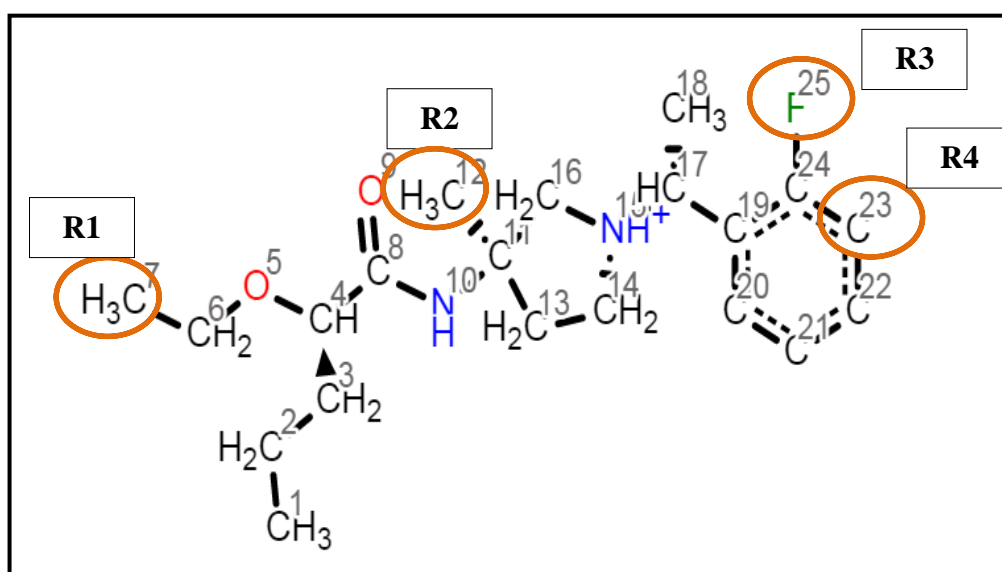


Figure N° 30: Représentation des radicaux R1, R2, R3 et R4 dans la structure de l'inhibiteur de référence.

Le docking moléculaire a été effectué par le programme « Surflex ». Les fonctions rajoutées ainsi que les affinités de chaque composé monosubstitué sont représentées dans le tableau ci-dessous:

Tableau N° 6: Les fonctions et les affinités des composés monosubstitués.

Composé mono-substitué	R1	R2	R3	R4	Final-0 (M^{-1})
M1	OH				1.91
M2		OH			-1.90
M3			OH		2.35
M4				OH	1.39

M5	COOH				1.36
M6		COOH			2.65
M7			COOH		5.18
M8				COOH	2.35
M9	CH3				/
M10		CH3			/
M11			CH3		3.67
M12				CH3	2.19
M13	NH2				2.68
M14		NH2			1.63
M15			NH2		3.07
M16				NH2	2.85
M17	NO				1.45
M18		NO			-2.76
M19			NO		3.14
M20				NO	1.13
M21	SH				1.43
M22		SH			-0.83
M23			SH		1.01
M24				SH	-0.12
M25	PH2				3.07
M26		PH2			0.11
M27			PH2		1.41
M28				PH2	2.65
M29	I				1.47
M30		I			-0.03
M31			I		1.57
M32				I	2.10
M33	CL				1.44
M34		CL			-0.91
M35			CL		1.59
M36				CL	2.66
M37	Benzène				2.82
M38		Benzène			-0.18
M39			Benzène		2.19
M40				benzène	0.41
M41	Cyclopentane				3.37
M42		Cyclopentane			2.88
M43			Cyclopentane		1.89

M44				Cyclopentane	1.13
M45	Pyridine				-0.11
M46		Pyridine			2.05
M47			Pyridine		2.12
M48				Pyridine	0.10
M49	Pyrimidine				3.55
M50		Pyrimidine			2.38
M51			Pyrimidine		4.97
M52				Pyrimidine	0.45
M53	Thiazole				1.91
M54		thiazole			4.84
M55			Thiazole		4.79
M56				thiazole	0.00
M57	Imidazole				2.16
M58		Imidazole			2.21
M59			Imidazole		3.29
M60				Imidazole	1.33
M61	CONH2				3.35
M62		CONH2			3.18
M63			CONH2		-0.14
M64				CONH2	0.98

Après le docking moléculaire des 64 composés issus de la mono-substitution seuls quatre composés présentent des affinités supérieures à celle de l'inhibiteur de référence ($\text{final-0} = 3.92\text{M}^{-1}$), les deux meilleurs étant le composé **M7** et le composé **M51**.

- Dans le cas du **M7** le remplacement du R3 (l'atome F) par la fonction COOH dans la structure de référence donne la meilleure affinité ($\text{final-0} = 5.18\text{M}^{-1}$).
- Pour le **M51** le remplacement du R3 (l'atome F) par la pyrimidine donne un $\text{final-0} = 4.97 \text{M}^{-1}$.

3.3.2 Bi-substitution

Nous avons réalisé des bi-substitutions sur les deux meilleurs composés monosubstitués : **M7** ($\text{final-0} = 5.18 \text{M}^{-1}$) et **M51** ($\text{final-0} = 4.97 \text{M}^{-1}$) pour améliorer leurs affinités envers la cible PLpro, au niveau desquels nous avons introduit des groupements fonctionnels dans plusieurs positions.

3.3.2.1 Le composé M7

Nous avons effectué 54 modifications dans la structure de **M7** par le remplacement des trois radicaux R1, R2 et R4 présents dans la figure N°32 par différentes fonctions chimiques telles que : l'amine (NH₂), le carboxyle (COOH)...etc.

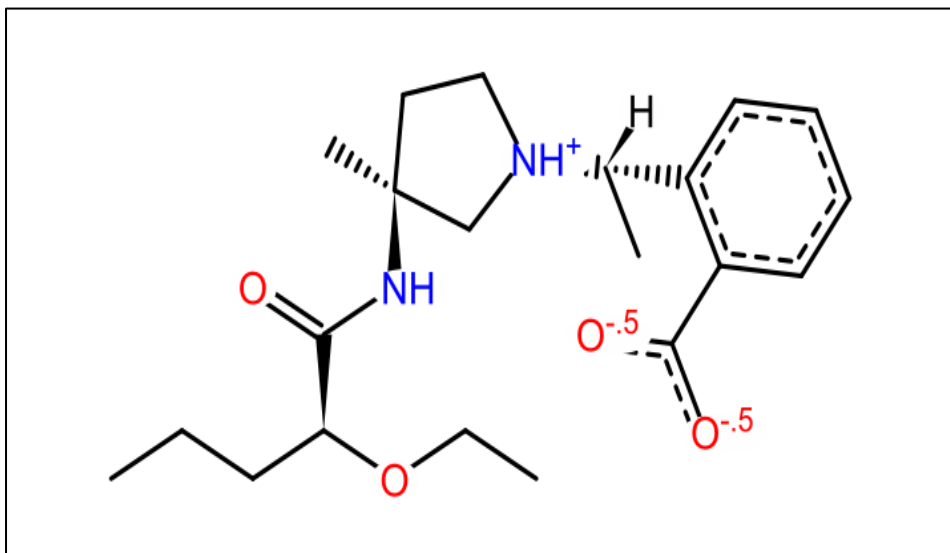


Figure N° 31: Structure de composé monosubstitué M7.

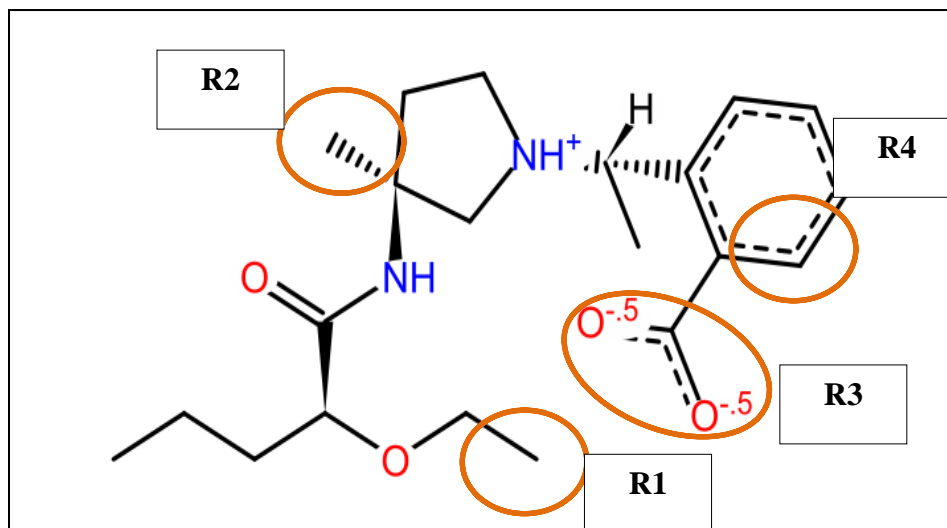


Figure N° 32: Représentation des radicaux R1, R2, R3 et R4 dans la structure du composé monosubstitué M7.

CHAPITRE 5 RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de la bi-substitution du composé **M7** sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 7: Les fonctions et les affinités des composés bi-substitués de **M7**.

Composé bi-substitué	R1	R2	R3	R4	Final-0 (M ⁻¹)
B1	OH		COOH		3.59
B2		OH	COOH		3.97
B3			COOH	OH	1.99
B4	COOH		COOH		1.76
B5		COOH	COOH		4.54
B6			COOH	COOH	3.65
B7	CH3		COOH		/
B8		CH3	COOH		/
B9			COOH	CH3	2.70
B10	NH2		COOH		3.92
B11		NH2	COOH		5.74
B12			COOH	NH2	1.85
B13	NO		COOH		3.93
B14		NO	COOH		3.03
B15			COOH	NO	3.38
B16	SH		COOH		2.17
B17		SH	COOH		4.87
B18			COOH	SH	1.81
B19	PH2		COOH		1.84
B20		PH2	COOH		2.83
B21			COOH	PH2	2.81
B22	I		COOH		4.75
B23		I	COOH		2.63
B24			COOH	I	-0.05
B25	CL		COOH		1.38
B26		CL	COOH		1.17
B27			COOH	CL	1.97
B28	Benzène		COOH		2.21
B29		Benzène	COOH		2.04
B30			COOH	Benzène	4.65
B31	Cyclopentane		COOH		1.72
B32		Cyclopentane	COOH		4.07
B33			COOH	Cyclopentane	3.66

B34	Pyridine		COOH		4.03
B35		Pyridine	COOH		2.26
B36			COOH	Pyridine	0.25
B37	Pyrimidine		COOH		2.42
B38		Pyrimidine	COOH		5.45
B39			COOH	Pyrimidine	1.08
B40	Thiazole		COOH		2.44
B41		thiazole	COOH		4.78
B42			COOH	Thiazole	0.90
B43	Imidazole		COOH		3.03
B44		Imidazole	COOH		2.14
B45			COOH	Imidazole	2.88
B46	CONH2		COOH		3.69
B47		CONH2	COOH		4.09
B48			COOH	CONH2	3.05
B49	Toluène		COOH		0.76
B50		toluène	COOH		0.69
B51			COOH	Toluène	0.92
B52	1,2 dichlorobenzène		COOH		1.84
B53		1,2 dichlorobenzène	COOH		-0.01
B54			COOH	1,2 dichlorobenzène	0.73

Après la bi-substitution on a obtenu deux composés bi-substitués possédant des affinités supérieures à celle du composé monosubstitué M7 (final-0 = $5.18M^{-1}$).

- Dans le cas du **B11**, le remplacement du radical R2 par le groupement NH2 a donné la meilleure affinité ($5.74M^{-1}$).

3.3.2.2 Le composé M51

Nous avons effectué 21 modifications dans la structure du **M51** par le remplacement des trois radicaux R1, R2 et R4 par différents groupements chimiques tels que : $(CH_2)_2CONH_2$, $(CH_2)_2COOH$...etc.

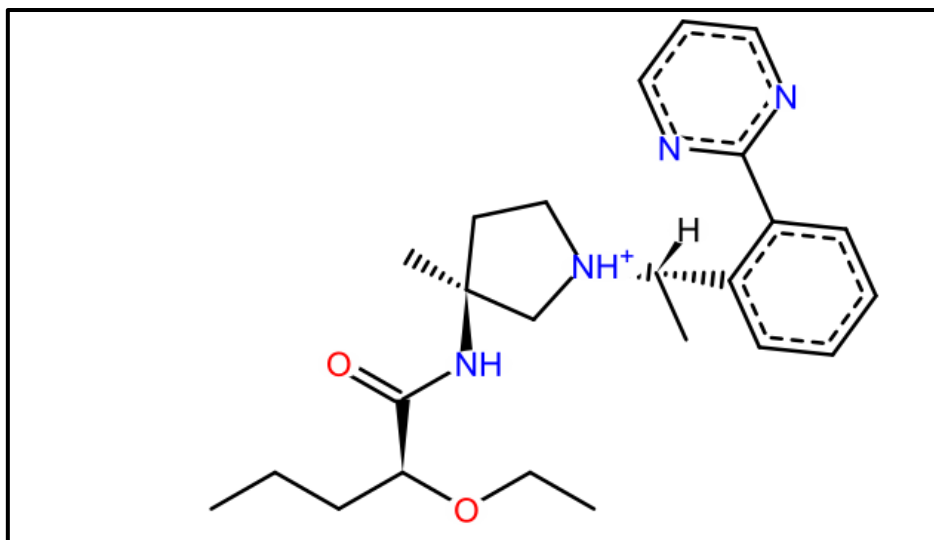


Figure N° 33: Structure de composé monosubstitué M51.

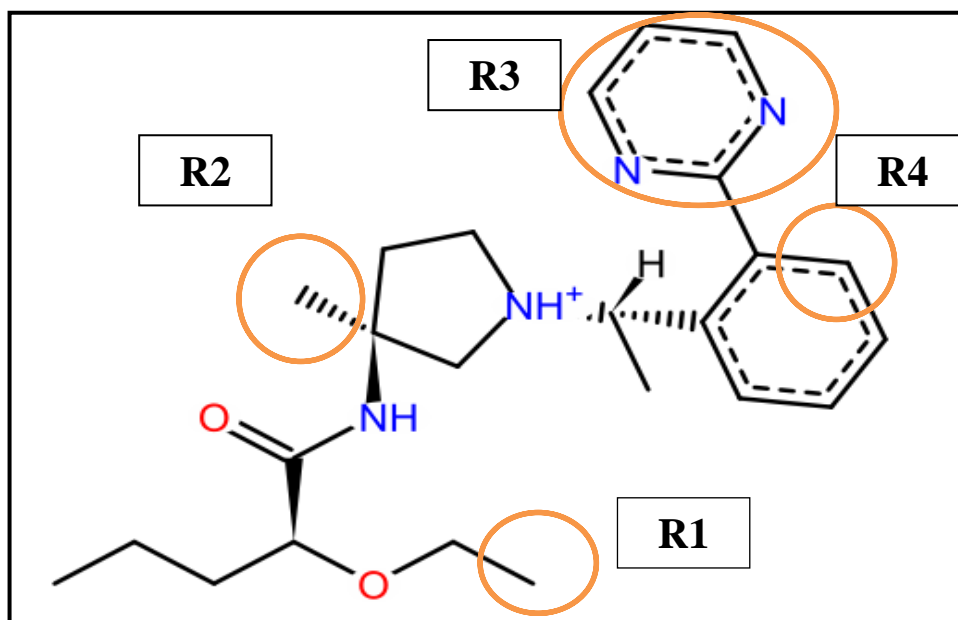


Figure N° 34: Représentation des radicaux R1, R2, R3 et R4 dans la structure du composé monosubstitué M51.

Les résultats de la bi-substitution du composé **M51** sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 8: Les fonctions et les affinités des composés bi-substitués de M51.

Composé bi-substitué	R1	R2	R3	R4	Final-0 (M ⁻¹)
B'1	(CH ₂) ₂ CONH ₂		pyrimidine		3.65
B'2		(CH ₂) ₂ CONH ₂	pyrimidine		2.74

B'3			pyrimidine	(CH ₂) ₂ CONH ₂	3.21
B'4	(CH ₂) ₂ COOH		pyrimidine		7.17
B'5		(CH ₂) ₂ COOH	pyrimidine		3.94
B'6			pyrimidine	(CH ₂) ₂ COOH	1.59
B'7	(CH ₂) ₂ COCH ₃		pyrimidine		4.58
B'8		(CH ₂) ₂ COCH ₃	pyrimidine		5.54
B'9			pyrimidine	(CH ₂) ₂ COCH ₃	2.52
B'10	(CH ₂)NH ₂		pyrimidine		3.77
B'11		(CH ₂)NH ₂	pyrimidine		2.81
B'12			pyrimidine	(CH ₂)NH ₂	2.28
B'13	CH ₂ phosphoryl		pyrimidine		5.11
B'14		CH ₂ phosphoryl	pyrimidine		3.04
B'15			pyrimidine	CH ₂ phosphoryl	4.65
B'16	(CH ₂) ₂ CHNH		pyrimidine		4.98
B'17		(CH ₂) ₂ CHNH	pyrimidine		4.35
B'18			pyrimidine	(CH ₂) ₂ CHNH	3.33
B'19	(CH ₂) ₂ OH		pyrimidine		4.34
B'20		(CH ₂) ₂ OH	pyrimidine		3.72
B'21			pyrimidine	(CH ₂) ₂ OH	1.11

À partir de la bi-substitution du composé M51 on a obtenu un composé bi-substitué possédant une affinité de $7.17M^{-1}$, celle du composé **B'4** issu du remplacement du radical R1 par le groupement (CH₂)₂-COOH.

3.4 Etude des interactions

3.4.1 Le ligand de référence

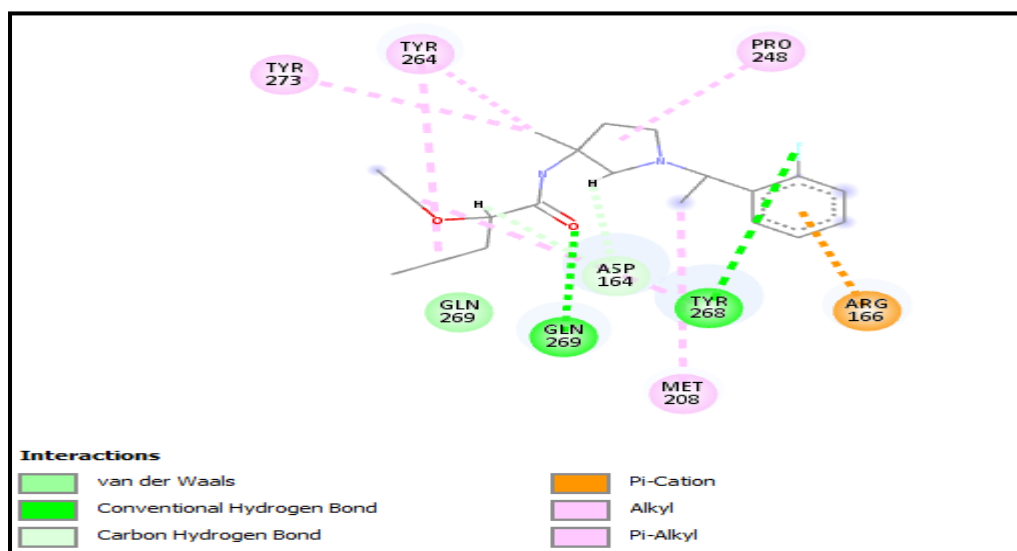


Figure N° 35: La présentation des interactions du ligand de référence avec le site actif de la PLpro en schéma 2D.

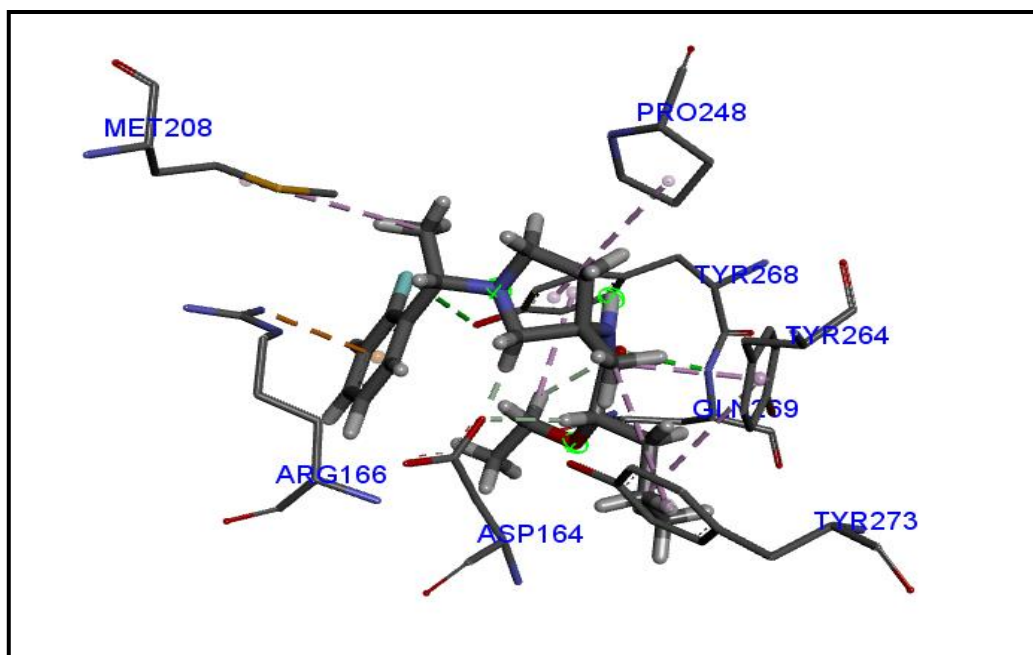


Figure N° 36: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du ligand de référence avec le site actif de PLpro.

La visualisation des interactions montre que le ligand de référence établit deux liaisons de type Conventional Hydrogen Bond avec deux autres liaisons de type Carbon Hydrogen Bond et des liaisons hydrophobiques :

- Une interaction de type Pi-Cation qui s'établit entre le benzène et l'amine de l'acide aminé ARG166.
- Quatre interactions de type Pi-Alkyl.
- Deux interactions de type Alkyl.

Tableau N° 9: Les liaisons établies par le ligand de référence avec le site actif de PLpro.

Liaison	Interaction	Types	Distance
1	F(N°10).....OH(N°2097) du TYR268	Conventional Hydrogen Bond	3.461622
2	O(N°37).....N(N°2098) de l'AA GLN269	Conventional Hydrogen Bond	2.481171
3	Cycle pyrrolidine.....pyrrolidine-2-carbaldehyde de l'AAPRO248.	Alkyl	4.685598
4	C(N°15).....l'AA MET208	Alkyl	5.307134
5	C(N°29).....méthyl phénol duTYR264	Pi-Alkyl	4.931983
6	C(N°43)..... méthyl phénol duTYR268	Pi-Alkyl	4.423323
7	C(N°29).....méthyl phénol duTYR264	Pi-Alkyl	3.422043
8	C(N°50).....méthyl phénol du TYR273	Pi-Alkyl	4.939028
9	Benzène.....NH2(N°1302) du ARG166	Pi-Cation	3.442380

10	H(N°40).....O(N°1284) de l'AA ASP164	Carbon Hydrogen Bond	1.865540
11	H(N°22).....O(N°1284) de l'AA ASP164	Carbon Hydrogen Bond	2.505797

3.4.2 Composé M7

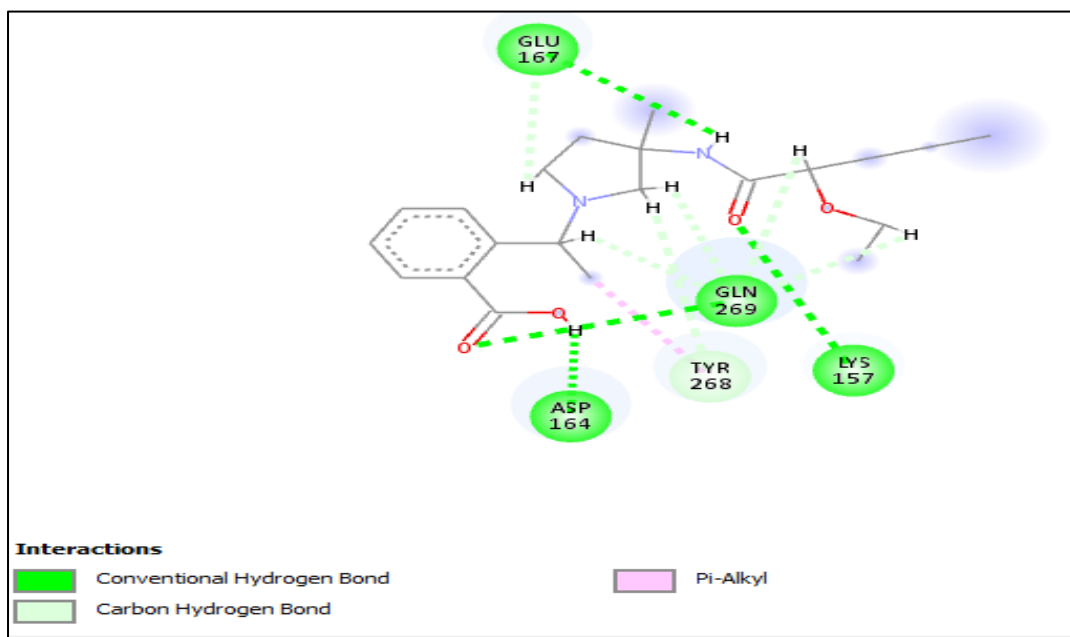


Figure N°37: La présentation des interactions du composé monosubstitué **M7** avec le site actif de la PLpro en schéma 2D.

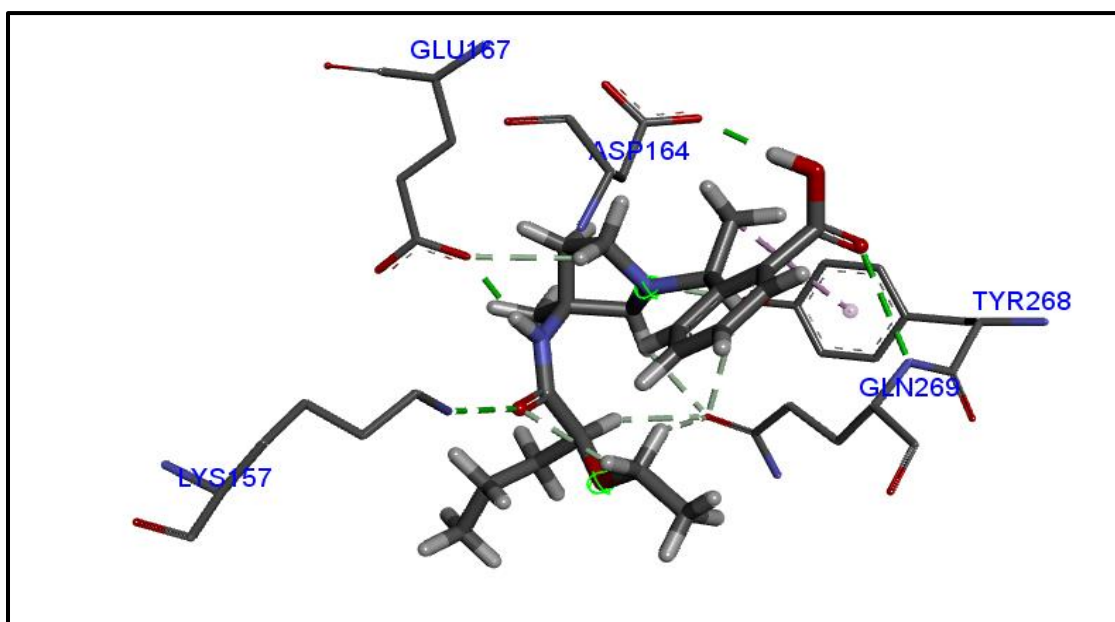


Figure N° 38: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué **M7** avec le site actif de la PLpro.

L'analyse visuelle des interactions montre que le remplacement de l'atome F au niveau du radical R3 par un groupement carboxyle a augmenté l'affinité du composé **M7** à 5.18 M^{-1} et permis la formation de trois nouvelles liaisons de type Conventional Hydrogen Bond par rapport au ligand de référence, ainsi que d'autres liaisons de type Carbon Hydrogen Bond et une liaison hydrophobique de type Pi-Alkyl.

Tableau N° 10: Les liaisons établies par le composé **M7** avec le site actif de la PLpro.

Liaison	Interaction	Types	Distance
1	O(N°36).....N(N°1237) du LYS157	Conventional Hydrogen Bond	2.546516
2	H(N°31).....O(N°1310) du GLU167	Conventional Hydrogen Bond	1.905330
3	H(N°59).....O(N°1284) du ASP164	Conventional Hydrogen Bond	1.940368
4	O(N°97).....N(N°2098) du GLN269	Conventional Hydrogen Bond	2.963171
5	C(N°14).....méthyl phénol duTYR268	Pi-Alkyl	4.269195
6	H(N°18).....O(N°1310) du GLU167	Carbon Hydrogen Bond	2.576803
7	H(N°21).....O(N°2105) duGLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.344459
8	H(N°10).....O(N°2105) du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.890999
9	H(N°3).....O(N°2105) du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.252539
10	H(N°43).....O(N°2105) du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.252597
11	H(N°22).....O(N°2097) du TYR268	Carbon Hydrogen Bond	2.639720

3.4.3 Composé M51

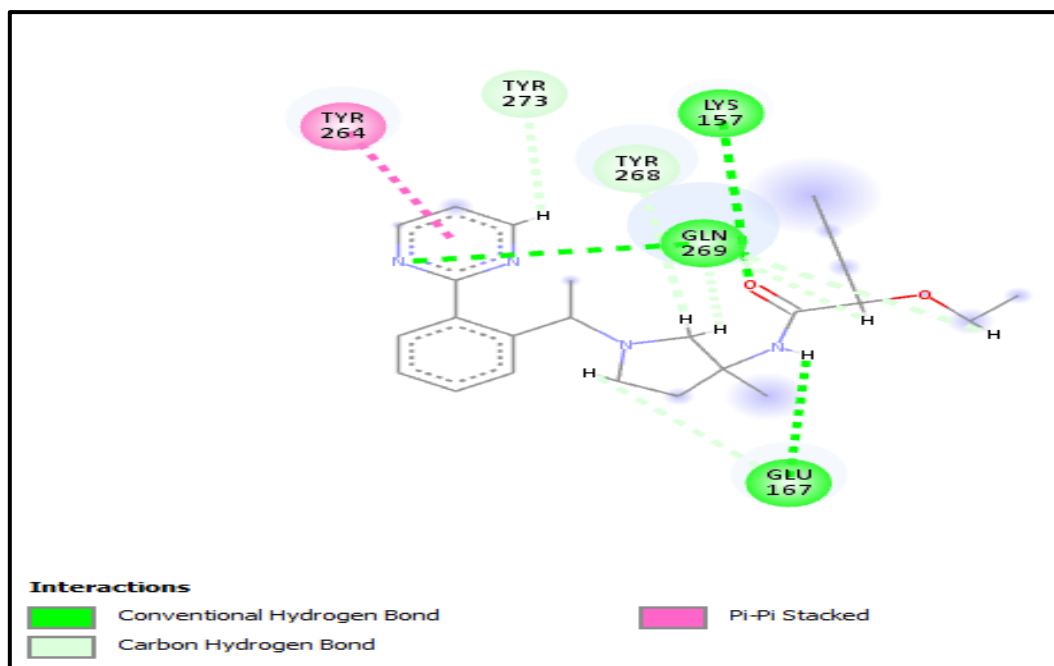


Figure N°39: La présentation des interactions du composé monosubstitué **M51** avec le site actif de PLpro en schéma 2D.

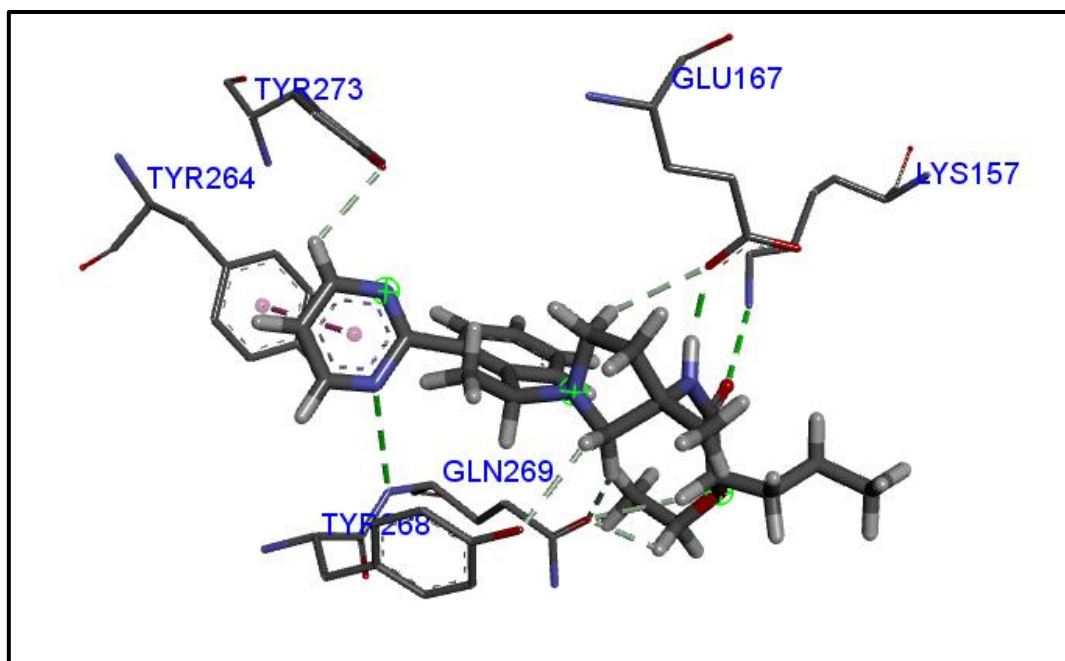


Figure N°40: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué **M51** avec le site actif de PLpro.

L'analyse visuelle des interactions du composé **M51** révèle l'apparition de deux nouvelles liaisons de type Conventional Hydrogen Bond, avec d'autres liaisons de type Carbon Hydrogen Bond et une liaison hydrophobique de type Pi-PiStacked qui s'établit entre le cycle pyrimidine et le noyau aromatique de l'acide aminé TYR264.

Tableau N° 11: Les liaisons établies par le composé **M51** avec le site actif de PLpro.

Liaison	Interaction	Types	Distance
1	O (N° 36)...N (N°1237) de l'AA LYS157	Conventional Hydrogen Bond	2.649544
2	H (N°31)...O (N°1310) de l'AA GLU167	Conventional Hydrogen Bond	1.947681
3	N (N°57)...N(N°2098) de l'AA GLN269	Conventional Hydrogen Bond	3.181575
4	Pyrimidine.....méthyl phénol du TYR264	Pi-PiStacked	3.401451
5	H(N°18)...O (N°1310) de l'AA GLU167	Carbon Hydrogen Bond	2.609213
6	H(N°63).....OH (N°2138) du TYR273	Carbon Hydrogen Bond	2.512755
7	H(N°22).....OH(N°2097) du TYR268	Carbon Hydrogen Bond	2.514432
8	H(N°2).....O (N°2105) de l'AA GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.263485
9	H (N°39)...O (N°2105) de l'AA GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.437964
10	H (N°42)....O(N°2105)de l'AA GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.190495

3.4.4 Composé B11

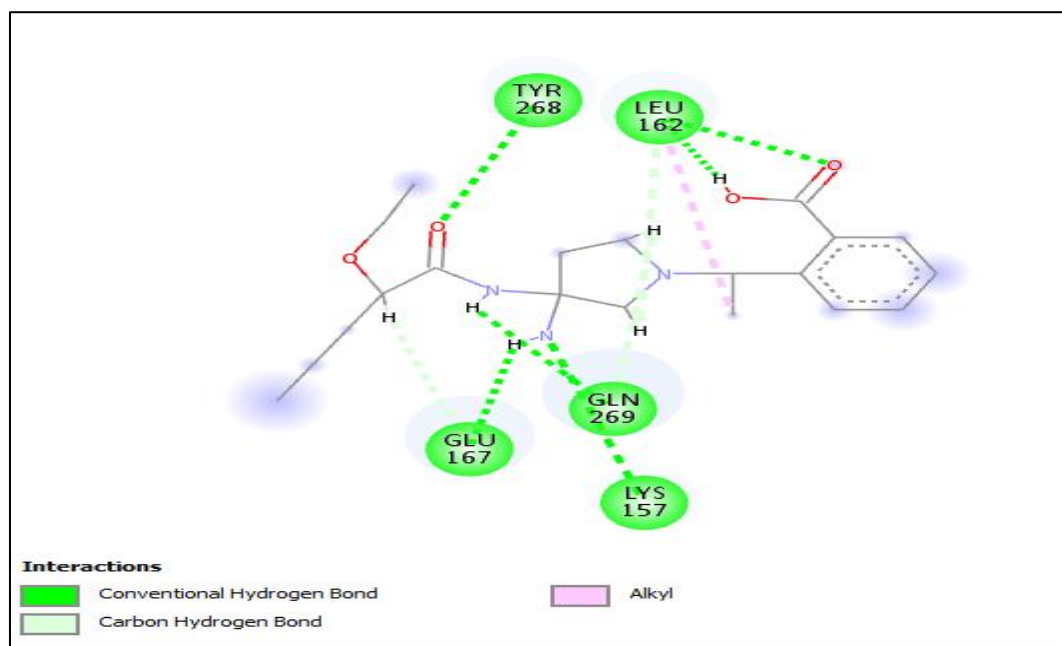


Figure N°41: La présentation des interactions du composé bi-substitué B11 avec le site actif du PLpro en schéma 2D.

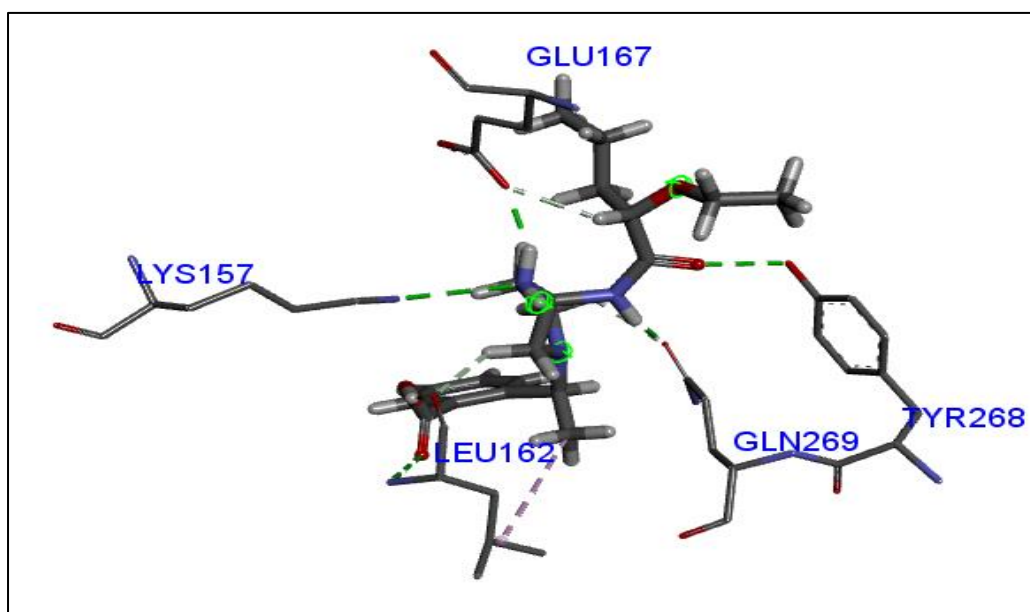


Figure N°42: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé bi-substitué **B11** avec le site actif de PLpro.

L'analyse visuelle des interactions montre que le remplacement du radical R2 par l'amine NH₂ dans la structure du composé M7, forme cinq nouvelles liaisons de type Conventional Hydrogen Bond par rapport au ligand de référence, avec trois liaisons de type Carbon Hydrogen Bond et une liaison hydrophobique de type Alkyl.

Tableau N° 12: Les liaisons établies par le composé **B11** avec le site actif de PLpro.

Liaison	Interaction	Types	Distance
1	O(N°32).....OH(N°2097) du TYR268	Conventional Hydrogen Bond	2.792788
2	O(N°53).....N (N°1265) du LEU162	Conventional Hydrogen Bond	3.137933
3	H(N°55).....O(N°1268) du LEU162	Conventional Hydrogen Bond	1.857131
4	H(N°58).....O(N°1310) du GLU167	Conventional Hydrogen Bond	1.949586
5	H (N°30).....O(N°2105) du GLN269	Conventional Hydrogen Bond	1.886599
6	N(N°56).....N (N°1237) du LYS157	Conventional Hydrogen Bond	3.081670
7	C(N°14)..... l'AA LEU 162	Alkyl	4.571875
8	H(N°18).....O(N°2105) du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.412414
9	H(N°35).....O(N°1310) du GLU167	Carbon Hydrogen Bond	2.368592
10	H (N°22).....O(N°1268) du LEU162	Carbon Hydrogen Bond	2.748712

3.4.5 Composé B'4

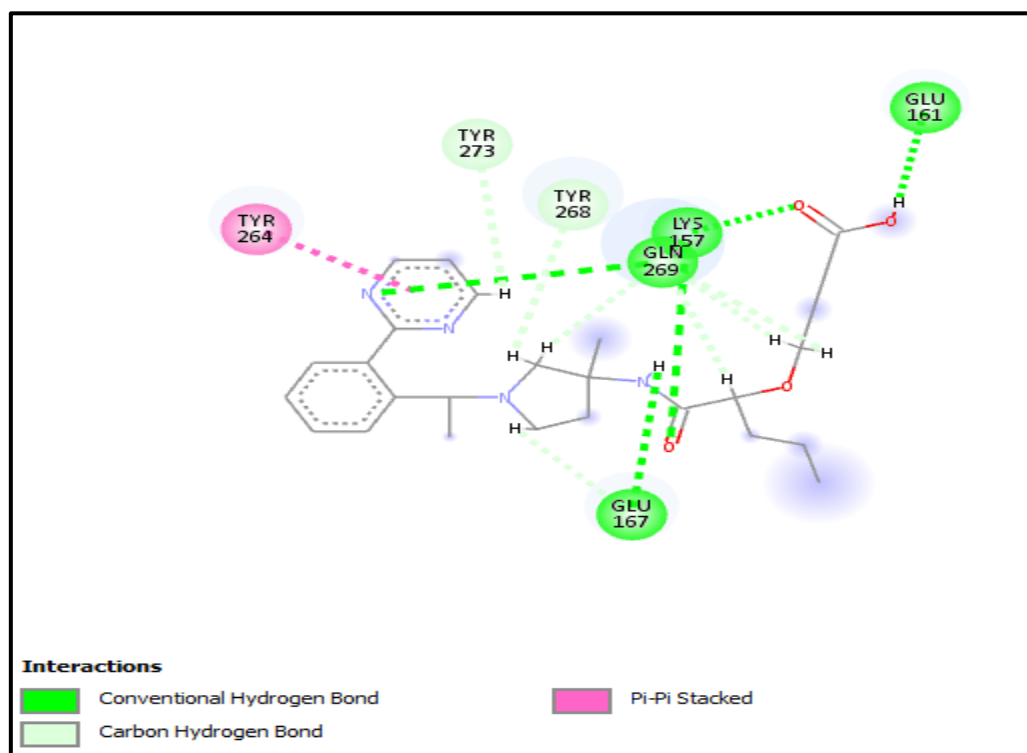


Figure N° 43: La présentation des interactions du composé monosubstitué **B'4** avec le site actif de PLpro en schéma 2D.

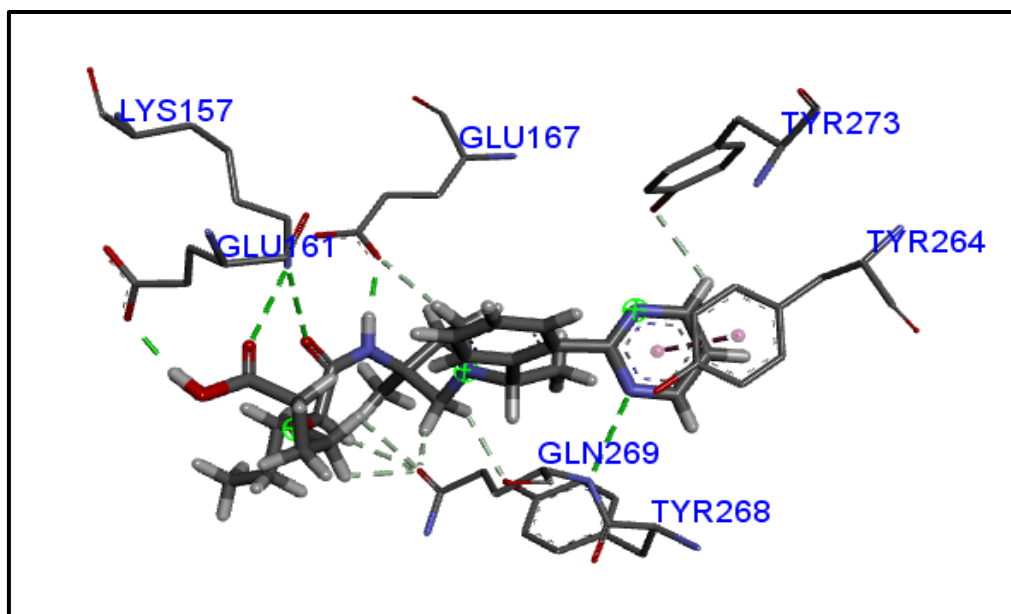


Figure N° 44: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué **B'4** avec le site actif de PLpro.

D'après le schéma 2D des interactions du composé **B'4**, nous avons observé la présence de cinq liaisons de type Conventional Hydrogen Bond et sept liaisons de type Carbon Hydrogen Bond.

De plus le cycle pyrimidine établit avec le noyau aromatique de l'acide aminé TYR264 une liaison hydrophobique de type Pi-PiStacked.

Tableau N° 13: Les liaisons établies par le composé B'4 avec le site actif de PLpro.

Liaison	Interaction	Types	Distance
1	H(N°70).....O(N°1264) du GLU161	Conventional Hydrogen Bond	1.976634
2	O(N°68).....N(N°1237) du LYS157	Conventional Hydrogen Bond	2.870721
3	O(N°36).....N(N°1237) du LYS157	Conventional Hydrogen Bond	2.731146
4	H(N°31).....O(N°1310) du GLU167	Conventional Hydrogen Bond	1.947473
5	N(N°53).....N(N°2098) du GLN269	Conventional Hydrogen Bond	3.233525
6	Pyrimidine..méthyl phénol duTYR264	Pi-PiStacked	3.351141
7	H(N°18).....O(N°1310) du GLU167	Carbon Hydrogen Bond	2.528534
8	H(N°59).....OH(N°2138) du TYR273	Carbon Hydrogen Bond	2.580115
9	H(N°22).....OH(N°2097) du TYR268	Carbon Hydrogen Bond	2.432242
10	H(N°21).....O(N°2105) du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.085240
11	H(N°39).....O(N°2105) duGLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.486817
12	H(N°41).....O(N°2105) du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.703595
13	H(N°42).....O(N°2105) du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2.298516

4 L'évaluation des propriétés ADMET

4.1 Les propriétés physico-chimiques

Chaque médicament doit se conformer à plusieurs critères de base tels que les propriétés physicochimiques comme: le coefficient de partage logP, TPSA, le nombre d'atomes, le poids moléculaire...etc.

Pour évaluer les propriétés médicamenteuses d'un composé nous avons utilisé le serveur ADMETlab afin de déterminer si les composés substitués peuvent être proposés comme candidat « médicament » et s'ils répondent aux règles suivantes :

- Règle de Lipinski.
- Règle de Veber.
- Règle de Ghose.
- Règle de Varma.
- Règle d'Oprea.

Tableau N° 14: Les propriétés physico-chimiques.

	Ligand de référence	M7	M51	B11	B'4
Formule	C20H32O2N2F	C21H32O4N2	C24H35O2N4	C20H32O4N3	C26H36O4N4
PM (poids moléculaire)	351.486	376.497	410.562	377.485	468.598
Nombre de liaison rotative	9	10	10	10	13
Nombre de liaison rigide	17	18	22	18	23
Nombre totale d'atomes	57	59	64	58	70
Réfractivité molaire	96.998	104.876	118.943	103.389	130.139
nON (nombre d'accepteur d'hydrogène)	2	4	5	5	6
nOHNH (nombre de donneurs)	2	2	1	3	2

d'hydrogène)					
Log D	2.15	0.681	3.153	0.051	1.242
Log P	2.255	3.232	3.99	2.128	3.835
TPSA	42.77	78.87	67.35	104.89	104.65
Règle de Lipinski	100%	100%	100%	100%	100%
Règle de Veber	100%	100%	100%	100%	66.67%
Règle de Ghose	100%	100%	100%	100%	50%
Règle de Varma	100%	100%	100%	100%	80%
Règle d'Oprea	33.33%	66.67%	100%	66.67%	100%

D'après les résultats de tableau N°14:

Le ligand de référence et les autres composés répondent parfaitement aux critères de la règle de Lipinski, ce qui indique qu'ils peuvent être administrés par voie orale sans poser de problèmes. De même nous remarquons la conformité de tous les composés testés, sauf le composé B'4, aux règles de Ghose, de Varma et de veber.

Concernant la règle d'Oprea, il y a une amélioration dans le cas de M7 et B11 par rapport au ligand de référence atteignant les 100 % pour les composés M51 et B'4.

4.2 Les propriétés pharmacocinétiques

Nous avons complété notre travail par une analyse des propriétés pharmacocinétiques afin de pouvoir affirmer si nos composés peuvent être proposés comme un candidat médicament. Ces propriétés sont appelées ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination).

L'absorption est le processus par lequel le médicament passe de son site d'administration à la circulation générale.

La distribution correspond à la diffusion de médicament dans les tissus de l'organisme.

Le métabolisme c'est la transformation, par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs.

L'élimination correspond à la capacité métabolique de différents organes, en premier lieu le foie, à l'excrétion du médicament sous toutes ses formes, en particulier rénale (urine) mais aussi hépatique (bile).

Les résultats de la simulation des critères pharmacocinétiques à l'aide du serveur ADMETlab sont montrés dans ce tableau :

Tableau N° 15: Les propriétés pharmacocinétiques ADME.

	Ligand de référence	M7	M51	B11	B'4
HIA (absorption intestinale humaine)	0.551 (1)	0.48 (0)	0.678 (1)	0.413 (0)	0.448 (0)
BBB perméabilité	0.949 (1)	0.322 (0)	0.619 (1)	0.208 (0)	0.2 (0)
CYP450 1A2 inhibition	0.046 (0)	0.013 (0)	0.092 (0)	0.019 (0)	0.067 (0)
CYP450 3A4 inhibition	0.629 (1)	0.364 (0)	0.675 (1)	0.284 (0)	0.639 (1)
CYP450 2C9 inhibition	0.633 (1)	0.377 (0)	0.533 (1)	0.339 (0)	0.554 (1)
CYP450 2C19 inhibition	0.624 (1)	0.191 (0)	0.681 (1)	0.124 (0)	0.359 (0)
CYP450 2D6 inhibition	0.546 (1)	0.512 (1)	0.569 (1)	0.498 (0)	0.558 (1)
Excrétion T1/2	1.455	1.064	1.675	0.974	1.512

➤ **Absorption**

Le ligand de référence et le composé M51 ont une HIA élevée (catégorie 1), ce qui indique que ces composés traversent facilement le tractus gastro-intestinal pour atteindre la circulation sanguine par contre les composés M7, B11 et B'4 ont une faible perméabilité gastro-intestinale (catégorie 0).

➤ **Distribution**

Contrairement au ligand de référence et M51, tous les autres composés ne peuvent pas franchir la barrière hémato-encéphalique (catégorie 0), ce qui protège le cerveau des effets néfastes de ces composés.

➤ Métabolisme

Nous constatons que seuls les deux composés substitués M7 et B11 ne présentent aucun effet inhibiteur pour les CYP 3A4, CYP 2C9 et CYP 2C19. Cependant, le B11 est le seul composé qui n'a aucun effet inhibiteur pour le CYP 2D6.

Alors que le B'4 possède un effet inhibiteur sur le CYP 3A4, CYP 2C9 et CYP 2D6.

➤ Elimination

La demi-vie d'élimination ($T_{1/2}$) est le temps nécessaire pour que la concentration sanguine d'un médicament dans l'organisme diminue de moitié. Nous avons trouvé que la $t_{1/2}$ diminue dans les composés testés par rapport au ligand de référence sauf dans le cas de M51 et B'4.

4.3 Les tests de toxicité

La toxicité du ligand de référence et des composés testés a été simulée à l'aide du serveur ADMETlab. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau N° 16: Les résultats de la toxicité.

Propriété	Ligand de référence	M7	M51	B11	B'4
Test d'Ames	0.178 (0)	0.174 (0)	0.23 (0)	0.148 (0)	0.188 (0)
Inhibition de hERG	0.882 (1)	0.775 (1)	0.952 (1)	0.597 (1)	0.882 (1)
Hépatotoxicité humaine (H-HT)	0.378 (0)	0.854 (1)	0.744 (1)	0.802 (1)	0.922 (1)
Sensibilisation cutanée	0.41 (0)	0.288 (0)	0.279 (0)	0.325 (0)	0.207 (0)
DL50	3.143	3.205	2.917	3.075	3.153

Les résultats de tableau N°16 montrent que tous les composés testés ainsi que le composé de référence ne possèdent aucun effet mutagène selon le test d'Ames (catégorie 0).

Tous les composés présentent un risque d'inhibition de la hERG (catégorie 1) pouvant provoquer des problèmes cardio-vasculaires. En revanche ces composés n'ont présenté aucune irritation cutanée.

Les composés substitués ont un effet hépatotoxique (catégorie 1) par rapport au ligand de référence (catégorie 0) mais des valeurs de DL50 proches de celle du ligand de référence.

5 L'amélioration des propriétés

Nous avons effectué des modifications pour essayer d'améliorer les propriétés physico chimiques et pharmacocinétiques des deux meilleurs composés bi-substitués **B'4** et **B11**.

5.1 Le composé B'4

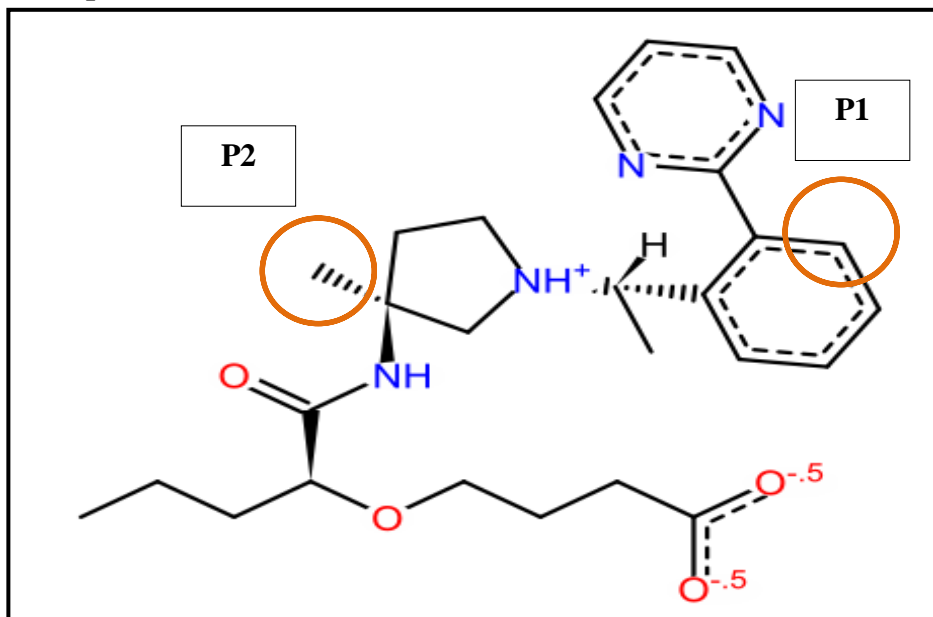


Figure N° 45: Structure de composé bi-substitué B'4.

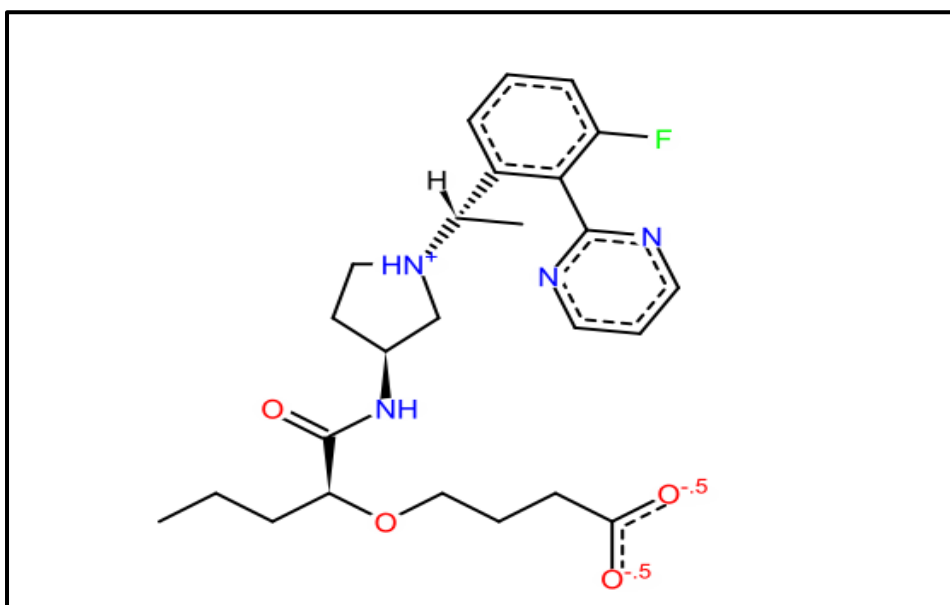


Figure N° 46: Structure de composé modifié C1.

L'addition de l'atome F en position P1 et la suppression du méthyle CH3 au niveau P2 donnent un composé C1 avec une affinité de $6.63M^{-1}$.

➤ **Etude des interactions du composé C1**

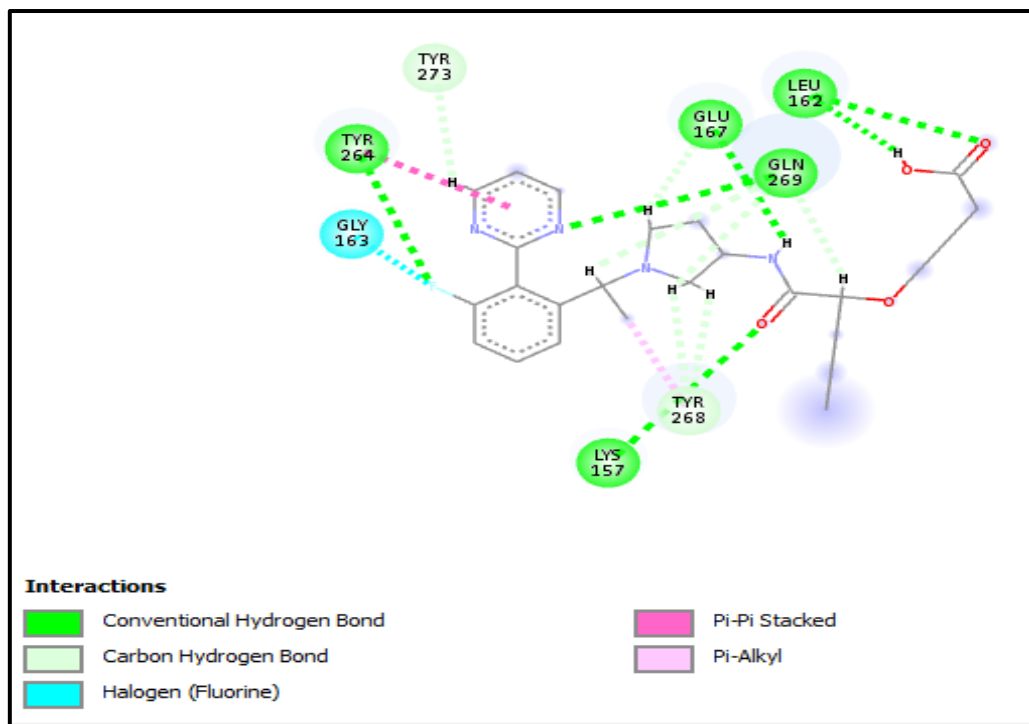


Figure N° 47: La présentation des interactions du composé monosubstitué C1 avec le site actif de PLpro en schéma 2D.

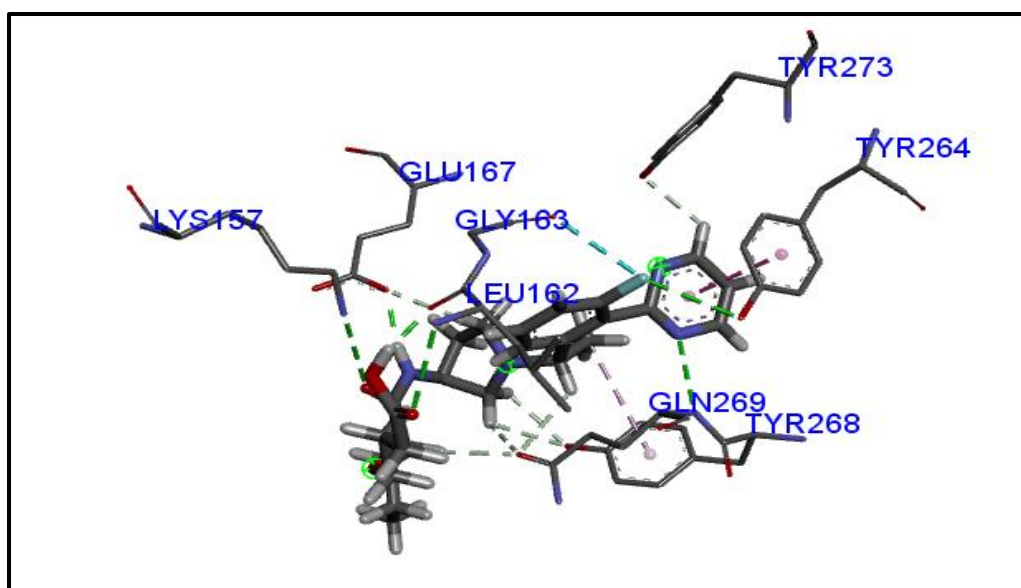


Figure N° 48: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué C1 avec le site actif de PLpro.

CHAPITRE 5 RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse visuelle des interactions indique que les modifications effectuées dans la structure du composé B'4 augmentent le nombre de liaisons de type Conventional Hydrogen Bond, de liaisons Carbon Hydrogen Bond avec apparition d'une liaison de type Pi-PiStacked et d'une liaison de type Pi-Alkyl, ainsi qu'une liaison Halogène (Fluorine) avec l'AA GLY163.

Tableau N° 17: Les liaisons établies par le composé C1 avec le site actif du PLpro.

Liaison	Interaction	Types	Distance
1	F(N°28).....OH(N°2066) du TYR264	Conventional Hydrogen Bond	2,988752
2	O(N°32).....N(N°1237) du LYS157	Conventional Hydrogen Bond	3,324897
3	N(N°56).....N(N°2098) du GLN269	Conventional Hydrogen Bond	3,182160
4	H (N°30).....O(N°1310) du GLU167	Conventional Hydrogen Bond	1,977655
5	O (N°64).....N (N°1265) du LEU162	Conventional Hydrogen Bond	3,039856
6	H (N°66).....O (N°1268) du LEU 162	Conventional Hydrogen Bond	1,791932
7	Pyrimidine....méthyl phénol duTYR264	Pi-PiStacked	3,491539
8	C(N°14).....méthyl phénol du TYR268	Pi-Alkyl	4,342338
9	F(N°28)..... O(N°1276) du GLY163	Halogen (Fluorine)	3,169673
10	H(N°51).....OH(N°2138) du TYR273	Carbon Hydrogen Bond	2,452265
11	H (N°18).....O(N°1310) du GLU167	Carbon Hydrogen Bond	2,394460
12	H (N°21).....OH (N°2097) du TYR268	Carbon Hydrogen Bond	2,767907
13	H (N°22).....OH (N°2097) du TYR268	Carbon Hydrogen Bond	2,574893
14	H(N°10).....O (N°2105)duGLN269	Carbon Hydrogen Bond	2,913935
15	H(N°21).....O (N°2105)duGLN269	Carbon Hydrogen Bond	2,649105
16	H(N°35).....O (N°2105)du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2,329255

5.1.1 Les propriétés physico-chimiques et ADMET du composé C1.

Tableau N° 18: Les propriétés physico-chimiques du composé C1.

	Ligand de référence	B'4	C1
Formule	C20H32O2N2F	C26H36O4N4	C25H34O4N4F
PM (poids moléculaire)	351.486	468.598	472.561
Nombre de liaison rotative	9	13	13
Nombre de liaison rigide	17	23	23
Nombre totale d'atomes	57	70	67

Réfractivité molaire	96.998	130.139	125.48
nON (nombre d'accepteur d'hydrogène)	2	6	6
nOHNH (nombre de donneurs d'hydrogène)	2	2	2
Log D	2.15	1.242	1.157
Log P	2.255	3.835	3.584
TPSA	42.77	104.65	104.65
Règle de Lipinski	100%	100%	100%
Règle de Veber	100%	66.67%	66.67%
Règle de Ghose	100%	50%	100%
Règle de Varma	100%	80%	80%
Règle d'Oprea	33.33%	100%	100%

Le composé **C1** répond parfaitement aux règles de Lipinski et Oprea, il y a également une amélioration dans la règle de Ghose jusqu'à 100% par rapport au B'4. En revanche il n'y a aucune amélioration dans les règles Veber et Varma.

Tableau N° 19: Les propriétés pharmacocinétiques ADME du composé C1.

Propriété	Ligand de référence	B'4	C1
HIA (absorption intestinale humaine)	0.551 (1)	0.448 (0)	0.609 (1)
BBB perméabilité	0.949 (1)	0.2 (0)	0.154 (0)
CYP450 1A2 inhibition	0.046 (0)	0.067 (0)	0.092 (0)
CYP450 3A4 inhibition	0.629 (1)	0.639 (1)	0.573 (1)
CYP450 2C9 inhibition	0.633 (1)	0.554 (1)	0.547 (1)
CYP450 2C19 inhibition	0.624 (1)	0.359 (0)	0.413 (0)
CYP450 2D6 inhibition	0.546 (1)	0.558 (1)	0.525 (1)
Excrétion T1/2	1.455	1.512	1.439

Le composé **C1** est bien absorbé et ne peut pas franchir la barrière hémato-encéphalique donc ne possède aucun effet sur le cerveau, mais il inhibe les trois cytochromes CYP 3A4, CYP 2C9 et CYP 2D6.

Tableau N° 20: Les résultats de la toxicité du composé C1.

Propriété	Ligand de référence	B'4	C1
Test d'Ames	0.178 (0)	0.188 (0)	0.248 (0)
Inhibition de hERG	0.882 (1)	0.882 (1)	0.881 (1)
Hépatotoxicité humaine (H-HT)	0.378 (0)	0.922 (1)	0.966 (1)
Sensibilisation cutanée	0.41 (0)	0.207 (0)	0.236 (0)
DL50	3.143	3.153	2.918

Le composé **C1** n'a aucun effet mutagène, ni irritant pour la peau.

Le composé **C1** présente une affinité élevée envers la cible enzymatique et un bon profil ADMET. Ce qui indique que ce composé peut être proposé comme un nouvel inhibiteur potentiel pour la p1 protéase.

➤ **L'accessibilité à la synthèse et la solubilité dans l'eau**

À l'aide du serveur SwissADME, nous avons calculé l'accessibilité à la synthèse du composé **C1**. Le serveur donne une valeur égale à 3.97 donc le composé est chimiquement synthétisable (la valeur n'a pas dépassé l'échelle de 10).

Concernant la solubilité, le composé **C1** présente une très bonne solubilité dans l'eau. Ce qui favorise leur passage dans la circulation sanguine.

5.2 Le composé B11

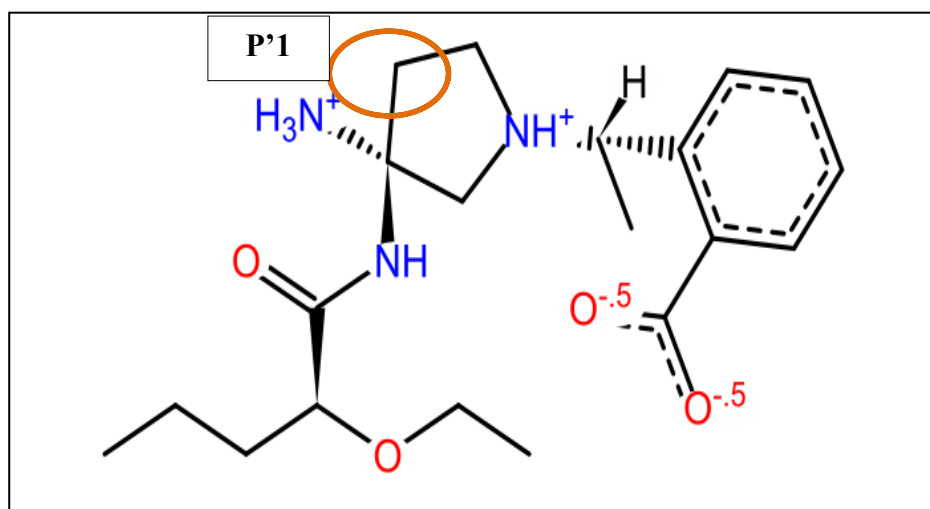


Figure N° 49: Structure de composé bi-substitué B11.

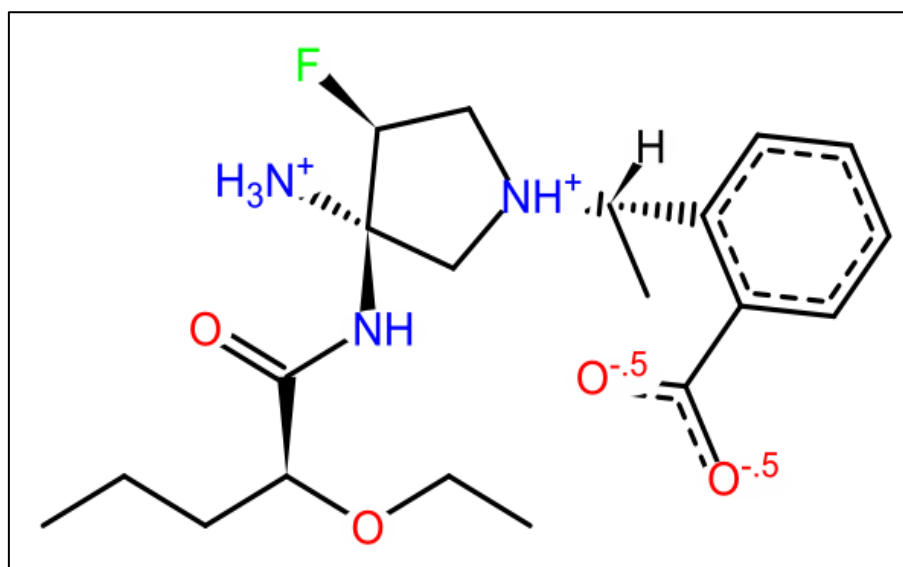


Figure N° 50: Structure de composé modifié C2.

Quand on a remplacé au niveau de la position P'1 l'atome H par l'atome F, l'affinité de ce composé **C2** a atteint la valeur de $5.63M^{-1}$.

➤ Etude des interactions du composé C2

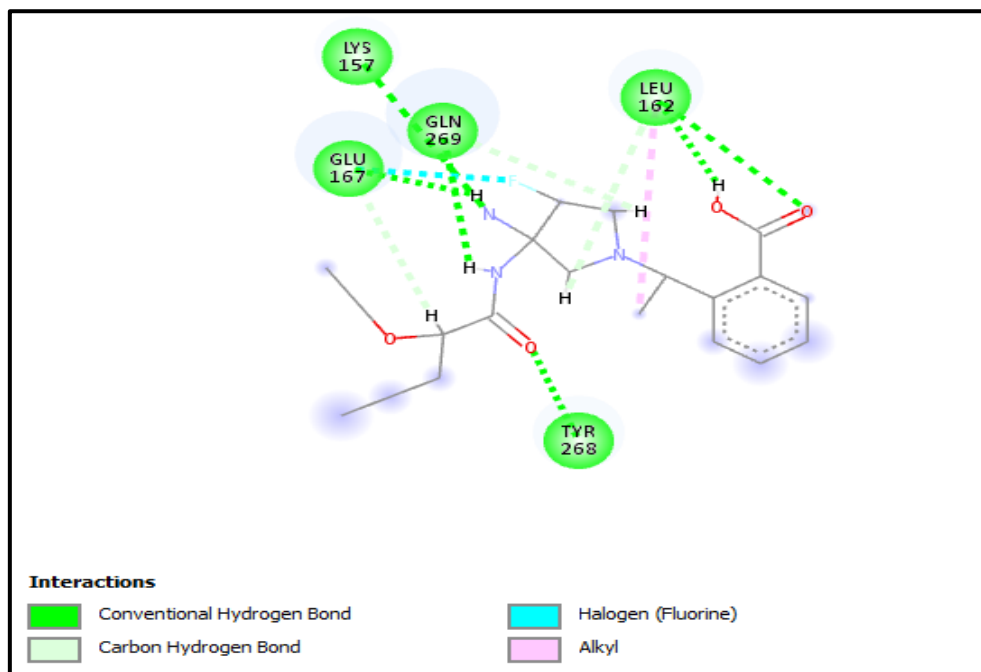


Figure N° 51: La présentation des interactions du composé monosubstitué C2 avec le site actif de PLpro en schéma 2D.

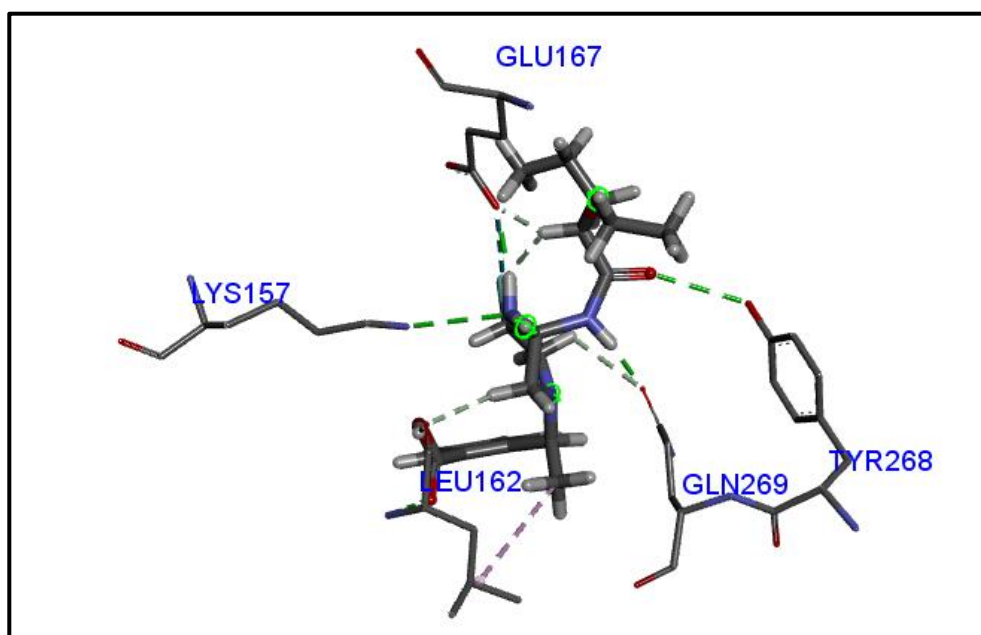


Figure N° 52: Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé monosubstitué C2 avec le site actif de PLpro.

Nous avons observé la formation de six liaisons de type Conventional Hydrogen Bond, trois Carbon Hydrogen Bond, une liaison de type Alkyl et une autre de type Halogène (Fluorine).

Tableau N° 21: Les liaisons établies par le composé C2 avec le site actif de la PLpro.

Liaison	Interaction	Types	Distance
	O(N°53).....N(N°1265) du LEU162	Conventional Hydrogen Bond	3,089208
2	H(N°55).....O(N°1268) du LEU162	Conventional Hydrogen Bond	1,870084
3	N (N°56).....N (N°1237) du LYS157	Conventional Hydrogen Bond	3,030278
4	H (N°58).....O (N°1310) du GLU167	Conventional Hydrogen Bond	1,999987
5	H (N°30).....O (N°2105) du GLN269	Conventional Hydrogen Bond	1,816543
6	O (N°32)..OH (N°2097) du TYR268	Conventional Hydrogen Bond	2,905605
7	C (N°14)..... l'AA LEU162	Alkyl	4,761843
8	F (N°24).....O (N°1310) du GLU167	Halogen (Fluorine)	3,599161
9	H (N°35).....O (N°1310) du GLU167	Carbon Hydrogen Bond	2,029858
10	H(N°22).....O (N°1268) du LEU162	Carbon Hydrogen Bond	2,821505
11	H (N°18).....O (N°2105) du GLN269	Carbon Hydrogen Bond	2,901319

5.2.1 Les propriétés physico-chimiques et ADMET du composé C2

Tableau N° 22: Les propriétés physico-chimiques du composé C2.

	Ligand de référence	B11	C2
Formule	C20H32O2N2F	C20H32O4N3	C20H31O4N3F
PM (poids moléculaire)	351.486	377.485	395.475
Nombre de liaison rotative	9	10	10
Nombre de liaison rigide	17	18	19
Nombre totale d'atomes	57	58	58
Réfractivité molaire	96.998	103.389	103.668
nON (nombre d'accepteur d'hydrogène)	2	5	5
nOHNH (nombre de donneurs d'hydrogène)	2	3	3
Log D	2.15	0.051	-0.031
Log P	2.255	2.128	2.076
TPSA	42.77	104.89	104.89
Règle de Lipinski	100%	100%	100%
Règle de Veber	100%	100%	100%

Règle de Ghose	100%	100%	100%
Règle de Varma	100%	100%	100%
Règle d'Oprea	33.33%	66.67%	66.67%

Nous constatons que, pour le composé **C2**, les résultats sont parfaitement conformes aux différentes règles sauf celle d'Oprea.

Tableau N° 23: Les propriétés pharmacocinétiques du composé **C2**.

	Ligand de référence	B11	C2
HIA (absorption intestinale humaine)	0.551 (1)	0.413 (0)	0.523 (1)
BBB perméabilité	0.949 (1)	0.208 (0)	0.196 (0)
CYP450 1A2 inhibition	0.046 (0)	0.019 (0)	0.027 (0)
CYP450 3A4 inhibition	0.629 (1)	0.284 (0)	0.367 (0)
CYP450 2C9 inhibition	0.633 (1)	0.339 (0)	0.459 (0)
CYP450 2C19 inhibition	0.624 (1)	0.124 (0)	0.227 (0)
CYP450 2D6 inhibition	0.546 (1)	0.498 (0)	0.501 (1)
Excrétion T1/2	1.455	0.974	0.993

Le composé **C2** traverse facilement la barrière gastro intestinale et atteint le sang efficacement, aussi il ne possède aucun effet néfaste sur le cerveau car il est dépourvu de la capacité de franchir la barrière hémato encéphalique.

Concernant l'inhibition de la famille de CYP il a montré un effet inhibiteur envers CYP 2D6 seulement.

Tableau N° 24: Les tests de toxicité du composé **C2**.

Propriété	Ligand de référence	B11	C2
Test d'Ames	0.178 (0)	0.148 (0)	0.164 (0)

Inhibition de hERG	0.882 (1)	0.597 (1)	0.493 (0)
Hépatotoxicité humaine (H-HT)	0.378 (0)	0.802 (1)	0.816 (1)
Sensibilisation cutanée	0.41 (0)	0.325 (0)	0.307 (0)
DL50	3.143	3.075	2.896

Le composé **C2** ne possède aucun effet mutagène, ni corrosif pour la peau.

L'absence du risque d'inhibition de hERG indique que le composé **C2** ne peut pas provoquer des problèmes cardio-vasculaires.

Ceci nous permet de conclure que le composé **C2** a de fortes chances de devenir un candidat médicament grâce à son excellent profil ADMET.

➤ **L'accessibilité à la synthèse et la solubilité dans l'eau**

À l'aide du serveur SwissADME, nous avons calculé à l'accessibilité à la synthèse du composé **C2**. Le serveur donne la valeur de 4.13 donc le composé est chimiquement synthétisable (la valeur n'a pas dépassé l'échelle de 10).

Concernant la solubilité, le composé **C2** présente une très bonne solubilité dans l'eau. Ce qui favorise leur passage dans la circulation sanguine.

6 Comparaison entre les propriétés des composés **C1** et **C2**

Tableau N°25: Comparaison entre les propriétés des composé **C1** et **C2**.

Les propriétés	C1	C2
L'affinité	6.63 M ⁻¹	5.63 M ⁻¹
Nombre des liaisons	16	11
Règle de Lipinski	100%	100%
Règle de Ghose	100%	100%
Règle d'Oprea	100%	66.67%
Règle de Veber	66.67%	100%
Règle de Varma	80%	100%
HTA	1	1
BBB	0	0
Inhibition de CYP1A2	0	0

Inhibition de CYP3A4	1	0
Inhibition de CYP2C9	1	0
Inhibition de CYP2C19	0	0
Inhibition de CYP2D6	1	1
Test d'Ames	0	0
Inhibition de hERG	1	0
H-HT	1	1
LLNA	0	0
La solubilité dans l'eau	Très soluble	Très soluble
L'accessibilité à la synthèse	3.97	4.13

Le composé C1 présente une affinité supérieure à celle du composé C2 envers la cible PLpro, ce qui explique l'augmentation de nombre des liaisons du C1.

D'après le tableau N°25 :

Les deux composés répondent parfaitement aux règles de Lipinski et Ghose, mais concernant les autres règles, le composé C1 est parfaitement conforme à la règle d'Oprea, à 80% à la règle de Varma et à 66.67% à la règle de Veber.

Nos composés sont bien absorbés et ne peuvent pas franchir la barrière hémato-encéphalique donc ne possèdent aucun effet néfaste sur le cerveau.

De plus, le composé C1 inhibe le CYP 3A4 et le CYP 2C9 contrairement au composé C2 qui n'a aucun effet inhibiteur sur ces deux cytochromes. Les deux composés ont montré une activité inhibitrice envers le CYP 2D6, mais aucune inhibition du CYP 1A2 et CYP 2C19.

Nos deux composés n'ont aucun effet mutagène, ni corrosif ou irritant pour la peau.

Les résultats du test d'hépatotoxicité indiquent que C1 et C2 présentent un certain risque sur le foie.

Concernant le test d'inhibition du gène hERG, un risque d'inhibition a été démontré pour le composé C1 contrairement au C2.

Les deux composés sont chimiquement synthétisables et possèdent une très bonne solubilité dans l'eau.

La comparaison entre les deux meilleurs composés C1 et C2 révèle que :

Le composé C1 présente une très bonne affinité envers la cible et un profil ADMET acceptable, d'autres tests *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires pour la validation du composé comme médicament potentiel.

Le composé C2 présente un très bon profil ADMET mais une affinité inférieure à celle de C1. Ce composé peut être considéré comme un candidat médicament sans effets secondaires importants.

7 Conclusion

Après notre étude théorique, les composés C1 et C2 présentent une meilleure affinité à l'enzyme, donc une activité biologique intéressante, sans problème d'absorption par voie orale et un profil ADMET acceptable, ils peuvent être proposés comme des nouveaux inhibiteurs potentiels de la PLpro. Cependant, des tests *in vitro* et *in vivo* sont indispensables pour valider ces molécules en tant qu'inhibiteurs de l'enzyme.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le but de ce travail est de simuler les interactions entre une cible protéique et des ligands afin de développer de nouveaux inhibiteurs théoriques. Pour étudier ces interactions, nous avons choisi le programme de docking moléculaire « Surfex » qui utilise une méthode incrémentielle. Ce programme a été développé pour aider à la mise au point de molécules à activité thérapeutique. Il s'agit de calculs d'affinités entre des composés de faible poids moléculaire (inhibiteurs) et des récepteurs protéiques de types enzymatiques.

Dans ce contexte, nous avons utilisé ce programme pour étudier les interactions intervenant dans l'inhibition de la papain-like-protease par divers inhibiteurs. Cette dernière est une cible thérapeutique potentielle lors de l'infection par le SARS COV2.

Dans la première partie de notre travail nous avons testé la fiabilité du programme Surfex par trois tests : le RMSD entre le mode d'interaction prédit et la structure cristalline. Ensuite nous avons visualisé trois complexes afin de montrer la superposition des ligands simulés vis-à-vis de ceux de référence. Le troisième test est le coefficient de corrélation linéaire entre l'activité biologique (IC50) de certaines molécules et leur score de docking moléculaire (Affinité pour Surfex). Le programme de docking moléculaire Surfex peut être considéré suffisamment performant pour simuler les interactions puisqu'il reproduit assez bien les résultats expérimentaux avec 71% des valeurs de RMSD inférieures à 2 Å et une corrélation entre les deux paramètres analysés avec $r = 0.71$.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons essayé de développer des agents thérapeutiques potentiels contre le SARS COV2 par docking moléculaire.

Pour cela, nous avons choisi un inhibiteur de référence de la PLpro issu de la littérature, sur lequel nous avons effectué des modifications structurales par mono-substitution consistant à ajouter un groupement dans une position et on calcule leurs affinités par le programme Surfex. Ensuite, nous avons choisi les deux meilleurs composés issus de la mono substitution **M7** et **M51** pour réaliser une série de bi-substitutions et de sélectionner les composés ayant les meilleures affinités, **B'4** et **B11**, avec des valeurs respectives de 7.17 et 5.74 M⁻¹. Ainsi, nous avons visualisé les interactions de ces composés réalisées avec le site actif de notre cible thérapeutique. Il est important de noter que les différents inhibiteurs de la PL protéase testés dans cette étude sont conformes aux critères imposés par la règle de Lipinski, on peut donc conclure que ces composés peuvent être administrés par voie orale sans difficultés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ensuite, nous avons étudié les propriétés pharmacocinétiques ainsi que la toxicité de ces composés substitués.

Enfin, pour améliorer le profil ADMET des composés B'4 et B11 nous avons réalisé des modifications aléatoires au niveau de leurs structures et obtenu deux autres composés **C1** et **C2** avec des affinités respectives légèrement moindres 6.63 et 5.63M^{-1} mais avec un bon profil ADMET.

Nous proposons ainsi les deux composés C1 et C2 comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de la PLpro qui mériteraient d'être expérimentés d'une manière plus approfondie avant leur validation en tant que molécules anti-SARS-COV2.

Comme perspective, il serait intéressant d'employer la méthode dite variable Standard Deviation Consensus (vSDC) qui permet d'associer à plusieurs logiciels de docking moléculaire, une méthode consensus pour affiner davantage les résultats du criblage virtuel.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] G. Wong, W. Liu, Y. Liu, B. Zhou, Y. Bi, et G. F. Gao, « MERS, SARS, and Ebola: The Role of Super-Spreaders in Infectious Disease », *Cell Host & Microbe*, vol. 18, n° 4, p. 398-401, oct. 2015, doi: 10.1016/j.chom.2015.09.013.
- [2] N. Zhu *et al.*, « A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 », *N Engl J Med*, vol. 382, n° 8, p. 727-733, févr. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [3] Y. Wu *et al.*, « SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus », *The Lancet*, vol. 395, n° 10228, p. 949-950, mars 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30557-2.
- [4] C. Wang, P. W. Horby, F. G. Hayden, et G. F. Gao, « A novel coronavirus outbreak of global health concern », *Lancet*, vol. 395, n° 10223, p. 470-473, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
- [5] « WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard ». <https://covid19.who.int> (consulté le juin 11, 2021).
- [6] Grosdidier.A, « Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives ». Sciences pharmaceutiques. 2007
- [7] B. Insider, « Comment 11 grandes pandémies ont changé le cours de l'histoire », *Business Insider France*, oct. 11, 2020.
- [8] P. S. Masters, « The Molecular Biology of Coronaviruses », *Adv Virus Res*, vol. 66, p. 193-292, 2006, doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
- [9] S. R. Weiss et S. Navas-Martin, « Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus », *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 69, n° 4, p. 635-664, déc. 2005, doi: 10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005.
- [10] A. Vabret, J. Dina, E. Brison, J. Brouard, et F. Freymuth, « Coronavirus humains (HCoV) », *Pathol Biol (Paris)*, vol. 57, n° 2, p. 149-160, mars 2009, doi: 10.1016/j.patbio.2008.02.018.
- [11] V. Bonny, A. Maillard, C. Mousseaux, L. Plaçais, et Q. Richier, « COVID-19 : physiopathologie d'une maladie à plusieurs visages », *Rev Med Interne*, vol. 41, n° 6, p. 375-389, juin 2020, doi: 10.1016/j.revmed.2020.05.003.
- [12] Brenda L. Tesini « Coronavirus et syndrome respiratoire aigu sévère (COVID-19, MERS et SRAS) - Maladies infectieuses », *Édition professionnelle du Manuel MSD*. <https://www.msmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/virus-respiratoires/coronavirus-et-syndrome-respiratoire-aigu-s%C3%A9v%C3%A8re-covid-19-mers-et-sras> (consulté le juin 08, 2021).
- [13] W. J. Wiersinga, A. Rhodes, A. C. Cheng, S. J. Peacock, et H. C. Prescott, « Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review », *JAMA*, vol. 324, n° 8, p. 782-793, août 2020, doi: 10.1001/jama.2020.12839.
- [14] A. Bonnin, « Caractérisation de la protéine S du coronavirus humain 229E », phdthesis, Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2018
- [15] E. C. Bos, W. Luytjes, H. V. van der Meulen, H. K. Koerten, et W. J. Spaan, « The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus », *Virology*, vol. 218, n° 1, p. 52-60, avr. 1996, doi: 10.1006/viro.1996.0165.
- [16] A. C. Walls, Y.-J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall, A. T. McGuire, et D. Velesler, « Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein », *Cell*, vol. 181, n° 2, p. 281-292.e6, avr. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- [17] L. Y *et al.*, « Identification of an epitope of SARS-coronavirus nucleocapsid protein. », *Cell Res*, vol. 13, n° 3, p. 141-145, juin 2003, doi: 10.1038/sj.cr.7290158.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [18] D. Schoeman et B. C. Fielding, « Coronavirus envelope protein: current knowledge », *Virology Journal*, vol. 16, n° 1, p. 69, mai 2019, doi: 10.1186/s12985-019-1182-0.
- [19] C. A. M. de Haan et P. J. M. Rottier, « Molecular interactions in the assembly of coronaviruses », *Adv Virus Res*, vol. 64, p. 165-230, 2005, doi: 10.1016/S0065-3527(05)64006-7.
- [20] I. Jamai Amir, Z. Lebar, G. yahyaoui, et M. Mahmoud, « Covid-19 : virologie, épidémiologie et diagnostic biologique », *Option/Bio*, vol. 31, n° 619, p. 15-20, 2020, doi: 10.1016/S0992-5945(20)30178-1.
- [21] A. H. de Wilde, E. J. Snijder, M. Kikkert, et M. J. van Hemert, « Host Factors in Coronavirus Replication », *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 419, p. 1-42, 2018, doi: 10.1007/82_2017_25.
- [22] E. de Wit, N. van Doremalen, D. Falzarano, et V. J. Munster, « SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses », *Nat Rev Microbiol*, vol. 14, n° 8, p. 523-534, août 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
- [23] H. M *et al.*, « SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor », *Cell*, vol. 181, n° 2, avr. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- [24] S. Xia *et al.*, « Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein », *Cell Mol Immunol*, vol. 17, n° 7, p. 765-767, juill. 2020, doi: 10.1038/s41423-020-0374-2.
- [25] F. Yu, L. Du, D. M. Ojcius, C. Pan, et S. Jiang, « Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China », *Microbes Infect*, vol. 22, n° 2, p. 74-79, mars 2020, doi: 10.1016/j.micinf.2020.01.003.
- [26] B. Coutard, C. Valle, X. de Lamballerie, B. Canard, N. G. Seidah, et E. Decroly, « The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade », *Antiviral Res*, vol. 176, p. 104742, avr. 2020, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
- [27] R. Wölfel *et al.*, « Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 », *Nature*, vol. 581, n° 7809, p. 465-469, mai 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
- [28] J. Kern, « SARS-CoV-2 », *Futura*. <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/coronavirus-sars-cov-2-18559/> (consulté le juin 08, 2021).
- [29] « SARS-CoV-2 / COVID-19 Anticorps, protéines, outils | www.anticorps-enligne.fr ». <https://www.anticorps-enligne.fr/areas/infectious-disease/covid-19/> (consulté le juin 19, 2021).
- [30] D. Juckel, J. Dubuisson, et S. Belouzard, « Les coronavirus, ennemis incertains », *Med Sci (Paris)*, vol. 36, n° 6-7, Art. n° 6-7, juin 2020, doi: 10.1051/medsci/2020113.
- [31] M. C. Hagemeijer, P. J. M. Rottier, et C. A. M. de Haan, « Biogenesis and Dynamics of the Coronavirus Replicative Structures », *Viruses*, vol. 4, n° 11, p. 3245-3269, nov. 2012, doi: 10.3390/v4113245.
- [32] « Les différents types de vaccins contre la COVID-19 ». <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained> (consulté le mai 30, 2021).
- [33] L. Du, Y. He, Y. Zhou, S. Liu, B.-J. Zheng, et S. Jiang, « The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development », *Nat Rev Microbiol*, vol. 7, n° 3, p. 226-236, mars 2009, doi: 10.1038/nrmicro2090.
- [34] Q. Wang, G. Wong, G. Lu, J. Yan, et G. F. Gao, « MERS-CoV spike protein: Targets for vaccines and therapeutics », *Antiviral Res*, vol. 133, p. 165-177, sept. 2016, doi: 10.1016/j.antiviral.2016.07.015.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [35] D. Wrapp *et al.*, « Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation », *Science*, vol. 367, n° 6483, p. 1260-1263, mars 2020, doi: 10.1126/science.abb2507.
- [36] N. Wang, J. Shang, S. Jiang, et L. Du, « Subunit Vaccines Against Emerging Pathogenic Human Coronaviruses », *Front Microbiol*, vol. 11, p. 298, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00298.
- [37] L.-P. Wu *et al.*, « Duration of Antibody Responses after Severe Acute Respiratory Syndrome », *Emerg Infect Dis*, vol. 13, n° 10, p. 1562-1564, oct. 2007, doi: 10.3201/eid1310.070576.
- [38] R. Channappanavar, C. Fett, J. Zhao, D. K. Meyerholz, et S. Perlman, « Virus-Specific Memory CD8 T Cells Provide Substantial Protection from Lethal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection », *J Virol*, vol. 88, n° 19, p. 11034-11044, oct. 2014, doi: 10.1128/JVI.01505-14.
- [39] « Maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) : vaccins ». [https://www.who.int/fr/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/fr/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines) (consulté le juin 08, 2021).
- [40] Giorgetta J et Blaize A « Vaccin Covid-19 : infos Pfizer, Moderna, AstraZeneca, Janssen ». <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2620433-vaccin-coronavirus-covid-19-pfizer-moderna-astrazeneca-johnson-janssen-efficacite-contre-indication/> (consulté le juin 10, 2021).
- [41] « Les effets indésirables des vaccins contre la COVID-19 ». <https://www.who.int/fr/news-room/feature-stories/detail/side-effects-of-covid-19-vaccines> (consulté le mai 30, 2021).
- [42] S. Jäger *et al.*, « Global landscape of HIV-human protein complexes », *Nature*, vol. 481, n° 7381, p. 365-370, déc. 2011, doi: 10.1038/nature10719.
- [43] A. Ladoux, S. Azoulay, et C. Dani, « Cibler la protéase majeure du SARS-CoV-2 pour fabriquer un médicament efficace contre ce coronavirus », *Med Sci (Paris)*, vol. 36, n° 6-7, p. 555-558, juin 2020, doi: 10.1051/medsci/2020106.
- [44] « SARS-CoV-2 - Protéase de type papaine (PLPro) - Antigènes (Protéines) ». <https://www.clinisciences.com/achat/cat-sars-cov-2-protease-de-type-papaine-5137.html> (consulté le juin 02, 2021).
- [45] Liji Thomas « SARS-CoV-2 Nsp3 protease activity and nanobody inhibitor development », *News-Medical.net*, déc. 14, 2020. <https://www.news-medical.net/news/20201214/SARS-CoV-2-Nsp3-protease-activity-and-nanobody-inhibitor-development.aspx> (consulté le juin 05, 2021).
- [46] X. Gao *et al.*, « Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease », *Acta Pharm Sin B*, vol. 11, n° 1, p. 237-245, janv. 2021, doi: 10.1016/j.apsb.2020.08.014.
- [47] B. H. Harcourt *et al.*, « Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replicase Products and Characterization of Papain-Like Protease Activity », *J Virol*, vol. 78, n° 24, p. 13600-13612, déc. 2004, doi: 10.1128/JVI.78.24.13600-13612.2004.
- [48] T. Klemm *et al.*, « Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2 », *EMBO J*, vol. 39, n° 18, p. e106275, sept. 2020, doi: 10.15252/embj.2020106275.
- [49] Y. M. Báez-Santos, S. E. St. John, et A. D. Mesecar, « The SARS-coronavirus papain-like protease: Structure, function and inhibition by designed antiviral compounds », *Antiviral Research*, vol. 115, p. 21-38, mars 2015, doi: 10.1016/j.antiviral.2014.12.015.
- [50] D. Shin *et al.*, « Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity », *Nature*, vol. 587, n° 7835, p. 657-662, nov. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2601-5.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [51] K. Ratia *et al.*, « A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n° 42, p. 16119-16124, oct. 2008, doi: 10.1073/pnas.0805240105.
- [52] C. B. McClain et N. Vabret, « SARS-CoV-2: the many pros of targeting PLpro », *Signal Transduct Target Ther*, vol. 5, n° 1, p. 223, oct. 2020, doi: 10.1038/s41392-020-00335-z.
- [53] J. Osipiuk *et al.*, « Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors », *Nat Commun*, vol. 12, n° 1, p. 743, févr. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21060-3.
- [54] M. Kandeel, Y. Kitade, M. Fayez, K. N. Venugopala, et A. Ibrahim, « The emerging SARS-CoV-2 papain-like protease: Its relationship with recent coronavirus epidemics », *Journal of Medical Virology*, vol. 93, n° 3, p. 1581-1588, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.26497>.
- [55] N. Barretto, D. Jukneliene, K. Ratia, Z. Chen, A. D. Mesecar, et S. C. Baker, « The Papain-Like Protease of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Has Deubiquitinating Activity », *J Virol*, vol. 79, n° 24, p. 15189-15198, déc. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.24.15189-15198.2005.
- [56] A. Stasiulewicz, A. W. Maksymiuk, M. L. Nguyen, B. Bełza, et J. I. Sulkowska, « SARS-CoV-2 Papain-Like Protease Potential Inhibitors—In Silico Quantitative Assessment », *IJMS*, vol. 22, n° 8, p. 3957, avr. 2021, doi: 10.3390/ijms22083957.
- [57] Y. Zhou, C. He, L. Wang, et B. Ge, « Post-translational regulation of antiviral innate signaling », *Eur J Immunol*, vol. 47, n° 9, p. 1414-1426, sept. 2017, doi: 10.1002/eji.201746959.
- [58] E. Węglarz-Tomczak, J. M. Tomczak, M. Talma, M. Burda-Grabowska, M. Giurg, et S. Brul, « Identification of ebselen and its analogues as potent covalent inhibitors of papain-like protease from SARS-CoV-2 », *Sci Rep*, vol. 11, p. 3640, févr. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-83229-6.
- [59] J. R. Clasman, R. K. Everett, K. Srinivasan, et A. D. Mesecar, « Decoupling deISGylating and deubiquitinating activities of the MERS virus papain-like protease », *Antiviral Res*, vol. 174, p. 104661, févr. 2020, doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104661.
- [60] X. Chen, X. Yang, Y. Zheng, Y. Yang, Y. Xing, et Z. Chen, « SARS coronavirus papain-like protease inhibits the type I interferon signaling pathway through interaction with the STING-TRAF3-TBK1 complex », *Protein Cell*, vol. 5, n° 5, p. 369-381, mai 2014, doi: 10.1007/s13238-014-0026-3.
- [61] W. Rut *et al.*, « Activity profiling and structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2-PLpro protease provides a framework for anti-COVID-19 drug design », *bioRxiv*, p. 2020.04.29.068890, avr. 2020, doi: 10.1101/2020.04.29.068890.
- [62] E. Węglarz-Tomczak, J. M. Tomczak, M. Talma, et S. Brul, « Ebselen as a highly active inhibitor of PLProCoV2 », *bioRxiv*, p. 2020.05.17.100768, mai 2020, doi: 10.1101/2020.05.17.100768.
- [63] M. Zmudzinski *et al.*, « Ebselen derivatives are very potent dual inhibitors of SARS-CoV-2 proteases - PLpro and Mpro in in vitro studies », *bioRxiv*, p. 2020.08.30.273979, août 2020, doi: 10.1101/2020.08.30.273979.
- [64] K. Sargsyan *et al.*, « Multi-targeting of functional cysteines in multiple conserved SARS-CoV-2 domains by clinically safe Zn-ejectors », *Chem Sci*, vol. 11, n° 36, p. 9904-9909, sept. 2020, doi: 10.1039/d0sc02646h.
- [65] B. T. Freitas *et al.*, « Characterization and Noncovalent Inhibition of the Deubiquitinase and deISGylase Activity of SARS-CoV-2 Papain-Like Protease », *ACS Infect Dis*, vol. 6, n° 8, p. 2099-2109, août 2020, doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00168.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [66] SARS-CoV-2 Papain-like Protease Potential Inhibitors Database « COVID - Sulkowska Lab ». <https://plpro-inhibitors.cent.uw.edu.pl/>
- [67] H. Boucherit, A. Chikhi, A. Bensegueni, A. Merzoug, et E. H. Mokrani, « L'AMARRAGE MOLECULAIRE : UNE NOUVELLE APPROCHE POUR LUTTER CONTRE LE DEVELOPPEMENT DE LA TUBERCULOSE », vol. 7, p. 18, 2013.
- [68] G. L. Warren *et al.*, « A critical assessment of docking programs and scoring functions », *J Med Chem*, vol. 49, n° 20, p. 5912-5931, oct. 2006, doi: 10.1021/jm050362n.
- [69] I. Halperin, B. Ma, H. Wolfson, et R. Nussinov, « Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions », *Proteins*, vol. 47, n° 4, p. 409-443, juin 2002, doi: 10.1002/prot.10115.
- [70] A. Sethi, K. Joshi, K. Sasikala, et M. Alvala, *Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications*. IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.85991.
- [71] Abimbola Farinde « Interactions médicament-récepteur - Pharmacologie clinique », *Édition professionnelle du Manuel MSD*. <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/pharmacologie-clinique/pharmacodynamie/interactions-m%C3%A9dicament-r%C3%A9cepteur>
- [72] R. P. D. Bank, « RCSB PDB: About RCSB PDB: Enabling Breakthroughs in Scientific and Biomedical Research and Education ». <https://www.rcsb.org/pages/about-us/index> (consulté le juin 08, 2021).
- [73] E.-H. Mokrani et A. Bensegueni, « Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. », Thesis, Constantine : Université Mentouri Constantine, 2012.
- [74] Alexandre Beautrait. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine FAT de la kinase d'adhérence focale FAK. Autre [cs.OH]. Université Henri Poincaré - Nancy I, 2008.
- [75] A. M. Dar et S. Mir, « Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges », *J Anal Bioanal Tech*, vol. 08, n° 02, 2017, doi: 10.4172/2155-9872.1000356.
- [76] Merzoug. A, « Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase », Thèse de Doctorat en science, Constantine : Université Mentouri Constantine, 2018, 189 p.
- [77] Guillaume Renvez. Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2010.
- [78] « Liaison hydrogène », *physique et chimie*, avr. 08, 2018. <http://webphysique.fr/liaison-hydrogene/> (consulté le juin 09, 2021).
- [79] L. Hoffer, « Développement et validation du logiciel S4MPLE : application au docking moléculaire et à l'optimisation de fragments assistée par ordinateur dans le cadre du fragment-based drug design », phdthesis, Université de Strasbourg, 2013.
- [80] BOUCHAGRA.S « Modélisation des interactions protéine-petites molécules: étude de la relation structure – fonction dans le cas des lipases » Thèse de doctorat en Sciences : Chimie Organique et Bioorganique : Université Badji Mokhtar Annaba, 2018. 145 p.
- [81] S. Kawai *et al.*, « Van der Waals interactions and the limits of isolated atom models at interfaces », *Nat Commun*, vol. 7, p. 11559, mai 2016, doi: 10.1038/ncomms11559.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [82] G. M. Morris *et al.*, « AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility », *J Comput Chem*, vol. 30, n° 16, p. 2785-2791, déc. 2009, doi: 10.1002/jcc.21256.
- [83] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, et R. Taylor, « Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking », *J Mol Biol*, vol. 267, n° 3, p. 727-748, avr. 1997, doi: 10.1006/jmbi.1996.0897.
- [84] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, et G. Klebe, « A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm », *J Mol Biol*, vol. 261, n° 3, p. 470-489, août 1996, doi: 10.1006/jmbi.1996.0477.
- [85] T. J. Ewing, S. Makino, A. G. Skillman, et I. D. Kuntz, « DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases », *J Comput Aided Mol Des*, vol. 15, n° 5, p. 411-428, mai 2001, doi: 10.1023/a:1011115820450.
- [86] R. Abagyan et M. Totrov, « Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins », *J Mol Biol*, vol. 235, n° 3, p. 983-1002, janv. 1994, doi: 10.1006/jmbi.1994.1052.
- [87] G. O. Timo, R. S. S. V. dos Reis, A. F. de Melo, T. V. L. Costa, P. de O. Magalhães, et M. Homem-de-Mello, « Predictive Power of In Silico Approach to Evaluate Chemicals against M. tuberculosis: A Systematic Review », *Pharmaceuticals*, vol. 12, n° 3, p. 135, sept. 2019, doi: 10.3390/ph12030135.
- [88] Chikhi. A « Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase-substances antibactériennes à l'aide de techniques de “ Docking” (arrimage) moléculaire », Thèse de Doctorat d'État en Microbiologie. Constantine : Université Mentouri Constantine, 2007, 126 p.
- [89] Teniou S. Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. 2012. 75 p.
- [90] S. Gore *et al.*, « Validation of Structures in the Protein Data Bank », *Structure*, vol. 25, n° 12, p. 1916-1927, déc. 2017, doi: 10.1016/j.str.2017.10.009.
- [91] B. Kramer, M. Rarey, et T. Lengauer, « Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking », *Proteins*, vol. 37, n° 2, p. 228-241, nov. 1999, doi: 10.1002/(sici)1097-0134(19991101)37:2<228::aid-prot8>3.0.co;2-8.
- [92] E. Kellenberger, J. Rodrigo, P. Muller, et D. Rognan, « Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy », *Proteins*, vol. 57, n° 2, p. 225-242, août 2004, doi: 10.1002/prot.20149.
- [93] F. B. F. L. J. Fern, O. I. a P. Investor, W. W. E. Tackling, C. C. Business, financial problems L. about our editorial policies J. Fern, et o, « Correlation Coefficient Definition », *Investopedia*. <https://www.investopedia.com/terms/c/correlationcoefficient.asp> (consulté le juin 05, 2021).
- [94] Charly Empereur-Mot. Développement d'outils statistiques d'évaluation de méthodes de criblage virtuel : courbes de prédictivité & Screening Explorer. Bio-Informatique, Biologie Systémique [qbio.QM]. Conservatoire national des arts et metiers - CNAM, 2017.
- [95] Lipinski C, Lambardo A. F, Domini B. W, Feney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997 ; 23 : 3-25.
- [96] R. Cecchelli *et al.*, « Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 6, n° 8, p. 650-661, août 2007, doi: 10.1038/nrd2368.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [97] A. L. Péliissier, F. uffaut, M. P. De Méo, et A. Botta, « Le test d'Ames: Application aux urines de fumeurs », *La Revue de Médecine Interne*, vol. 17, n° 8, p. 635-639, août 1996, doi: 10.1016/0248-8663(96)87149-9.
- [98] R. N. Subbiah, C. E. Clarke, D. J. Smith, J. Zhao, T. J. Campbell, et J. I. Vandenberg, « Molecular basis of slow activation of the human ether-a-go-go related gene potassium channel », *J Physiol*, vol. 558, n° Pt 2, p. 417-431, juill. 2004, doi: 10.1113/jphysiol.2004.062588.
- [99] G. E. Kirsch *et al.*, « Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition: effects of temperature and stimulus pattern », *J Pharmacol Toxicol Methods*, vol. 50, n° 2, p. 93-101, oct. 2004, doi: 10.1016/j.vascn.2004.06.003.
- [100] « Sensibilisation cutanée LLNA | OCDE 429 - Phycher », *Phycher Bio Développement*. <https://www.phycher.com/toxicologie/sensibilisation-cutanee-llna/> (consulté le juin 05, 2021).
- [101] Boucherit. H « Etude théorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la méthionine aminopeptidase de mycobacterium tuberculosis par diverses molécules » Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques Constantine : Université Mentouri Constantine, 2012. 71 p

Annexes

Annexe N°1 : Les valeurs RMSD de 100 complexes.

Composé N°	Code PDB du complexe	Code PDB du ligand	Valeur de l'RMSD(Å)	RMSD (Å) optimisé
01	7JRN	TTT	1.974	/
02	3RTT	KLH	1.216	/
03	4L4M	1XD	0.483	/
04	4O1B	DGB	0.925	/
05	3DHD	NMN	0.382	/
06	4L4L	1XC	0.401	/
07	2ANO	817	1.014	/
08	4EY7	E20	0.678	/
09	7K40	U5G	3.539	/
10	4MUU	1PE	0.674	/
11	7JIT	Y95	0.777	/
12	4M6Q	20T	0.803	/
13	4M7V	NAP	0.349	/
14	2BPM	529	2.128	1.748
15	3FRF	XCF	5.027	/
16	3M08	RAR	0.346	/
17	4LAH	1VO	0.457	/
18	4LEK	1DN	0.549	/
19	4HOE	18O	0.569	/
20	3M09	RAR	0.698	/
21	6G0W	EGW	0.198	/
22	4FGG	0U5	0.312	/
23	3QTW	X3A	0.744	/
24	5ISP	U06	0.517	/
25	3GHV	GHC	0.604	/
26	3NZD	D2Q	1.165	/
27	3NZA	D2K	2.610	0.139
28	1CLO	FAD	0.288	/

29	3NZC	D2O	1.168	/
30	3SRS	M23	0.881	/
31	3OAF	OAG	4.329	/
32	3S9U	5DR	2.594	2.006
33	3SAI	9DR	5.238	/
34	3SRU	Q26	0.589	/
35	3SRW	Q27	0.470	/
36	4KM0	CP6	3.915	/
37	4TU5	06W	0.485	/
38	4KEB	1QZ	2.145	1.901
39	2HBU	UN9	5.193	/
40	2R4B	GW7	1.114	/
41	4PS3	2WH	0.646	/
42	1K1M	FD4	0.910	/
43	4FR0	SAM	1.151	/
44	2FLS	GSH	2.658	1.909
45	2G5P	ADF	2.219	1.908
46	3FLS	FLS	1.578	/
47	3RTT	KLH	1.216	/
48	4EYH	DCP	0.892	/
49	7RNT	2AM	0.520	/
50	7RSA	TBU	1.223	/
51	5K00	6PV	0.421	/
52	1CIM	PTS	2.559	0.062
53	1CIN	MTS	2.572	0.063
54	1JSV	U55	3.364	/
55	1KE5	LS1	0.564	/
56	3S01	GOL	1.314	/
57	2ACK	EDR	2.717	1.126
58	4GL7	0XJ	0.706	/
59	2R3J	SCJ	2.881	2.507

60	4GL5	G29	0.965	/
61	1P4F	DRG	2.151	1.470
62	2XEY	YVQ	2.443	1.250
63	6GIP	EUN	0.513	/
64	3S00	Z60	1.413	/
65	5ZC5	09I	1.867	/
66	4JIA	1K3	0.759	/
67	3S79	ASD	0.924	/
68	2F89	210	2.180	0.078
69	5ZA7	HMX	2.050	0.047
70	5ZA8	27I	1.313	/
71	5ZA9	50I	2.076	0.083
72	5ZAE	EAU	1.811	/
73	5ZAF	28I	2.710	2.114
74	5ZAG	94I	0.875	/
75	5ZAH	30I	2.319	2.072
76	5ZAJ	32I	1.015	/
77	1ZVX	FIN	0.346	/
78	3S7S	EXM	0.877	/
79	3R8V	Z62	0.778	/
80	2XF0	4UB	2.224	1.839
81	2RIT	GOL	1.706	/
82	2RIX	UDP	2.051	0.068
83	2RIY	BHE	0.330	/
84	2RIZ	GOL	2.019	1.166
85	2RJ0	UDP	1.222	/
86	2RJ1	BHE	2.736	1.683
87	2RJ6	BHE	0.673	/
88	2RJ7	GDU	0.512	/
89	2RJ8	BHE	0.568	/
90	3QTZ	X42	0.328	/
91	5A6H	OE2	2.234	0.112
92	5G0B	GOL	1.615	/

93	3R8U	Z31	0.409	/
94	3R00	UNJ	1.157	/
95	3R01	UNE	0.475	/
96	3R02	UNM	0.583	/
97	3QTQ	X35	0.810	/
98	3QTR	X36	1.008	/
99	3QTS	X46	0.744	/
100	3QTU	X44	0.868	/

Présenté et soutenu par : - BRIKA Aya

Le : 13/07/2021

- CHARA Chaima

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

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

Recherche par docking moléculaire de nouveaux inhibiteurs de la protéase de type papaine (PLpro) du SARS-CoV-2

Résumé

En décembre 2019, un nouveau coronavirus était identifié dans la ville du Wuhan en Chine. Ce virus, responsable du syndrome respiratoire aigue sévère (SARS), se propage rapidement et provoque un effet catastrophique sur la population mondiale. Faisant appel aux méthodes de modélisation moléculaire et, plus particulièrement, au docking moléculaire par le logiciel Surflex, nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de l'enzyme PL protéase. Nous avons effectué des mono-substitutions et des bi-substitutions en introduisant des modifications dans la structure de l'inhibiteur de référence « (3R)-3-((S)-2-ethoxypentanamido)-1-(1-(2-fluorophenyl)ethyl)-3-methylpyrrolidinium » dont l'affinité est de 3.92 M^{-1} afin d'obtenir des composés présentant des affinités supérieures. Les résultats de cette opération ont permis de sélectionner les deux meilleurs composés dont le B11 avec une affinité de 5.74 M^{-1} et le composé B'4 avec 7.17 M^{-1} . Ensuite, nous avons évalué les propriétés physico-chimiques ainsi que le profil ADMET de ces composés via le serveur ADMETlab. Les résultats du profil ADMET n'étant pas satisfaisants pour les deux composés, nous avons effectué d'autres modifications pour essayer de les améliorer. Nous avons obtenu les composés C1 et C2 avec des affinités acceptables égales à 6.63 et 5.63 M^{-1} respectivement et présentant un bon profil ADMET. Ils peuvent être proposés comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de la PLpro. Cependant, des tests *in vitro* et *in vivo* sont indispensables pour valider ces deux molécules en tant qu'inhibiteurs de l'enzyme.

Mot clés: Coronavirus, SARS, docking moléculaire, Surflex, PL protéase, ADMET.

Laboratoire de recherche : Biochimie appliquée

Jury d'évaluation :

- **Président du jury :** Mr. BENSEGUENI A. (Professeur à UFM Constantine 1).
- **Rapporteur :** Mr. CHIKHI A. (Professeur à UFM Constantine 1).
- **Examineur :** Mr. MOKRANI E.H. (Maitre de conférences B à UFM Constantine 1).

Année universitaire: 2020/2021