



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العلمي والبحث العلمي



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et BCM

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيوكيمياء و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

Intitulé

Inhibition *in silico* de l'ARN polymérase NS5B pour combattre le virus de l'hépatite C

Présenté et soutenu par : Chikhi Kaouther

Le : 15 /06/2016

Ayadi Oumeima

Jury d'évaluation

Président du jury : BENSEGUENI A.

Professeur UFM Constantine

Rapporteur : MOKRANI E.H.

M.A.A UFM Constantine

Examineur : TENIOU S.

M.A.A UFM Constantine

Année universitaire
2015 / 2016

Remerciements

Avant tout, louange à Dieu tout puissant et Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance qui nous ont permis de finaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Nous tenons à remercier en premier lieu Pr Chikfi Abdelouahab pour sa précieuse aide, sa patience, sa gentillesse et sa disponibilité. Ses conseils éclairés nous ont été d'un grand secours tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous adressons notre profonde gratitude au Pr Bensegueni pour avoir accepté d'honorer le jury d'examineurs en qualité de président.

Nos remerciements les plus sincères sont adressés à notre Rapporteur, Mr Mokrani, pour l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant ce travail.

Nos remerciements les plus respectueux vont à M^{me} Teniou pour l'honneur qu'elle nous a accordé en examinant ce modeste travail.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère mère pour son amour et ses conseils précieux ;

*Mon adorable père comme témoignage de
ma reconnaissance pour tous les efforts qu'il n'a cessés de fournir pour mon
éducation et ma réussite ;*

Mes très chers frères ;

Mon cher oncle Abdelouahab et l'ensemble de ma grande famille ;

Tous mes amis depuis mon enfance jusqu'à aujourd'hui ;

Mes camarades de promotion ;

Ma chère amie et binôme « Oumeïma ».

Kaouther

Dédicaces

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots,
Que nous dédions ce modeste travail de fin d'étude à
Nos chers parents ; qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite et nous ont
éclairé le chemin par
leur conseil judicieux,
Nous espérons qu'un jour,
Nous pourrons leurs rendre un peu de ce
qu'ils ont fait pour nous, que dieu leur prête
bonheur et longue vie.
nous dédions aussi ce travail à mon frère, mon mari
ma familles, mes chers amies louiza, kaouther et madame N. Hadji.
tous nos professeurs qui nous ont enseigner
et à tous ceux qui nous sont chers.*

Ayadi Oumeima

Liste des abréviations

Å	Angström
IC50	Inhibitory concentration 50
logP	Le coefficient de partition
nOH,NH	Nombre de donneurs de liaisons H
nO,N	Nombre d'accepteurs de liaisons H
nrotb	Liaisons rotables
RMSD	Root-mean-square derivation
PDB	Protein data bank
PM	Poids moléculaire
r	Coefficient de corrélation
VHC	Virus de l'Hépatite C

SOMMAIRE

Introduction générale	01
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : L'HEPATITE C	
I. L'Hépatite virale	03
II. L'Hépatite C	03
II.1. Découverte du virus de l'Hépatite C	03
II.2. Modes de transmission du VHC	04
II.3. Epidémiologie de l'hépatite C	04
III. Virus de l'hépatite C	05
III. 1. Caractéristiques et classification	05
III.2. Organisation du génome	06
III.2.1. Régions non codantes	07
III.2.2. Région codant les protéines virales	07
III.2.3. Les protéines virales	08
III.2.3.1. Protéines structurales	08
III.2.3.2. Protéines non structurales	09
IV. Cycle de réplication	10
V. Variabilité génétique du VHC	11
VI. Traitements	12
Chapitre II : L'ARN POLYMERASE NS5B	
I. Les antiviraux d'action directe	13
II. La protéine NS5B	13
III. Les inhibiteurs de la polymérase	14
IV. Inhibiteur de l'ARN polymérase : le sofosbuvir	15
IV.1 Mécanisme d'action du sofosbuvir	15
IV.2 Effets indésirables du sofosbuvir	16
Chapitre III : LE DOCKING MOLECULAIRE	
I. La modélisation moléculaire	17
II. Reconnaissance moléculaire	18
III. Amarrage moléculaire (ou docking)	18
IV. Les différents types de docking moléculaire	19

V. Applications du docking	19
VI. Programmes du docking les plus cités	19
VII. Programme utilisé : Surflex-dock	20
PARTIE PRATIQUE	
Chapitre IV : Matériels et méthodes	
I. Matériels et méthodes	22
I.1 Matériels	22
I.2 Méthodes	22
I.2.1. Le protocole d'utilisation du programme: Surflex-dock	22
1) L'identification du site actif par construction d'une pseudo-molécule	22
2) Docking du ligand	23
3) Calcul du RMSD	23
I.2.2. Tests d'évaluation du programme utilisé : Surflex-dock	23
I.2.2.1. Le test du RMSD	23
I.2.2.2. Le test du coefficient de corrélation	24
I.2.3. Les mono et les bi-substitutions du Sofosbuvir	26
I.2.4. Etude des propriétés pharmacologique et toxique des composés ayant la meilleure inhibition	26
Chapitre V : RESULTAT ET DISCUSSION	
I. La fiabilité du programme Surflex-dock	26
II. Les substitutions du sofosbuvir	28
II.1. Les mono substitutions	29
II.2. Les bi substitutions	30
III. La règle de Lipinski	32
IV. Etude des interactions des composés testés	33
IV.1. Interactions de la molécule de base : Le sofosbuvir	33
IV.2. Interactions du composé N° 27	35
IV.3. Interactions du composé N° 26	36
IV.4. Interactions du composé N° 04	37
IV.5. Interactions du composé N° 17	39
Conclusion générale	45
Références bibliographiques	47
Annexe	61
Résumés	65

Introduction

L'hépatite C est une inflammation du foie provoquée par le virus VHC. Ce virus est considéré potentiellement dangereux vu qu'il risque de faire évoluer la maladie vers une cirrhose, voire un cancer du foie.

En Algérie, la prévalence de l'hépatite C est de 1%, soit 400 000 personnes potentiellement infectées dont plus de 70% sont concernées par le génotype 1. (DK news, 2015)

Jusqu'à aujourd'hui, les chercheurs n'ont pu mettre au point ni vaccin ni un traitement efficace qui guérit l'hépatite C à 100%. (OMS, 2015)

L'attention des chercheurs se dirige actuellement vers un nouveau type de traitement qui tend à remplacer la bithérapie classique par les interférons et la ribavirine. Il s'agit des antiviraux d'action directe qui ciblent les protéines virales indispensables pour le processus vital du virus. A ce titre, plusieurs protéines sont apparues comme cibles privilégiées mais c'est l'ARN polymérase NS5B qui semble intéresser beaucoup plus les scientifiques car nécessaire pour la copie de l'ARN génomique du VHC et la transcription de l'ARNm (Gosert, et *al.*, 2003).

Le sofosbuvir est une molécule inhibitrice de l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B du VHC (Gilead, 2013). Ce traitement a été commercialisé pour la première fois en 2013 sous le nom de Sovaldi par le laboratoire américain Gilead Sciences, et depuis ce jour, plusieurs génériques du Sofosbuvir ont apparus.

En Algérie, le laboratoire Beker a réussi dernièrement à mettre sur le marché un générique de ce médicament, hors licence, sous le nom commercial de Sofos 400. Les responsables du laboratoire déclarent que ce médicament a une efficacité prouvée de 95% pour une durée de traitement relativement courte de 12 semaines. (Journal El watan, 2015)

Malgré ces résultats révolutionnaires, le traitement avec le sofosbuvir engendre quelques effets indésirables comme : la fatigue, les maux de tête, les nausées et l'insomnie. En plus, Le sofosbuvir n'est efficace qu'en association avec d'autres molécules, principalement la ribavirine (HAS, 2006), sans oublier le prix exorbitant du

traitement qui s'élève à 294,000 DZD et à 488,000DZD, en trithérapie, pour le génotype1. (Journal El watan, 2015)

Les limites de ce traitement imposent de développer de nouvelles molécules qui tiennent compte à la fois de l'efficacité du traitement, pour tous les génotypes du virus, mais aussi du prix du traitement.

Ces dernières années ont vu la recherche pour découvrir de nouveaux traitements se démarquer de la procédure d'essai-erreur vers une procédure plus sophistiquée incluant plusieurs approches basées sur des calculs théoriques de la chimie quantique.

Ces approches théoriques permettent de prédire le mode d'interaction d'un ligand avec son récepteur. Elles fournissent le moyen d'étudier les interactions au niveau moléculaire et sont, de ce fait, une indication sur l'activité biologique de nouvelles molécules ne tenant compte que des critères structuraux. Parmi ces approches on retrouve la technique du « docking moléculaire ».

Le docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe constitué d'un ligand et d'une protéine pour prévoir les modes d'interactions possibles pouvant mener à une valeur d'enthalpie libre de formation qui traduit l'inhibition de la cible étudiée. Les anciens formalismes de docking moléculaire traitent la protéine ainsi que le ligand comme des corps rigides. A présent, les nouveaux codes prennent en compte la flexibilité du ligand.

Notre projet de fin d'études s'inscrit justement dans ce contexte : Il s'agit de contribuer à trouver des nouvelles molécules inhibitrices par substitution à partir de la formule initiale du Sofosbuvir, disponible sur la pdb, en utilisant la technique du docking moléculaire.

Notre travail pratique porte, dans un premier temps, sur le choix d'un logiciel performant spécialisé dans le docking moléculaire. Notre choix s'est porté sur le programme Surflex-dock sur lequel nous procédons deux tests pour évaluer sa fiabilité.

Dans un second temps, il s'agira d'étudier l'inhibition de l'ARN polymérase NS5B par les mono-substituants de la molécule Sofosbuvir en utilisant les méthodes de docking moléculaire. Nous nous intéressons à déterminer le mode d'interaction, lors de la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme durant la formation du complexe ARN polymérase NS5B-inhibiteur, avec une meilleure complémentarité par le calcul de l'affinité du complexe formé. Le complexe qui aura la plus grande affinité est celui qui présentera la meilleure activité et par la suite une meilleure inhibition.

Ces résultats aideront probablement au développement d'un outil thérapeutique efficace pour lutter contre le développement de l'hépatite C.

Dans ce manuscrit notre travail sera organisé en deux parties :

- **Partie bibliographique:** dans laquelle le virus et ses caractéristiques seront décrits afin de définir les cibles thérapeutiques possibles. Nous décrirons ensuite la technique de la modélisation moléculaire utilisée pour l'étude des interactions protéine-ligand.

- **Partie pratique:** dans laquelle nous présentons les différents matériels et méthodes utilisés dans notre étude. Nous y exposerons également l'essentiel de nos résultats qui seront interprétés et discutés.

I. L'Hépatite virale

Une hépatite virale est définie comme étant un processus inflammatoire du foie lié à un virus. Actuellement, cinq virus sont connus comme étant les agents étiologiques d'une hépatite : les virus des hépatites A à E (hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), hepatitis D virus (HDV) et hepatitis E virus (HEV)). Afin d'identifier lequel de ces virus est l'agent causal d'une hépatite, des tests sérologiques sont nécessaires. En effet, bien qu'appartenant à des familles différentes (d'un point de vue classification), tous ces virus induisent une hépatite aiguë. Mais, seuls les virus des hépatites B, C et D (HBV, HCV et HDV) induisent une infection chronique pouvant durer de nombreuses années. Toutefois, chez des patients immunodéprimés, de rares cas d'infections chroniques ont déjà été observés pour le HEV (Bihl et Negro, 2009 ; de Niet et *al.*, 2012).

II. L'Hépatite C

II.1. Découverte du virus de l'hépatite C

En 1974, des tests sérologiques furent développés pour détecter la présence du virus de l'hépatite A (VHA) ou de l'hépatite B (VHB) chez les patients atteints d'hépatite. L'année suivante, Feinstone et son équipe testèrent la présence d'anticorps dirigés contre divers virus dans le sang de patients ayant contracté une hépatite après transfusion. Il s'avéra que certains patients ne produisaient pas d'anticorps dirigés ni contre les virus des hépatites A (VHA) ou B (VHB), ni contre le Virus Epstein Barr (VEB). Ils mirent donc en évidence l'existence d'un ou de plusieurs nouveaux agents inconnus causant des hépatites, baptisés « Hépatites Non A Non B » ou « HNANB » (Feinstone et *al.*, 1975).

L'avancée majeure fut la caractérisation du génome du virus en 1989 par Choo et son équipe (Choo et *al.*, 1989) grâce aux techniques de biologie moléculaire. Ils utilisèrent du sérum de chimpanzés infectés par l'agent causal des « HNANB » pour produire une large banque d'ADNc qui fut clonée dans un bactériophage λ gt11. Cette banque d'expression fut alors criblée par des sérums de patients humains atteints de « HNANB ». Les auteurs isolèrent le clone 5.1.1, codant un antigène reconnu par les sérums de plusieurs patients. Par ailleurs, Choo et son équipe montrèrent que l'ADNc correspondant ne dérivait pas d'un ARN codé par le génome de primate, démontrant ainsi son origine virale. L'agent causal des « HNANB » ainsi identifié, prit alors le nom de VHC (Virus de l'hépatite C). Au cours de la même année, KUO et *al.* mirent au point un test ELISA pour détecter la présence du VHC chez des patients

et montrèrent que ce virus était la principale cause des « HNANB » transfusionnelles à travers le monde (Kuo et *al.*, 1989).

II.2. Modes de transmission du VHC

Le virus de l'hépatite C est essentiellement transmissible par voie parentérale. Il y a donc une prévalence considérable à l'échelle mondiale chez les personnes transfusées avec du sang non testé (Alter, 1978 ; Pomper, 2003), et les toxicomanes qui réutilisent les seringues souillées (Sutton, 2008).

La transmission materno-foetale représente 3% des cas d'infections chez le nouveau né mais uniquement chez des mères virémiques (Ohto et *al.*, 1994). Cependant, certains facteurs de risques notamment ceux liés à la co-infection avec le VIH, seraient à l'origine d'un taux de transmission élevé (Mast et *al.*, 2005).

II.3. Epidémiologie de l'hépatite C

Selon l'OMS (2004), 170 millions de personnes (soit 3% de la population mondiale) seraient infectées par le VHC dont 80% souffrant d'hépatite C chronique. Le VHC est un virus ubiquitaire mais sa prévalence varie d'une région à une autre, d'un pays à un autre. Dans les pays industrialisés comme l'Australie, le Canada et l'Europe du Nord, la prévalence du VHC est faible et inférieure à 1% (Sy et *al.*, 2006 ; Sherman et *al.*, 2007). Elle est d'environ 1% dans les pays de faible endémicité comme les Etats Unis d'Amérique (Charlton, 2001 ; Armstrong et *al.*, 2006).

En Afrique, la séroprévalence du VHC varie en fonction des zones géographiques. Ainsi, l'Afrique de l'Ouest et l'Afrique centrale paraissent être des zones de haute endémicité avec des prévalences supérieures à 8%. Au nord du continent, la séroprévalence est modérée dans le Maghreb (Nicot et *al.*, 1997). En Algérie, la prévalence du VHC est de 1% de la population globale.

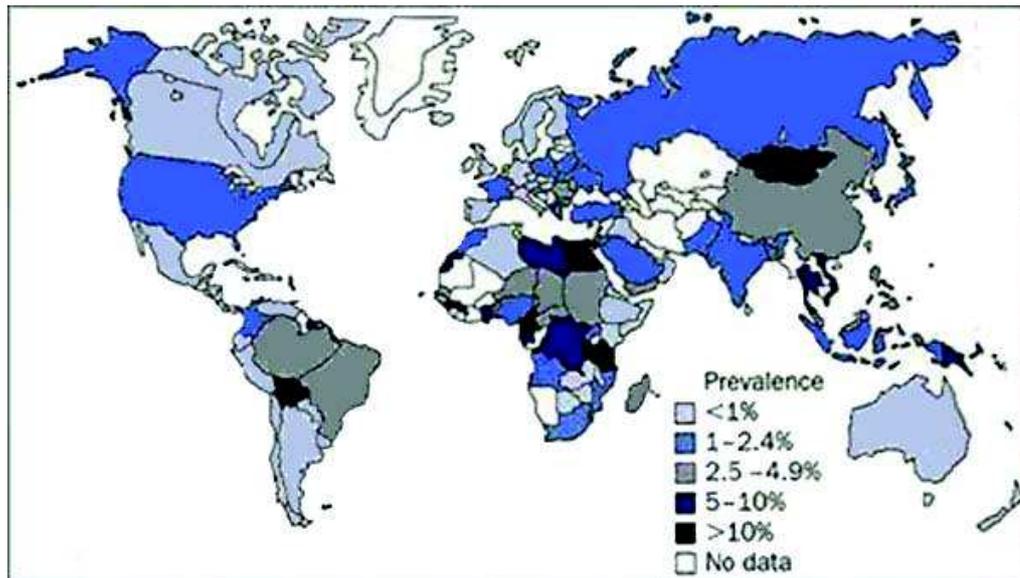


Figure 01 : Prévalence globale du virus de l'hépatite C (OMS, 2004)

III. Virus de l'hépatite C

III. 1. Caractéristiques et classification

Le virus de l'hépatite C appartient à la famille des Flaviviridae et au genre hépacivirus (Lemon *et al.*, 2007 ; Choo *et al.*, 1991). La famille des Flaviviridae est constituée de virus enveloppés, sphériques, d'environ 40-50 nm de diamètre, dont le génome est formé d'ARN linéaire simple brin de 10 à 12kb. Cette famille regroupe trois genres (Flavivirus, Pestivirus, Hépacivirus). Le virus de la fièvre jaune, premier virus connu de cette famille, lui a donné son nom (du latin flavus, jaune). Les Flaviviridae les plus importants en termes de santé publique sont le virus de la fièvre jaune, de la dengue, de l'encéphalite japonaise, le virus West Nile et le virus de l'Hépatite C. Les Flaviviridae se transmettent par des vecteurs arthropodes (essentiellement tiques et moustiques) à l'exception du virus de l'Hépatite C qui se transmet par voie sanguine.

Le VHC est un virus au tropisme restreint, infectant essentiellement les hépatocytes (Huang *et al.*, 2007 ; Molina *et al.*, 2007 ; Flint *et al.*, 2006) mais retrouvé également dans les cellules dendritiques (Cosset, 2006) et dans les cellules mononuclées du sang (Moenne *et al.*, 2010 ; Navas *et al.*, 1998).

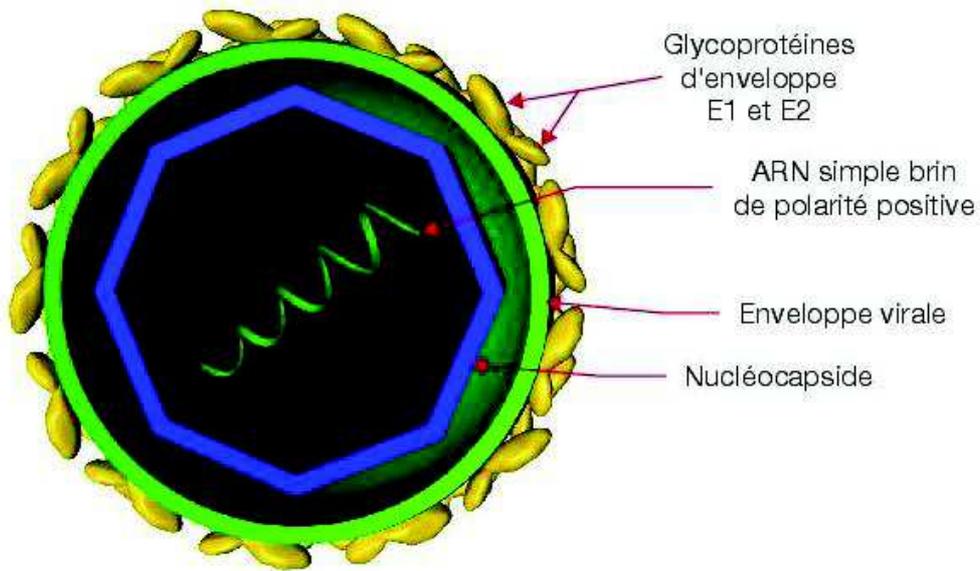


Figure 02 : Représentation schématique du VHC (Helle et Cocquerel, 2008)

III.2. Organisation du génome

Le génome du VHC est constitué d'un ARN monocaténaire, de polarité positive, d'une taille de 9600 nucléotides environ. Les régions non codantes (NC) situées aux extrémités 5' et 3' du génome encadrent une phase de lecture unique qui code une polyprotéine de 3000 acides animés environ (Paul et Dominique, 2003).

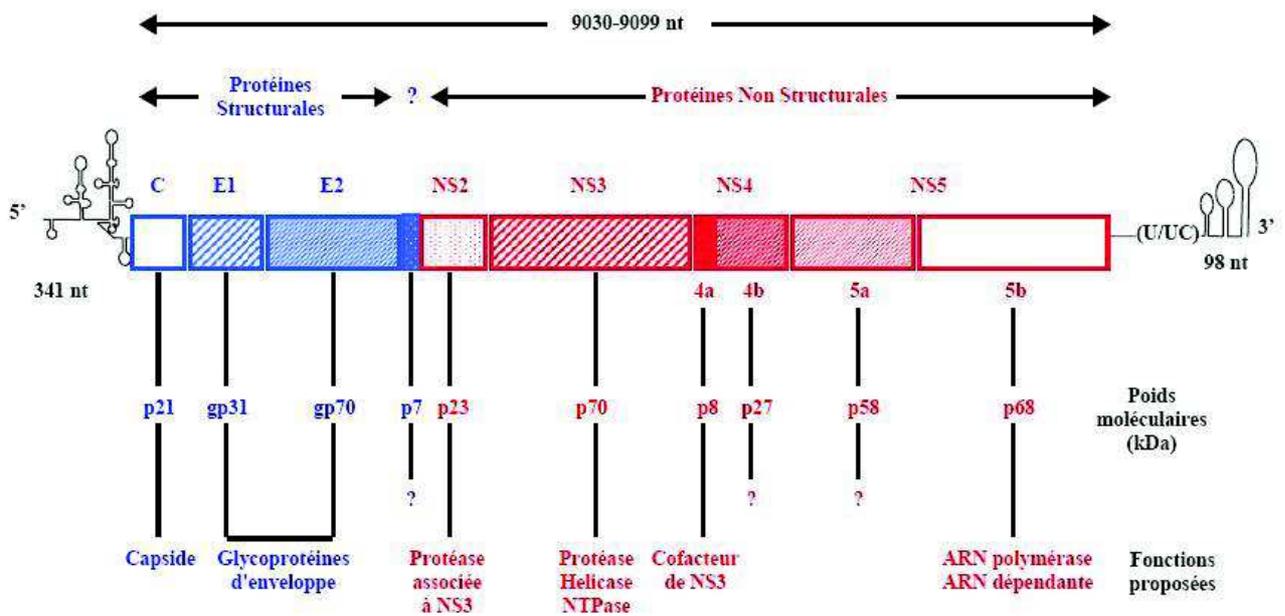


Figure 3 : Organisation génomique du VHC (Imbert et al., 2004)

III.2.1. Régions non codantes

III.2.1.1. Région 5' non codante (5'NC)

La région 5' non codante est constituée de 341 à 349 nucléotides selon les isolats et comprend 3 à 5 codons AUG non initiateurs et 4 domaines (I à IV) riches en structures tiges-boucles (Honda *et al.*, 1999). Le domaine I est le moins conservé ; les domaines II, III et IV forment le site interne d'entrée du ribosome (internal entry ribosome site, IRES) qui joue un rôle important dans l'initiation de la traduction (Friebe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). L'IRES permet aussi aux ribosomes de se fixer directement au niveau du codon AUG initiateur, assurant ainsi une traduction immédiate. Son extrémité 5' dépourvue de coiffe méthylée présente un repli en épingle à cheveux de 27 nucléotides qui jouerait un rôle dans la régulation négative de la traduction des protéines virales (Boehringer *et al.*, 2005 ; Fraser et Doudna, 2007). Des mutations mêmes mineures dans les domaines II et III, et, particulièrement dans le pseudo-nœud réduisent substantiellement l'activité de l'IRES (Hellen et Sarnow, 2001). Le domaine IV est constitué d'une tige- boucle et contient le codon initiateur AUG.

III.2.1.2. Région 3' non codante

L'extrémité 3' du génome comporte trois régions successives, de 5' en 3' : (1) une région non traduite d'environ 30 nucléotides, variable d'une souche virale à l'autre ; (2) une région poly- U/C de longueur variable ; (3) une région 3' terminale très conservée de 98 nucléotides, la région X, repliée en trois tiges-boucles successives. La queue poly-U/C et la région X sont essentielles à la réplication du virus *in vivo* (Kolykhalov *et al.*, 1996). La région 3' non codante non seulement permet l'initiation de la synthèse du brin négatif de l'ARN viral, mais aurait également un rôle régulateur dans la traduction de l'ORF (Kolykhalov *et al.*, 1996)

III.2.2. Région codant les protéines virales

La région 5' non codante est suivie d'un cadre de lecture ouvert unique débutant par un codon AUG initiateur de la traduction situé au nucléotide 342. Il comporte 9024 à 9111 nucléotides et permet la synthèse d'une polyprotéine qui donne naissance, après une phase de maturation assurée par des protéases cellulaires et virales, à 10 protéines : des protéines

structurales (S) dans la partie N-terminale (Capside, E1 et E2) et des protéines non-structurales (NS) dans la partie C-terminale (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B)

Dans la séquence codante de la séquence de la protéine de capsid, deux protéines supplémentaires semblent être produites : la protéine F (ou ARFP pour « alternate reading frame protein ») résultant d'un décalage $-2/+1$ de la phase de lecture principale [Xu, Z., et al., 2001 ; Vassilaki et Mavromara 2003], et la protéine « miniCore » dont la production, décrite par des travaux très récents, résulterait d'une seconde activité IRES entre les codons 56 et 154 (Eng et al., 2007).

III.2.3. Les protéines virales

Le cadre de lecture de l'ARN code pour une poly-protéine d'environ 3000 acides aminés qui est secondairement clivée par les protéases cellulaires et virales pour générer sept protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) et trois protéines structurales (une protéine de capsid C et deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2) (Penin et al., 2004 ; Chooq et al., 1991).

III.2.3.1. Protéines structurales

- ❖ **Protéine de capsid** ou protéine C constituant la nucléocapsid virale. C'est la première protéine structurale codée par le génome du HCV La protéine C mûre du HCV s'associe aux gouttelettes lipidiques et induit une accumulation lipidique intracellulaire (Ait-Goughoulte, 2006 ; Boulant, 2006 ; Jhaveri, 2009). Elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la libération des virus infectieux et intervient également au moment du désassemblage des particules virales lors de l'entrée dans la cellule (Penin, 2004b; Miyanari, 2007; Shavinskaya, 2007).

- ❖ **Les protéines d'enveloppe E1 et E2** sont les constituants principaux de l'enveloppe. (Dubuisson, 2002). Elles participent à l'entrée cellulaire du HCV en se fixant aux récepteurs cellulaires et en induisant la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes cellulaires de l'hôte (Op De Beeck, 2001). La protéine E2 est la cible préférentielle de la réponse immunitaire. Trois régions hypervariables (HVR) ont été identifiées dans la séquence E2: la région HVR1, à la partie N-terminale est constituée de 27 AA, la région HVR2 constituée de 9 AA et plus récemment la région HVR3, comprise entre les régions HVR1 et HVR2, constituée de 35 AA (Troesch, 2006).

Cette dernière est moins variable que les 2 autres. D'un point de vue conformationnel, la région HVR1 est très conservée ce qui est cohérent avec le rôle qu'elle joue en tant que cible de la réponse immune et dans l'attachement du virus à la cellule (Penin, 2001).

III.2.3.2. Protéines non structurales

- ❖ **La protéine F (frameshift) ou ARF (alternative reading frame) ou core+1.** Cette protéine a une durée de vie très courte, environ 10 min (Roussel, 2003). La détection d'anticorps et de cellules T spécifiques de la protéine F chez des patients infectés par le HCV suggère qu'elle est exprimée pendant l'infection HCV in vivo (Gao, 2008). Elle n'est pas essentielle à la réplication virale ou à la production de virus infectieux (Vassilaki, 2008) mais pourrait agir comme un facteur de régulation (Branch, 2005).
- ❖ **La protéine P7** est issue d'un clivage incomplet à partir de la protéine E2. Ces fonctions sont encore mal connues. Cette protéine s'oligomérisse pour former un canal ionique d'où son assimilation aux viroporines (Griffin, 2003; Clarke, 2006; Luik, 2009). Elle semble nécessaire à l'infection mais pas à la réplication de l'ARN. Elle est essentielle à l'assemblage des particules virales et aussi à la libération des virions (Steinmann, 2007).
- ❖ **La NS2-3** protéase est une autoprotéase responsable du clivage entre les protéines non structurales NS2 et NS3. C'est un facteur essentiel du cycle réplcatif du HCV in vitro et in vivo (Pietschmann, 2006).
- ❖ **Le complexe NS3-4** : NS3 est une protéine multifonctionnelle qui possède une activité sérine protéase et hélicase/NTPase. Le polypeptide NS4A fonctionne comme cofacteur de la sérine protéase. Le complexe sérine protéase NS3/4A permet le clivage des protéines non structurales qui se trouvent en aval de NS3. NS3 intervient dans de nombreuses interactions hôte-pathogène et est une cible majeure des nouveaux anti-viraux. L'hélicase NS3 participe à la séparation des ARN double brin ou au déroulement des structures secondaires. Récemment, NS3 a été impliquée dans les étapes précoces de la morphogénèse des virions. Elle intervient dans le recrutement de NS5A aux gouttelettes lipidiques et la formation de particules virales intracellulaire.

Des mutations d'adaptation peuvent chez un virus qui a perdu cette capacité restaurer cette propriété (Ma, 2008).

- ❖ **La protéine NS4B** est mal connue. Elle participe à l'association des membranes mais également à l'altération des membranes intracytoplasmiques pour former des complexes membranaires supportant la réplication virale appelés « complexes de réplication ». Leur formation dépend de certains résidus situés sur la partie C-terminale de la protéine NS4B (Aligo, 2009).

- ❖ **La protéine NS5A** : NS5A est une phosphoprotéine fixant les ARN (Brass, 2002; Penin, 2004a). Le domaine III a récemment été identifié comme élément clé dans l'assemblage des particules virales (Appel, 2008). La délétion de ce domaine a pour conséquence l'arrêt de la formation de virions infectieux et l'accumulation de protéines C à la surface des gouttelettes lipidiques. Le domaine III de NS5A est une des régions les plus variables du génome HCV. NS5A a aussi été impliquée dans la régulation de la réponse interféron et interagirait avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

- ❖ **La protéine NS5B** est une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) qui joue le rôle de catalyseur au sein de la machinerie de réplication du HCV. NS5B est capable d'initier la synthèse d'ARN de novo in vitro et il semblerait que ce soit également le cas in vivo (Bartenschlager, 2004). Les études de cristallographie montrent une structure pouce-paume-doigts commune à la plupart des polymérases (Bressanelli, 1999). Cette protéine est une cible majeure des nouvelles molécules anti-HCV.

IV. Cycle de réplication

Les cellules hépatocytaires sont le site principal de réplication virale du HCV.

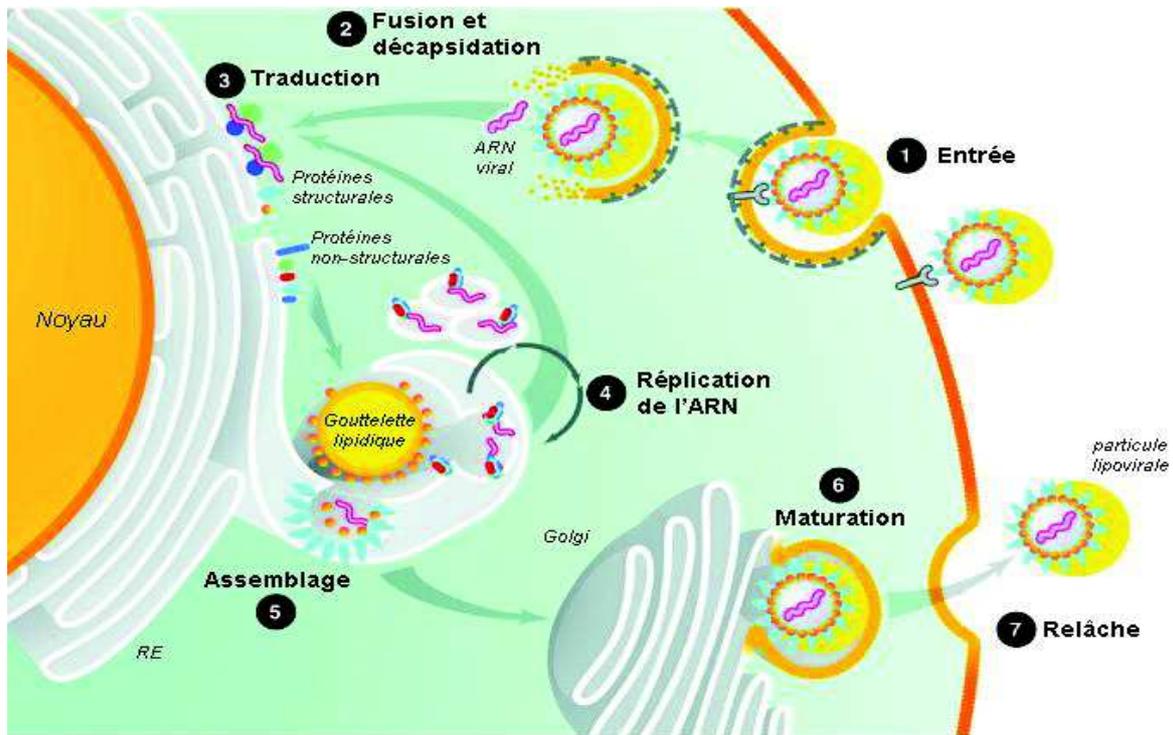


Figure 04. Cycle de réplication du VHC.

Après interaction avec les récepteurs de surface de la cellule-hôte, le virus associé à une lipoprotéine est internalisé (1) puis décapsidé, libérant ainsi l'ARN viral dans le cytoplasme (2). L'ARN viral est traduit via le site interne d'entrée du ribosome et la polyprotéine ainsi produite est ensuite traduite puis clivée en protéines structurales et non-structurales matures (3). La réplication de l'ARN viral s'opère au sein d'un réseau membranaire, généré en partie par l'action de NS4B (4). S'ensuivent les étapes d'encapsidation et d'assemblage à proximité des gouttelettes lipidiques bourgeonnantes (5). Après maturation (6), les virions (particules lipovirales) sont ensuite relâchés à l'extérieur de la cellule (7) (Adapté de Herker et Ott, Trends in Endocrinology and Metabolism, 2011).

V. Variabilité génétique du VHC

La variabilité génétique du VHC est la cause de l'évolution darwinienne du virus c'est-à-dire que la diversification permanente des populations virales conduit à leur compétition et à la sélection continue des variants viraux les mieux adaptés à leur environnement répliatif. Ce phénomène est favorisé par :

- ✓ L'abondante production virale au cours de l'infection (~10¹² virions/jour [Neumann et al., 1998]) ;
- ✓ La grande taille des populations virales ;

- ✓ Le taux élevé de mutations générées au cours de la réplication [Domingo, 1998 ; Duarte, et *al.*, 1994].

Classification des géotypes

L'analyse phylogénique de séquences partielles ou complètes de souches virales isolées dans les cinq continents a permis d'identifier 6 groupes principaux, appelés « types » ou clades, numérotés de 1 à 6, et plus d'une centaine de « sous-type » ou « sous-clades », identifiés au sein de chaque type par une lettre minuscule (1a, 1b, 1c, etc.) (Robertson, et *al.*, 1998).

VI. Traitements

Il n'existe toujours pas de vaccin pour prévenir l'infection au VHC et les traitements thérapeutiques actuellement disponibles n'ont qu'une efficacité restreinte. En effet, le traitement standard, qui consiste en une combinaison d'interféron- α pégylé (Peg-IFN α) et de ribavirine, induit une réponse virologique soutenue (SVR, sustained virological response) pour 80% des patients infectés avec le géotype 2 et 3 mais pour seulement 50% dans le cas du géotype 1, le plus prévalent en Amérique du Nord et en Europe (Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004; Manns et al., 2001). L'avancement des connaissances sur le cycle de vie du VHC et sur les fonctions biologiques des protéines virales a permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, des agents antiviraux ciblant directement les protéines du virus ont été développés (DAA, direct-acting antiviral). Récemment, l'ajout d'inhibiteur de protéase virale (telaprevir ou boceprevir) à la thérapie standard a amélioré le taux de réponse, même si les effets adverses dus à l'IFN et à la ribavirine persistent (Welsch et al., 2012). L'utilisation des DAAs sans IFN a également été envisagée. Cependant, le VHC est capable de muter rapidement et devenir résistant aux DAAs (Rong et al., 2010). La combinaison de plusieurs de ces agents permettrait de réduire les risques d'apparition de résistance. Des stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition de facteurs de l'hôte nécessaires à la réplication du virus (microARN 122 et cyclophilines) sont également en cours de développement (Coelmont et al., 2010; Lanford et al., 2010).

Depuis plusieurs décennies, divers médicaments ont été proposés pour supprimer la réplication virale C. L'interféron alpha, la ribavirine puis les antiprotéases (bocéprévir et télaprévir pour les patients de génotype 1) ont été associées, permettant ainsi d'obtenir la disparition de la virémie dans environ la moitié des cas, au prix d'un traitement prolongé (6 à 12 mois) et souvent mal toléré. Une nouvelle génération d'antiviraux d'action directe est aujourd'hui mise à disposition des médecins et des malades. Il s'agit de médicaments qui ont, pour certains, une activité pan-génotypique avec un meilleur profil de tolérance que les thérapies existantes.

I. Les antiviraux d'action directe

Les Antiviraux d'action directe sont Actuellement, parmi, les principales classes thérapeutiques en développement pour vaincre le virus de l'hépatite C.

Les antiviraux d'action directe ciblent les protéines virales indispensables pour la réplication et le cycle cellulaire du virus comme la protéase NS3/4A, la protéine multifonctionnelle NS5A et la polymérase NS5B (Soriano, 2011).

II. La protéine NS5B

NS5B, comme la plupart des protéines du VHC, est une protéine associée aux membranes via un court domaine transmembranaire dans sa région C-terminale (Schmidt-Mende *et al.*, 2001).

NS5B est une protéine de 591 résidus et correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) [(Behrens *et al.*, 1996), (Lohmann *et al.*, 1997)]. Elle a pour fonction de synthétiser de l'ARN à partir d'ARN. La structure 3D de NS5B montre un repliement comparable à ceux d'autres protéines RdRp connues, présentant la forme d'une main que l'on divise en trois sous-domaines appelés : paume, doigts et pouce [(Ago *et al.*, 1999) (Bressanelli *et al.*, 1999), (Lesburg *et al.*, 1999)] (Figure 05). Le site actif se situe au niveau de la paume, tandis que les doigts et le pouce favorisent l'interaction avec l'ARN. L'initiation de la réplication nécessite la présence du complexe de réplication impliquant d'autres protéines non structurales (NS3, NS5A). Les RdRps sont des enzymes dépourvues d'activité correctrice, ce qui explique la grande diversité génétique du VHC au sein d'un même individu.

Notons toutefois que NS5B fait l'objet de recherches particulièrement intenses, car elle est une cible intéressante et prometteuse afin de développer des inhibiteurs efficaces de la réplication virale. L'obtention de ces inhibiteurs associés à d'autres moyens de thérapies permettrait certainement de supprimer le virus présent chez le patient.

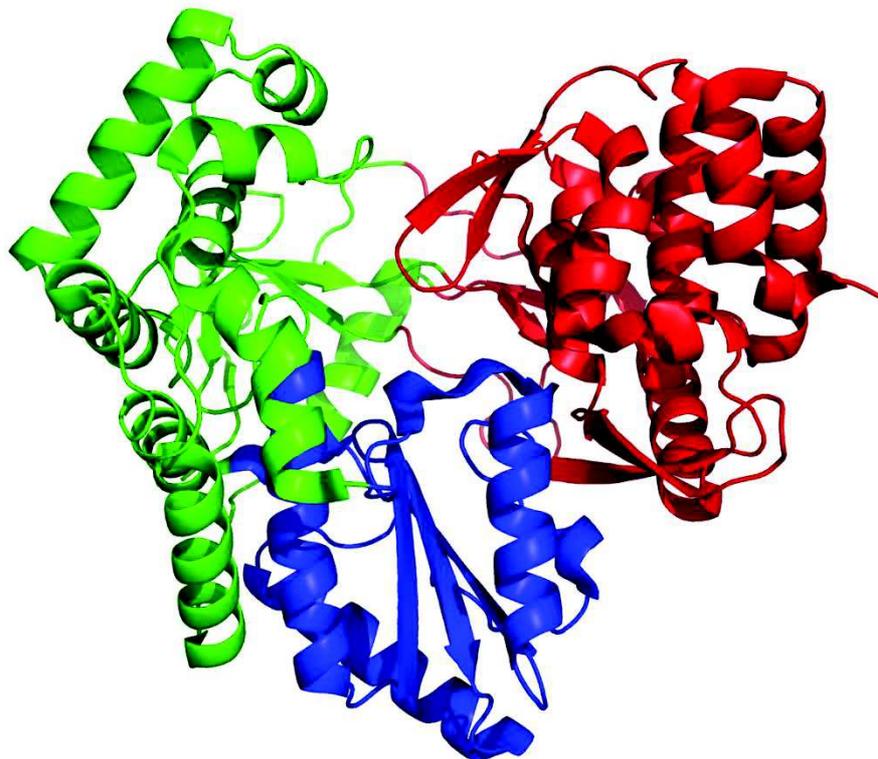


Figure 05 : Structure de la protéine NS5B, formée de la paume (en bleu), du pouce (en rouge) et des doigts (en vert). (PDB ID : 1GX6).

III. Les inhibiteurs de la polymérase

Pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) NS5B, il existe deux types d'inhibiteurs. Les analogues nucléosidiques/nucléotidiques qui bloquent cette enzyme en se fixant au niveau de son site actif et les inhibiteurs allostériques ou non-nucléosidiques/non-nucléotidiques, qui inhibent l'activité de l'enzyme en se fixant à distance du site actif.

- **Les inhibiteurs nucléos(t)idiques**

Les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de l'ARN polymérase NS5B sont des analogues ciblant le site actif de cette protéine virale. Afin d'être actifs intracellulairement, ces composés nécessitent respectivement deux et trois étapes de phosphorylation. Ces molécules agissent comme des leurres pour la RdRp en induisant, suite à leur incorporation une terminaison précoce de l'ARN en cours de synthèse. De manière importante, le site actif de la RdRp est très conservé entre les différents génotypes viraux ce qui explique l'activité pangénotypique de ces molécules. Actuellement, différents inhibiteurs sont en cours d'essais cliniques. Par exemple, l'inhibiteur GS-7977, un analogue de l'uridine, a été utilisé en combinaison avec la bithérapie standard, dans une étude clinique de phase IIb. Cet inhibiteur arbore une SVR de 91% chez des patients infectés avec le génotype 1 n'ayant jamais été traités auparavant (Lawitz et *al.*, 2011). Parmi ces inhibiteurs nucléotidiques, certains ne nécessitent qu'une prise journalière : les molécules PSI-7977 (Pharmasset/Gilead), IDX-184 (Idenix) et PSI-938 (Pharmasset/Gilead). De plus, chez les patients infectés avec le génotype 1, les inhibiteurs PSI-7977 et PSI-938 diminuent le niveau d'ARN du HCV (Lawitz et *al.*, 2011).

- **Les inhibiteurs non-nucléos(t)idiques**

Les inhibiteurs non-nucléosidiques/non-nucléotidiques se lient sur l'un des quatre sites allostériques de la polymérase virale. Parmi ces inhibiteurs, les molécules BILB1941 (Boehringer-Ingelheim), MK-3281 (Merck), BI207127 (Boehringer-Ingelheim), VX-222 (Vertex), le sétrobuvir (ANA598) et le tégobuvir (GS-9190 - Gilead) sont retrouvées. Pour ces inhibiteurs de la polymérase virale, des mutants de résistance ont été observés, soit *in vitro*, soit *in vivo*.

IV. Inhibiteur de l'ARN polymérase : le sofosbuvir

Le sofosbuvir est un analogue nucléotidique de la pyrimidine qui inhibe l'ARN polymérase NS5B. Il a été développé par Gilead à la suite de l'acquisition de Pharmasset en 2011.

IV.1 Mécanisme d'action du sofosbuvir

Le sofosbuvir est un inhibiteur pangénotypique de l'ARN polymérase ARN-dépendante NS5B du VHC, qui est essentielle pour la réplication du virus. Le sofosbuvir est la pro-drogue d'un nucléotide qui subit une métabolisation intracellulaire pour former un analogue

de l'uridine triphosphate, le GS-461203, métabolite actif du sofosbuvir, qui peut être incorporé dans l'ARN viral par la polymérase NS5B et qui agit comme facteur de terminaison. Le sofosbuvir n'inhibe pas les ADN- et ARN-polymérases humaines, ni l'ARN-polymérase mitochondriale (Gilead, 2013).

IV.2 Effets indésirables du sofosbuvir

Le sofosbuvir a été étudié principalement en association avec la ribavirine, avec ou sans pegIFN.

Les effets indésirables les plus fréquemment survenus ont été la fatigue, les maux de tête, les nausées et l'insomnie (Gilead, 2014). A cela s'ajoutent les effets indésirables dus à la ribavirine et au pegIFN le cas échéant.

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. L'identification et la mise au point d'une molécule possédant l'activité biologique recherchée se fait lors du développement préclinique. Elles nécessitent, entre autres, l'investigation de ses propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, et se basent de plus en plus sur des approches informatisées *in silico*, dont les résultats se retrouvent *in vitro* et *in vivo*, dans des cellules voire des organismes modèles. L'un de ces outils informatiques est la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire. Celui-ci consiste à prédire et à reproduire les interactions protéine-ligand (Wodak et Janin, 1978), ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales.

I. La modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire regroupe l'ensemble des techniques de visualisation des molécules, de calcul de leurs conformations et de simulation de leur comportement. Les outils de modélisation moléculaire sont particulièrement performants pour l'étude au niveau atomique d'interactions entre deux entités moléculaires. Ce type d'étude fait appel le plus souvent aux techniques de "docking" (Buléon et *al.*, 2011).

La modélisation moléculaire trouve de nos jours d'importantes applications, parmi les quelles deux applications classiques sont :

- Le développement de nouveaux médicaments : le mécanisme d'action de nombreux médicaments consiste à agir comme inhibiteurs (ligand) d'une enzyme (récepteur) impliquée dans le développement de la maladie, que ce soit une protéine d'un organisme pathogène ou du propre organisme humain. L'élucidation de la structure tridimensionnelle des protéines impliquées dans plusieurs pathologies a permis, via des simulations informatiques, la découverte d'inhibiteurs puissants pour ces pathologies, en réduire considérablement le nombre d'essais de screening nécessaires pour aboutir à un nouveau médicament [(McCarthy, 1999) et (Geldenhuis, 2006)].
- La rationalisation de l'énergie enzymatique : le fondement est le même que celui du développement du médicament : en permettant d'étudier les interactions entre les substrats

(ligand) et les enzymes (récepteurs), la modélisation moléculaire apporte une meilleure compréhension de la sélectivité enzymatique, au niveau moléculaire. Ce qui peut rendre possible, par la suite, le développement d'approches prédictives pour la sélectivité des enzymes natives vis-à-vis d'un substrat ou d'une classe de substrats donnée, ou encore, d'identifier des acides aminés dont la mutation ponctuelle permettait de modifier la sélectivité ou la spécificité enzymatique [(Qian *et al.*, 2007) et (Damborsky *et al.*, 2009)].

II. Reconnaissance moléculaire

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Les forces intervenant dans la formation du complexe peuvent être de nature stérique, électronique ou les deux avec des contributions différentes.

Les états conformationnels choisis lors de l'interaction ne sont pas nécessairement ceux de plus basse énergie en solution, mais des états transitoires stabilisés par celle-ci. Les complexes formés sont alors plus stables que les formes dissociées. Cette association intermoléculaire est stabilisée par plusieurs effets et des liaisons non covalentes. Au niveau du processus biochimique, elles s'expriment par différentes interactions : électrostatiques, hydrophobiques, de Van Der Waals et des ponts hydrogène (Foote et Milstein, 1994).

III. Amarrage moléculaire (ou docking)

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques.

Connaître la façon dont les protéines interagissent avec d'autres entités biochimiques est une étape essentielle pour comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées (Thiriou, 2009).

Différentes méthodes d'étude expérimentale telle que la cristallographie aux rayons-X et la résonance magnétique nucléaire (RMN) permettent généralement de déterminer la réponse à cette question. Cependant, d'une part ces méthodes ne sont pas toujours simples à mettre en œuvre, et d'autre part certaines molécules ont une durée de vie si courte qu'une étude *in vitro* est tout bonnement impossible. Or, pour comprendre les mécanismes qui permettent aux protéines d'assurer leurs fonctions, il faut tout d'abord comprendre comment elles

interagissent entre elles ou avec d'autres molécules. D'où l'intérêt d'avoir des méthodes prédictives procédant par simulation, complémentaires à ces approches expérimentales (Tocino, 2000). A l'heure actuelle la simulation par amarrage moléculaire plus connue sous l'appellation de docking moléculaire représente l'approche prédictive la plus utilisée dans ce domaine de la recherche médicale et pharmaceutique.

IV. Les différents types de docking moléculaire

Le docking moléculaire est l'étude *in silico* des différents mécanismes et interactions qui interviennent lorsque plusieurs structures moléculaires s'assemblent, l'objectif étant de parvenir à déterminer comment ces molécules vont s'agencer les unes par rapport aux autres.

Il existe deux grands types de docking moléculaire. Le docking rigide consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système protéine-ligand en considérant que chacune des deux molécules conserve une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte. Cependant, il est tout à fait concevable que les structures de la protéine et du ligand soient modifiées durant le processus de docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités. On parle, dans ce cas, de docking flexible (Thiriou, 2009).

V. Applications du docking

Il y a deux principales applications au programme de docking.

- La plus ancienne est la prédiction du mode d'interaction.
- La seconde consiste à optimiser des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur. [(Gabb *et al.*, 1997) et (Vieth *et al.*, 1998)]

VI. Programmes du docking les plus cités

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

Tableau 01 : Principaux programmes de docking moléculaire (Taylor et *al.*, 2003)

Nom	Editeur	Site Internet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
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

VII. Programme utilisé : Surflex-dock

Pour étudier les interactions protéines-ligands, nous avons choisi le programme de docking moléculaire: Surflex-dock, qui utilise une méthode incrémentielle.

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 actif, à condition de bénéficier d'une structure, ou bien à partir du récepteur sans aucun ligand : il utilise dans ce cas trois 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 (Jones et *al.*, 1995). 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. À la différence de la recherche incrémentale de Dock il n'y a pas de recherche systématique des angles de torsion mais une étape de minimisation entre chaque ajout de fragment.

- 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.

Ainsi le résultat des configurations retenues pour s'apparier avec le ligand contient des molécules proches de l'alignement initial du ligand qui ont été localement modifiées par le processus de fragmentation. Les fragments de ces configurations sont évalués puis une étape de sélection et de fusion des meilleurs fragments entre configurations permet d'obtenir un « conformère » global. Cette deuxième méthode se montre beaucoup plus rapide que la méthode Hammerhead pour des résultats au moins équivalents.

Dans la version de Surfex que nous avons utilisée (version 1.3), il s'agit de la méthode par défaut.

Pour l'utilisateur, l'emploi du logiciel passe par trois étapes :

- Choisir de quelle manière définir le site actif, soit à partir d'un ligand soit à partir du récepteur.
- Construire la «pseudo-molécule » qui sera la cible de la recherche de similarité.
- Enfin lancer le processus de Docking.

Le résultat est donné sous la forme des 10 meilleurs « conformères » au format mol2. Chaque fichier possède trois scores : le premier d'affinité ; le second correspond au degré de pénétration impropre du ligand dans la protéine appelé «crash score», plus ce score est proche de 0 plus l'interaction est favorable et le troisième ou «polar score» correspond au niveau de contribution des interactions polaires. Plusieurs options, à rentrer en ligne de commande, permettent d'adapter le calcul suivant le nombre de torsions ou suivant l'espace conformationnel à représenter avec la «pseudo-molécule ».

Le but de cette partie pratique est de rechercher de nouvelles molécules inhibitrices de l'ARN polymérase NS5B autres que le Sofosbuvir par substitution à partir de sa formule initiale, en utilisant la technique de docking moléculaire par le logiciel Surflex-dock.

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. MATERIEL

- **2 Ordinateurs : PC Intel Pentium P6200 2,13 GHz avec 4 Go de mémoire RAM sur système d'exploitation 64 bits)**
- **Le réseau internet** comme outil principal pour le téléchargement des programmes, des complexes et des ligands dont on a besoin.
- **Surflex-dock v 1.3, 2005** : Logiciel principal de docking.
- **ArgusLab v 4.0.1 2003** : Logiciel de construction de molécules et de docking.
- **MS Viewer v 4.2** : programme de visualisation des molécules
- **Une banque de donnée appelée la PDB (Protein Data Bank)** c'est la principale source de données de biologie structurale, elle permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.
- **Open Babel 2.3.0** : C'est un programme utilisé pour faire la conversion des formats.

I.2. METHODES

I.2.1. Le protocole d'utilisation du programme Surflex-dock

Pour réaliser le docking moléculaire, nous avons utilisé le programme Surflex-dock à cause de sa performance par rapport au programme ArgusLab qui n'est utilisé que pour le dessin des molécules.

Dans la version de Surflex que nous avons utilisée (version 1.3), il s'agit de la méthode par défaut.

Le docking est réalisé en 3 étapes :

- 1) **L'identification du site actif par construction d'une pseudo-molécule** appelée "protomol".

2) Docking du ligand

L'étape de docking débute par une fragmentation préalable du ligand. L'assemblage des fragments obtenus permet de rechercher les meilleures conformations du ligand dans le site actif de l'enzyme.

3) Calcul du RMSD

La manière dont les ligands sont arrimés dans le site actif peut être généralement décrite numériquement par le RMSD entre le ligand co-cristallisé et la molécule amarrée.

Le programme Surfex est dépourvu de la visualisation. C'est pour cette raison nous avons utilisé le programme ViewerLite 4.2 afin de visualiser les différentes interactions formées.

I.2.2. Tests d'évaluation du programme utilisé : Surfex-dock

Pour évaluer la fiabilité du logiciel Surfex-dock deux tests ont été mis au point. Le test du RMSD et le test du coefficient de corrélation (r).

I.2.2.1. Le test du RMSD

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB.

La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms. Le test de fiabilité du programme Surfex par le RMSD, a été réalisé en utilisant 134 complexes protéines-ligands pris de manière arbitraire de la PDB. Les complexes sont téléchargés au format pdb après introduction dans la PDB le code correspondant à chaque complexe.

Après séparation de la protéine et du ligand dans des fichiers différents, ces derniers sont convertis du format pdb au format mol2 grâce au programme OpenBabel. Une fois la reconstruction du complexe protéine-ligand est réalisée par docking moléculaire, Surfex calcule le RMSD en comparant la géométrie du meilleur conformère (final-0) au ligand d'origine issu directement de la PDB.

La liste des complexes protéine-ligand étudiés peut être consultée dans l'annexe 01.

I.2.2.2 Le test du coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation de Pearson permet d'évaluer l'intensité et le sens de la relation linéaire entre deux séries de données provenant de l'échantillonnage de deux variables métriques. Le coefficient de corrélation indique le degré de relation linéaire entre les deux séries de données, et il prend des valeurs situées entre -1 et 1 . 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. Dans ce cas, il pourrait tout de même y avoir une relation entre les deux variables, mais alors elle ne sera pas linéaire.

Le signe du coefficient de corrélation indique le sens de la corrélation: s'il est positif, la valeur d'une des variables tend à augmenter en même temps que celle de l'autre variable, s'il est négatif, la valeur d'une variable tend à diminuer quand celle de l'autre augmente. Pour interpréter les corrélations dans le cadre de la relation examinée, nous pouvons nous en tenir à certaines valeurs indicatives (figure 06).

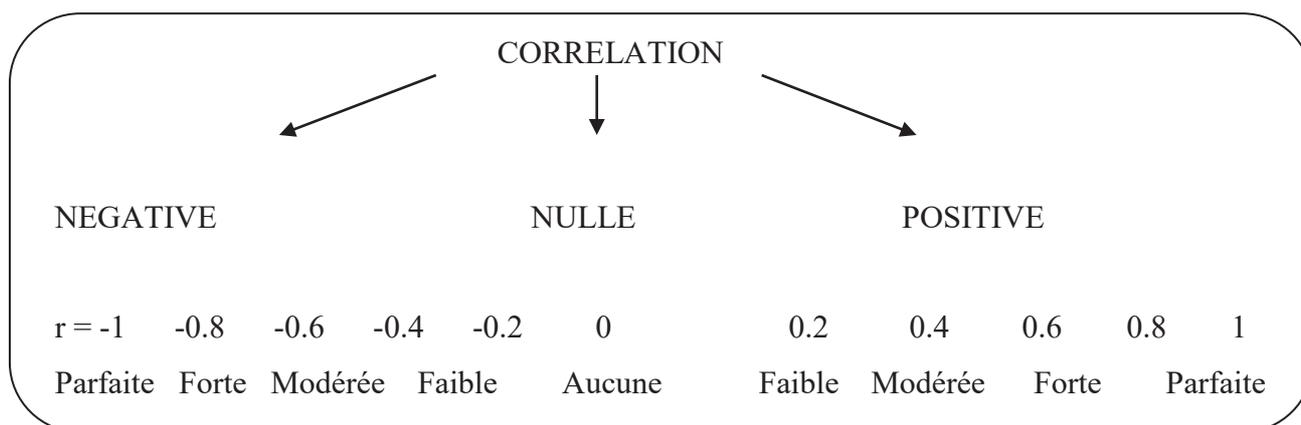


Figure 06: les différentes valeurs de r

L'analyse par régression linéaire a été réalisée sur différents complexes dont l'activité biologique a déjà été testée. La corrélation entre l'activité biologique et le résultat obtenu par le docking moléculaire est un des moyens pour tester la fiabilité du programme Surfex dans cette étude.

IC 50 : c'est la concentration d'inhibiteur nécessaire pour atteindre 50% d'inhibition de l'enzyme.

Ce test consiste à évaluer le degré de corrélation qui existe entre l'affinité de 29 complexes différents simulés par docking moléculaire avec Surfex et leur activité biologique (IC50).

Ces complexes téléchargés à partir de la PDB dans le format pdb portant des codes et des IC50 différents. Dans le tableau ci-dessous nous présentons les complexes choisis avec leurs valeurs de log IC50.

Tableau N°02 : valeurs de Log IC50 des 29 composés étudiés.

N°	Code PDB	Log IC50
1	1g2a	1,00
2	1g27	0,85
3	2b5j	-0,10
4	2ban	0,00
5	2be2	0,30
6	2i5j	2,70
7	3dle	0,30
8	3dlg	0,08
9	3dRp	-0,70
10	3dRR	-0,40
11	3drs	-0,30
12	3m8p	0,32
13	3m8q	-0,52
14	1bqn	2,78
15	1bqm	1,65
16	3onc	1,48
17	3onb	1,48
18	3C6U	0,13
19	3c6t	0,32
20	2c2s	2,18
21	4dwb	3,26
22	4dwg	1,76
23	4e1e	2,69
24	4dzw	1,11
25	4dxj	1,58
26	1ZAF	1,30
27	3fr2	2,77
28	3fr4	1,69
29	3fr5	2,65

I.2.3. Les mono et les bi-substitutions du Sofosbuvir

Ces substitutions ont été réalisées dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de l'ARN polymérase NS5B. Nous avons pris comme structure de base la molécule Sofosbuvir disponible dans la pdb sous le code 4wtg.

Afin d'améliorer l'affinité du Sofosbuvir, plusieurs groupements fonctionnels présentant la capacité d'engager des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme ont été introduits sur différentes positions de la molécule. Il s'agit des fonctions : alcool (-OH); acide (-COOH) et amine (-NH₂).....

Le nombre d'atomes autres que les H a été maintenu constant.

Nous avons effectué 2 types de substitution : 36 mono substitutions et 20 bi substitutions.

I.2.4. Etude des propriétés pharmacologiques et toxiques des composés ayant la meilleure inhibition

- **La règle de Lipinski**

Chaque médicament potentiel doit se conformer à plusieurs critères de base, tels son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, métabolisme, d'excrétion et de toxicité (filtre ADME/Tox). Cette méthode est basée essentiellement sur la règle de 5 de Lipinski:

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da) ;
- Le coefficient de partition (logP) doit être ≤ 5 (avec un optimum entre 0 et 3).
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être ≤ 5 ;
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être ≤ 10 .

LogP : est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau ($\text{LogP} = \text{Log Coct/Ceau}$). Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. En effet, une molécule doit, pour parvenir dans l'organisme jusqu'à son lieu d'action, se dissoudre dans des phases aqueuses, traverser des membranes lipidiques, des phases protéiques et osidiques. La solubilité dans l'eau et dans les lipides ainsi que le coefficient de partage jouent dans ce transport, un rôle

fondamental. Une molécule dotée d'une action plus rapide doit avoir un coefficient de partage qui favorise le plus son transport.

Les composés dont les propriétés physico-chimiques ne satisfont pas au moins deux des règles sont fortement susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité.

En effet, en complément de ces règles, d'autres critères sont pris en compte dans la sélection de molécules potentiellement candidates:

- Nombre d'halogènes ≤ 7 ;
- Chaînes alkyles \leq $-(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$;
- Nombre de cycles ≤ 6 ;
- Pas de grands cycles de plus de 7 membres ;
- Au moins un atome d'azote ou d'oxygène dans la molécule.

I. La fiabilité du programme Surflex-dock

❖ Par calcul du RMSD

Le test de fiabilité du programme Surflex par le RMSD, a été réalisé en utilisant 140 complexes protéines-ligands pris de manière arbitraire de la PDB. Les complexes sont téléchargés au format pdb après introduction dans la PDB le code correspondant à chaque complexe.

Dans la figure suivante (figure 07), les résultats sont donnés en pourcent (%), à deux intervalles de RMSD.

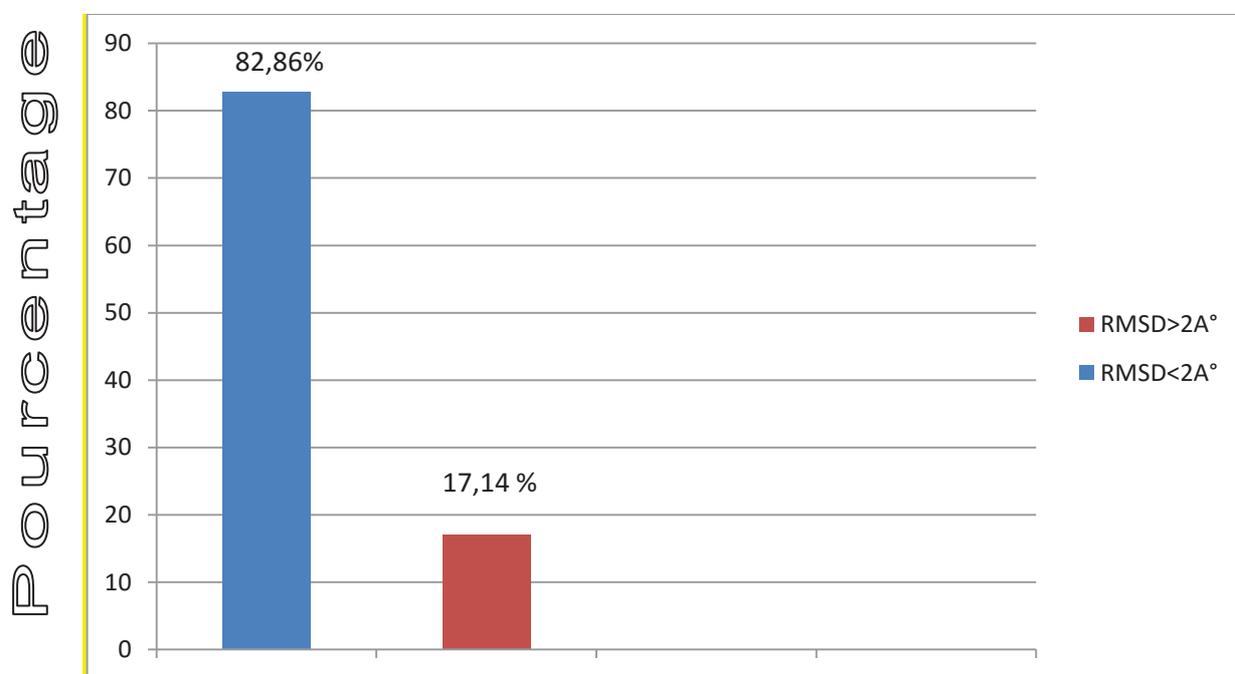


Figure 07 : Résultats en % obtenus par Surflex à deux intervalles de RMSD (Å).

D'après nos résultats, les valeurs de RMSD obtenues sont de 82,86 % inférieures à 2 Å et que seulement 17,14 % des résultats sont supérieurs à 2 Å, conformément aux travaux de Teniou S. (2012) et Merzoug et *al.* (2015) qui révèlent un taux de RMSD inférieur à 2Å de 85,8% et de 83 %. Respectivement.

Il faut cependant noter que le programme Surflex dispose d'une commande supplémentaire qui permet d'améliorer les résultats de RMSD non positifs en les rendant acceptables. Ainsi, Surflex peut être considéré comme un outil de modélisation par docking moléculaire hautement performant.

❖ Par calcul du coefficient de corrélation

Afin de nous assurer davantage que le programme Surflex peut être utilisé nous avons fait un deuxième test, celui du coefficient de corrélation (r) dont voici les résultats.

Ce test consiste à évaluer le degré de corrélation qui existe entre l'affinité de 29 complexes différents simulés par docking moléculaire avec Surflex et leur activité biologique (IC50).

Ces complexes sont téléchargés à partir de la PDB dans le format pdb et portant des codes et des IC50 différents.

Tableau 2 : valeurs de l'affinité et du Log IC50 de 29 composés étudiés.

N°	Code PDB	Affinité	Log IC50
1	1g2a	11,29	1,00
2	1g27	5,25	0,85
3	2b5j	7,89	-0,10
4	2ban	7,59	0,00
5	2be2	10,54	0,30
6	2i5j	4,43	2,70
7	3dle	8,94	0,30
8	3dlg	11,18	0,08
9	3dRp	7,36	-0,70
10	3dRR	7,55	-0,40
11	3drs	3,88	-0,30
12	3m8p	2,29	0,32
13	3m8q	3,66	-0,52
14	1bqn	5,90	2,78
15	1bqm	9,87	1,65
16	3onc	5,12	1,48
17	3onb	4,51	1,48
18	3C6U	8,01	0,13
19	3c6t	7,55	0,32
20	2c2s	3,67	2,18
21	4dwb	-0,25	3,26
22	4dwg	6,29	1,76
23	4e1e	6,00	2,69
24	4dzw	6,61	1,11
25	4dxj	5,67	1,58
26	1ZAF	5,22	1,30
27	3fr2	5,09	2,77
28	3fr4	4,81	1,69
29	3fr5	6,32	2,65

La valeur du coefficient de corrélation trouvée est égale à 0,52.

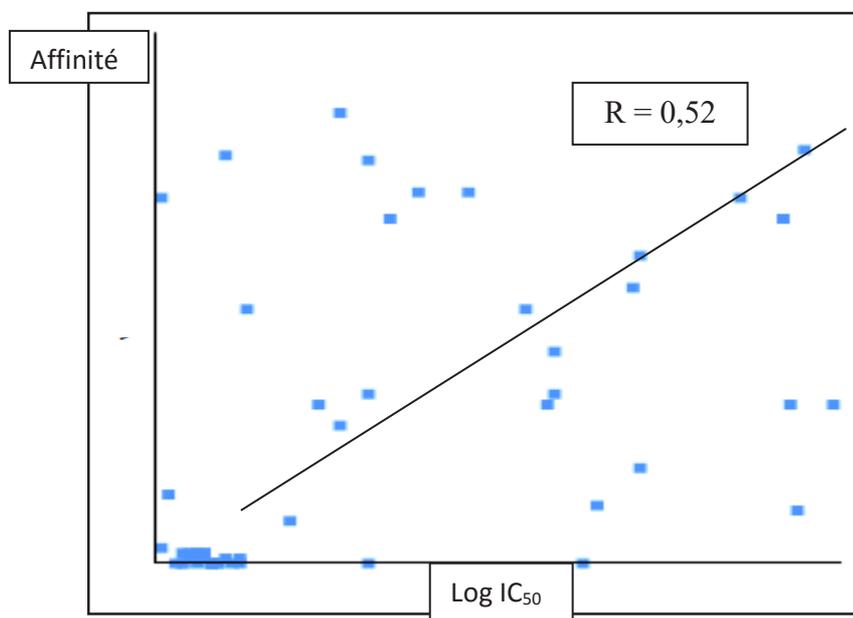


Figure 08: Corrélation entre l'activité biologique (LogIC50) et l'affinité donnée par Surfex des 29 complexes choisis.

La valeur du coefficient de corrélation est supérieure à 0.5.

Il y a donc une certaine corrélation entre les deux paramètres analysés, à savoir l'activité biologique représentée ici par Log IC50 et les résultats de docking donnés par le programme Surfex (affinité).

Nous remarquons que Surfex établit une assez bonne corrélation ($r=0.52$) mais, moindre comparée aux résultats de Boucherit H. (2012) avec un $r=0.76$, de Meguenani et Zebila (2014) avec un $r=0,75$ et de Merzoug et al. (2015) avec un $r =0.728$.

Conclusion

Le programme Surfex peut être considéré suffisamment performant et peut être utilisé sans trop de risques d'erreurs pour simuler la formation des complexes enzyme-inhibiteurs puisqu'il :

- Reproduit assez bien les résultats expérimentaux avec plus de 80% de résultats positifs pour le RMSD.
- Présente une corrélation assez bonne entre les deux paramètres analysés avec un coefficient de corrélation (r) = 0,52.

II. Les substitutions du sofosbuvir

Ces substitutions ont été réalisées dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de l'ARN polymérase NS5B. Nous avons pris comme structure de base la molécule Sofosbuvir (figure 9) disponible en complexe dans la pdb sous le code 4wtg.

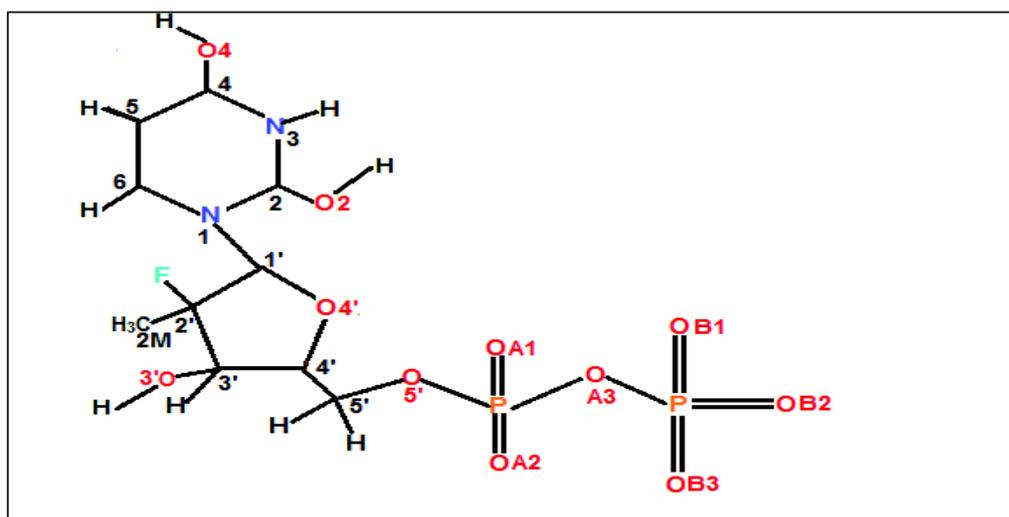


Figure 09 : Structure de la molécule de base ‘Sofosbuvir ‘

Afin d'améliorer l'affinité du Sofosbuvir, plusieurs groupements fonctionnels présentant la capacité d'engager des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme ont été introduits sur différentes positions de la molécule. Il s'agit des fonctions : alcool (-OH); acide (-COOH) et amine (-NH₂). En effet, nous avons effectué 36 monosubstitutions et 20 bisubstitutions.

II.1. Les mono substitutions

Les résultats de différentes mono substitutions réalisées sur le sofosbuvir sont enregistrés dans le tableau 03 ci-dessous.

Tableau 03: Résultats de la mono substitution

Composé	Mono substitutions											Affinité En M ⁻¹
	C2	C4	C5	C6	C1'	C2'(C2M)	C2'(F)	C3'	C4'	C5'	N3H	
1	NH ₂											6.46
2		NH ₂										3.50
3			NH ₂									6.25
4				NH ₂								10.37
5					NH ₂							6.31
6						NH ₂						6.43
7								NH ₂				5.28
8									NH ₂			7.42
9										NH ₂		6.73
10	COOH											6.61
11		COOH										1.86
12			COOH									7.49
13				COOH								6.96
14					COOH							8.10
15						COOH						3.84
16								COOH				5.46
17									COOH			9.06
18										COOH		6.01
19			OH									7.90
20				OH								8.61
21					OH							6.19
22						OH						6.38
23									OH			8.38
24										OH		8.75
25	CONH ₂											7.15
26		CONH ₂										9.07
27			CONH ₂									10.46
28				CONH ₂								6.75
29					CONH ₂							6.01
30						CONH ₂						8.71
31								CONH ₂				6.19
32									CONH ₂			6.92
33										CONH ₂		6.50
34								Br				3.59
35								Cl				5.21
36											NOH	6.29

Le tableau montre que parmi les 36 mono substitutions réalisées, 30 composés ont présenté des affinités supérieures à celle du Sofosbuvir qui est de $5,52 \text{ M}^{-1}$.

Parmi ces résultats obtenus lors de la première substitution, Nous avons choisi quelques composés qui présentent une affinité élevée et quelques composés ayant une moindre affinité pour faire une bi substitution.

II.2. Les bi substitutions

Les résultats des bi substitutions sont regroupés dans le tableau 04 suivant :

Tableau 04: Résultats de la bi substitution

Composé	Bi substitution											Affinité M^{-1}
	C2	C4	C5	C6	C1'	C2M	F	C3'	C4'	C5'	N3H	
37		NH ₂	OH									7.72
38		COOH	COOH									5.73
39			CONH ₂	CONH ₂								6.13
40		CONH ₂	CONH ₂									7.11
41		CONH ₂		NH ₂								4.09
42		CONH ₂		OH								1.96
43	CONH ₂	CONH ₂										6.57
44		CONH ₂			COOH							6.26
45		CONH ₂				CONH ₂						6.11
46		CONH ₂						CONH ₂				5.03
47		CONH ₂							OH			6.37
48		CONH ₂							COOH			7.01
49		CONH ₂							NH ₂			4.07
50		CONH ₂								OH		5.63
51	CONH ₂		CONH ₂									7.05
52			CONH ₂	OH								7.60
53			CONH ₂		COOH							8.30
54			CONH ₂						OH			5.36
55			CONH ₂						COOH			7.12
56			CONH ₂							OH		7.13

Nous remarquons, d'après les résultats de ce tableau, que les composés de la mono substitution ayant des affinités élevées ne présentent pas nécessairement une meilleure affinité après une deuxième substitution mais peuvent indiquer une affinité plus faible que la première, comme pour le composé N° 27 dont l'affinité est passée de 10,46 pendant la première substitution à une affinité de 6.13 après une deuxième substitution en C6 par CONH₂. Par contre on remarque qu'une deuxième substitution a amélioré nettement l'affinité du composé N°11 qui était égale à 1, 86 pour atteindre une affinité égale à 5,73.

Conclusion

D'après les résultats obtenus, nous concluons que :

- Les meilleurs résultats d'affinité et donc le meilleur effet inhibiteur est observé lors des mono substitutions (le composé N° 04 avec une affinité de 10,37, le composé N°27 avec une affinité de 10,46 et le composé N° 26 avec une affinité de 9,07);
- Une deuxième substitution n'améliore pas obligatoirement l'affinité;
- Les composés, ayant une meilleure affinité que la molécule initiale, obtenus lors de la mono ou la bi substitution sont retenus et leurs propriétés pharmacologiques déterminées avant d'être proposés comme des inhibiteurs théoriques potentiels de l'ARN polymérase NS5B. à savoir les composés : N° 04, 26, 27, 17, 37 et 53.

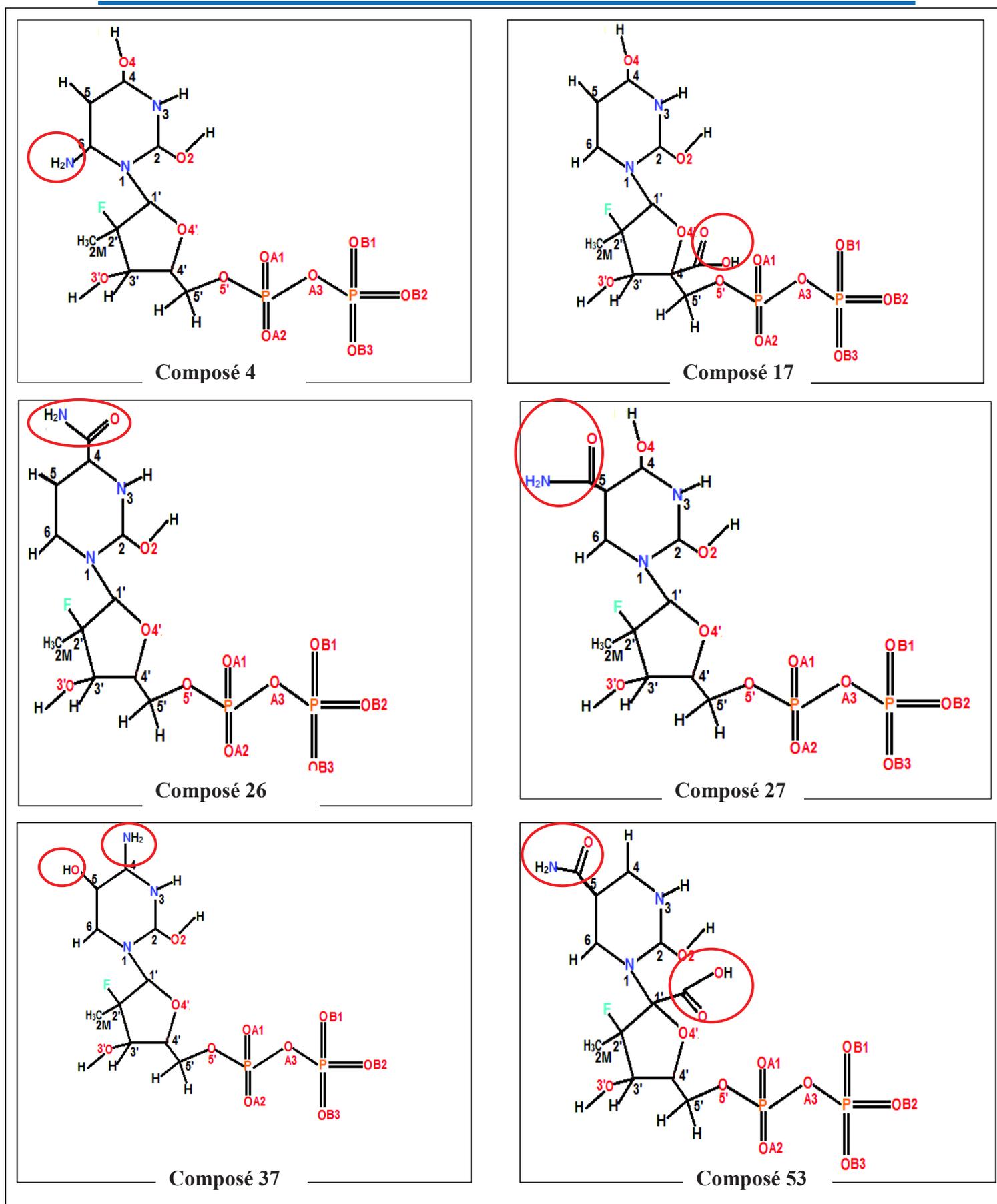


Figure N° 10 : Structure des six composés étudiés

III. La règle de Lipinski

L'application de la règle de lipinsky au six composés, nous a permis de calculer leurs propriétés physico-chimiques en rapport avec les propriétés pharmacodynamiques. Pour être disponibles par voie orale, toute molécule doit répondre au moins à trois des cinq critères. Voir le tableau 05

Tableau 05: Diverses propriétés pharmacologiques de la molécule de base et des 06 composés choisis.

Composé	Affinité	Substitution effectuée	Paramètres de la règle de Lipinski				
			LogP ≤ 5	PM ≤ 500	nON ≤ 10	nOHNH ≤ 5	Nrotb ≤ 15
Molécule de base	5,52	/	0.09	180.22	4	4	6
N°27	10,46	C5=CONH ₂	-0.13	223.25	6	5	7
N°26	9,07	C4=CONH ₂	0.28	178.21	4	2	6
N°04	10,37	C6=NH ₂	1.51	204.29	3	1	5
N°17	9,06	C'4=COOH	-2.19	145.97	5	4	2
N°37	7,72	C4=NH, C5=OH	0.28	178.21	4	2	6
N°53	8,30	C5=CONH ₂ C'1=COOH	-3.54	293.25	9	7	2

PM : poids moléculaire ;

nOH,NH : nombre de donneurs de liaisons H ;

nO,N : nombre d'accepteurs de liaisons H ;

logP : coefficient de partition calculé ;

nrotb : liaisons rotatives.

Nous constatons que tous les composés étudiés répondent parfaitement à la règle de 5 de Lipinski sauf le composé N° 53 qui présente un nombre de donneurs de liaisons H supérieur à la norme. Et un log de p hors normes

Cependant, d'autres critères sont pris en compte dans cette sélection de molécules potentiellement candidates (**voir tableau 06**).

Tableau 06 : Autres propriétés physico-chimiques des composés étudiés.

Descripteur	Nombres d'halogènes	Longueur de la chaîne alkyle	Nombre de cycle	Nombre d'azote
27	1	/	2	3
26	1	/	2	3
04	1	/	2	3
17	1	/	2	2
37	1	/	2	3
53	1	/	2	3

Les résultats du tableau montrent que les 6 molécules étudiées s'inscrivent parfaitement dans la marge de ces critères.

Conclusion

D'après les résultats des deux tableaux précédents, nous pouvons conclure que les six composés testés sont adaptés pour être proposés comme inhibiteurs de l'enzyme.

En effet, ces composés (N° 04, 26, 27,17, 37 et 53) ont des affinités élevées de (10,37 ; 9,07 ; 10,46 ; 9,06 ; 7,72 ; 8,30) respectivement. Ils répondent parfaitement à la règle de Lipinski. Le complément d'information sur les autres propriétés physico-chimiques nous confirme qu'il s'agit de molécules biologiquement très actives dont l'effet inhibiteur sur l'ARN polymérase NS5B doit être vérifié expérimentalement par des tests *in vitro* et *in vivo*.

IV. Etude des interactions des composés testés :

Pour faire cette étude nous avons choisi les quatre molécules ayant la meilleure affinité parmi les composés étudiés précédemment.

Donc l'étude de ces quatre composés a été complétée par une visualisation des interactions établies entre ces composés et l'ARN polymérase NS5B.

IV.1. Interactions de la molécule de base : Le sofosbuvir

Le sofosbuvir réalise 13 liaisons H avec l'enzyme, schématisées dans la figure N° 11 et dont les propriétés sont regroupées dans le tableau N°07 :

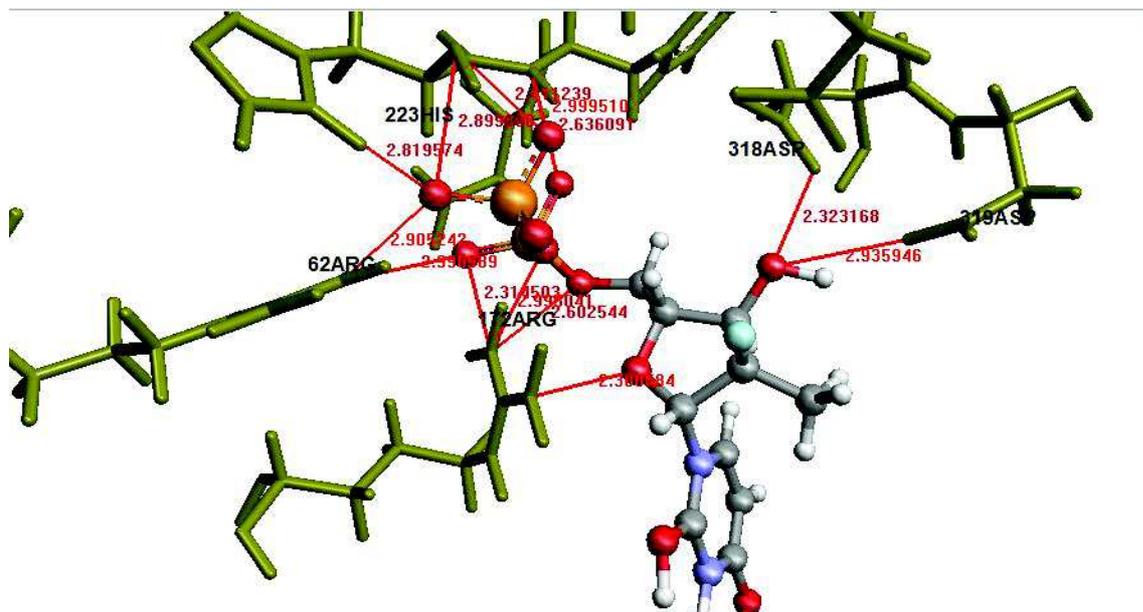


Figure 11 : Mode de liaison de la molécule de base, le sofosbuvir, avec le site actif de l'ARN polymérase NS5B

Les figures des interactions montrent le site actif de l'ARN polymérase NS5B complexé avec l'inhibiteur. Le ligand est en représentation « boules et bâtonnets » coloré en jaune, et les acides aminés du site actif de l'enzyme sont représentés en « wireframe » avec pour chaque atome une couleur qui lui est spécifique (gris pour C, bleu pour N, rouge pour O et blanc pour H).

NB : Nous avons négligé quelques acides aminés de certaines figures pour la clarté des images.

Tableau N° 07 : Les différentes liaisons d'hydrogène générées entre la molécule de base: Le sofosbuvir et l'enzyme ARN polymérase NS5B

Composé	Atome du composé	Atome de la cible	Distance A
Molécule de base Sofosbuvir	O3'	(4835O) du résidu (319Asp)	2,935946
	O3'	(4823O) du résidu (318ASP)	2,323167
	O4'	(2388N) du résidu (172ARG)	2,380583
	OA1	(2387N) du résidu (172ARG)	2,314503
	O5'	(2387N) du résidu (172ARG)	2,602543
	O3A	(2387N) du résidu (172ARG)	2,995042
	OA1	(732N) du résidu (62ARG)	2,99659
	OA2	(3427N) du résidu (224PHE)	2,636091
	OB1	(3427N) du résidu (224PHE)	2,999511
	OB1	(3410N) du résidu (223HIS)	2,41124
	OB2	(3410N) du résidu (223HIS)	2,899809
	OB2	(3416N) du résidu (223HIS)	2,819574
OB2	(732N) du résidu (62ARG)	2,905241	

IV.2. Interactions du composé N° 27 :

Cette molécule est obtenue par substitution de l'hydrogène en C5 par le groupement CONH₂. Cette substitution a entraîné la formation de dix ponts hydrogènes schématisés dans la figure N° 12 et dont les propriétés sont regroupées dans le tableau N°08.

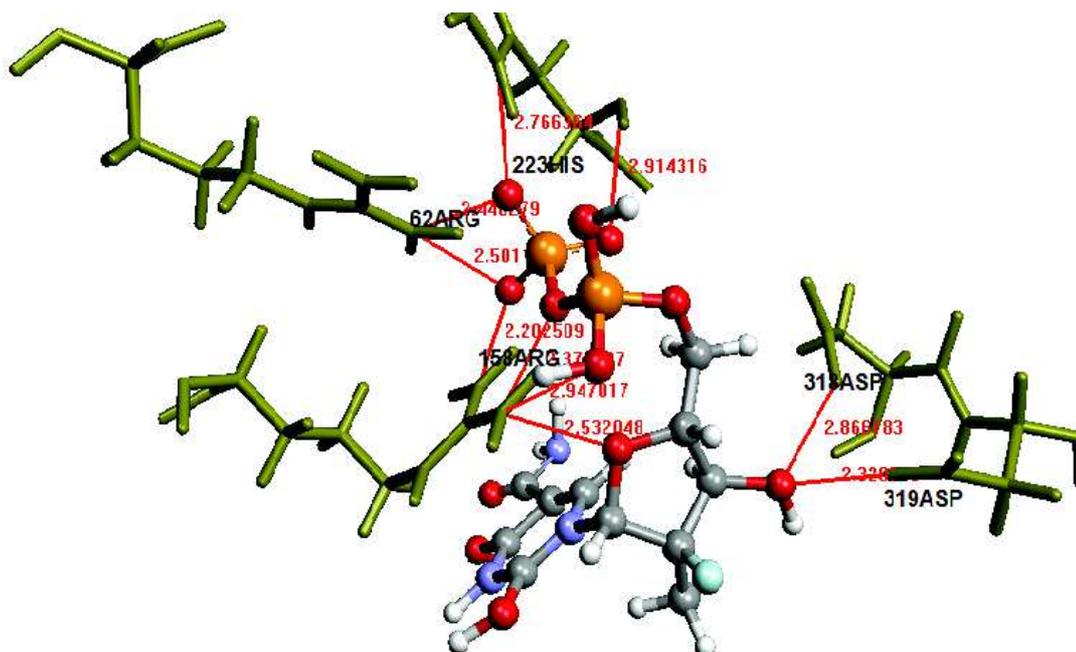


Figure 12 : Mode de liaison du composé N° 27 avec le site actif de l'ARN polymérase NS5B

Tableau N° 08 : Les différentes liaisons d'hydrogène générées entre la molécule N° 27 et l'enzyme ARN polymérase NS5B.

Composé	Atome du composé	Atome de la cible	distance
Molécule N° 27 substitué en C5 = CONH2	O4'	Atome (2388N) du résidu (158arg)	2,532048
	O1A	Atome (2388N) du résidu (158arg)	2,947017
	O3A	Atome (2388N) du résidu (158arg)	2,378627
	O2B	Atome (2387N) du résidu (158arg)	2,202509
	O2B	Atome (732N) du résidu (62arg)	2,501113
	O1B	Atome (732N) du résidu (62arg)	2,446279
	O1B	Atome (3416N) du résidu (223His)	2,766365
	O3B	Atome (3410N) du résidu (223His)	2,914316
	O3'	Atome (4835O) du résidu (319Asp)	2,320558
	O3'	Atome (4823O) du résidu (318Asp)	2,866183

IV.3. Interactions du composé N° 26 :

Cette molécule est obtenue par substitution de l'hydrogène en C4 par le groupement CONH₂. L'analyse visuelle du complexe nous révèle deux liaisons hydrogènes schématisées dans la figure N° 13 et détaillées dans le tableau N° 09 :

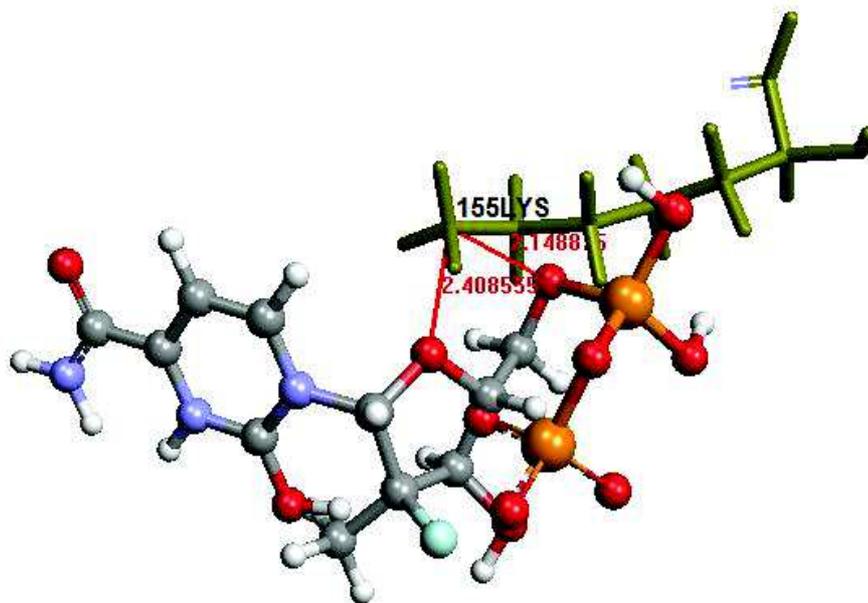


Figure 13 : Mode de liaison du composé N° 26 avec le site actif de l'ARN polymérase NS5B

Tableau N° 09 : Les différentes liaisons d'hydrogène générées entre la molécule N° 26 et l'enzyme ARN polymérase NS5B

Composé	Atome du composé	Atome de la cible	distance
Molécule N° 26 substitué en C4=CONH ₂	O5'	Atome (2144N) du résidu (155lys)	2,408554
	O4'	Atome (2144N) du résidu (155lys)	2,148875

IV.4. Interactions du composé N° 04 :

Cette molécule est obtenue par substitution de l'hydrogène en C6 par le groupement NH₂.

La visualisation des interactions entre le composé N° 04 et l'ARN polymérase NS5B montre la formation de 12 ponts hydrogène schématisés dans la figure N° 14 et détaillés dans le tableau N° 10 :

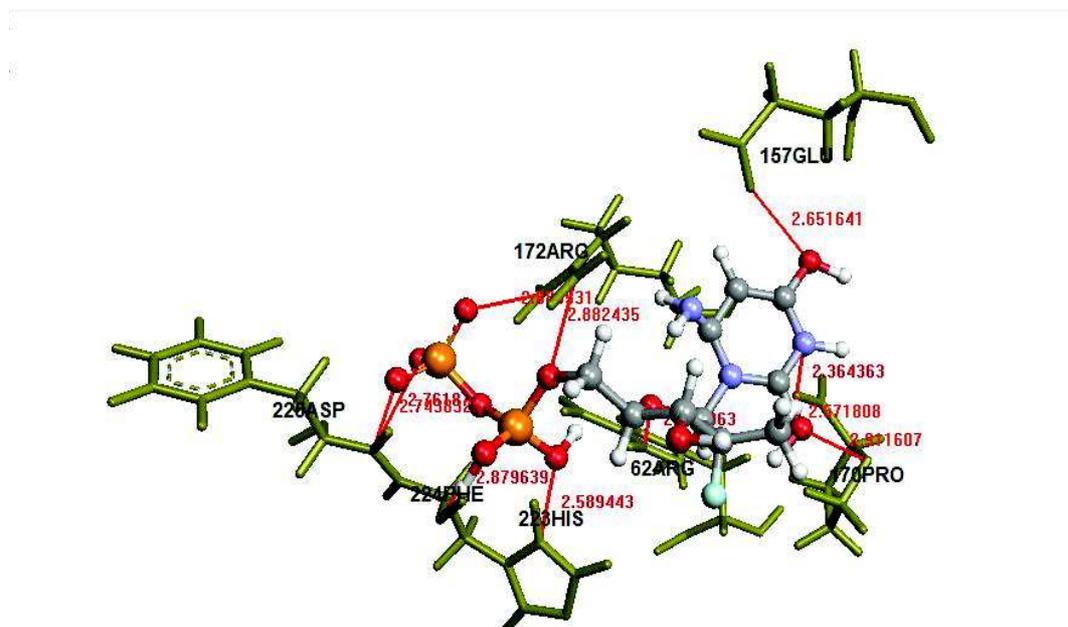


Figure 14 : Mode de liaison du composé N° 04 avec le site actif de l'ARN polymérase NS5B

Tableau N° 10 : Les différentes liaisons d'hydrogène générées entre la molécule N° 04 et l'enzyme ARN polymérase NS5B

Composé	Atome du composé	Atome de la cible	distance
Molécule N° 04 substitué en C6=NH2	O2B	Atome (3447N) du résidu (225Asp)	2,917638
	O2B	Atome(3427N) du résidu (224Phe)	2,761875
	O3B	Atome(3427N) du résidu (224Phe)	2,743832
	O1B	Atome (2387N) du résidu (157Arg)	2,880531
	O2A	Atome (3410N) du résidue (223His)	2,879638
	O1A	Atome (3416N) du résidue (223His)	2,589443
	O4'	Atome (731N) du résidue (62Arg)	2,403964
	O5'	Atome(2388N) du résidue (172Arg)	2,882436
	O4	Atome (2180 O) du résidu (157Glu)	2,651641
	N3	Atome (2357O) du résidu (170Pro)	2,364364
	O2	Atome (2357O) du résidu (170Pro)	2,571808
	O2	Atome (2354N) du résidu (170Pro)	2,911607

IV.5. Interactions du composé N° 17 :

Cette molécule est obtenue par substitution de l'hydrogène en C4' par le groupement COOH.

La visualisation des interactions entre le composé N° 17 et l'ARN polymérase NS5B montre la formation de 06 ponts hydrogène schématisés dans la figure N° 15 et détaillés dans le tableau N° 11:

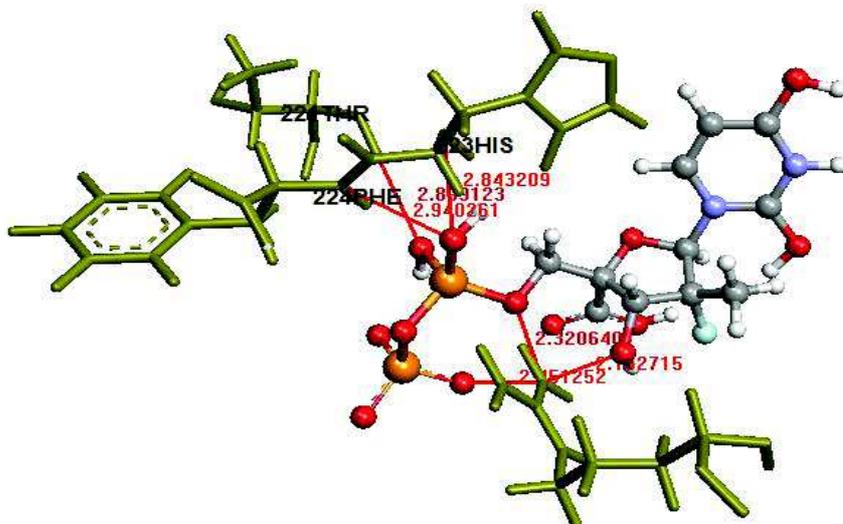


Figure 15 : Mode de liaison du composé N° 17 avec le site actif de l'ARN polymérase NS5B

Tableau N° 11 : Les différentes liaisons d'hydrogène générées entre la molécule N° 04 et l'enzyme ARN polymérase NS5B

Composé	Atome du composé	Atome de la cible	distance
Molécule N°17 substitué en C'4=COOH	O3B	Atome (2388N) du résidu(172Arg)	2,451252
	O3'	Atome (2388N) du résidu(172Arg)	2,152714
	O5'	Atome (2388N) du résidu(172Arg)	2,32064
	O2A	Atome (2375O)du résidu (221Thr)	2,899124
	O1A	Atome (3427N) du résidu (224Phe)	2,940261
	O1A	Atome (3410N) du résidu (223His)	2,843209

Remarque : Il faut noter que tous ces composés réalisent plusieurs interactions hydrophobes avec l'enzyme mais, que nous n'avons pas représentées, en raison de la clarté des figures.

Conclusion :

Nous pouvons conclure d'après ces résultats que :

Malgré que les quatre composés étudiés à savoir le composé N° 27, 26, 04 et 17 qui ont des affinités (10,46 ; 9,07 ; 10,37 ; 9,06) respectivement, nettement plus élevées que celle de la molécule de base, le Sofosbuvir ($5,52 \text{ M}^{-1}$), le nombre de liaisons hydrogène formées lors des interactions de ces quatre composés avec l'enzyme ARN polymérase NS5B (10, 2, 12 et 6) est inférieur à celui des liaisons hydrogène formées par le Sofosbuvir (13). Cela est sans doute dû à des paramètres plus favorables (distance et angle), des liaisons H et un nombre d'interactions hydrophobes plus important dans le cas des composés substitués.

Conclusion générale

Cette étude a pour objectif de contribuer à trouver de nouvelles molécules inhibitrices de l'ARN polymérase NS5B en utilisant la technique du docking moléculaire par le biais du logiciel Surflex-dock.

Nous avons commencé par évaluer la performance de ce programme afin de déterminer s'il était bien adapté à cette problématique. Nous l'avons testé selon deux critères :

- Le RMSD entre le mode d'interaction prédit et la structure cristalline
- Le coefficient de corrélation entre l'activité biologique (IC50) des molécules étudiées et la valeur de leur affinité fournie par Surflex.

Le programme Surflex-dock s'est avéré suffisamment performant puisqu'il reproduit assez bien les résultats expérimentaux avec plus de 82% des valeurs de RMSD inférieures à 2 Å et montre une assez bonne corrélation entre les deux paramètres analysés, activité biologique et affinité soit $r = 0,52$

Dans le but de trouver de nouvelles molécules inhibitrices de l'ARN polymérase NS5B du VHC, nous avons effectué plusieurs mono substitutions et bi substitutions de la molécule Sofosbuvir, un traitement contre l'hépatite C, récemment mis sur le marché. Nous nous sommes servis de cette molécule comme structure de départ sur laquelle nous avons opéré différentes substitutions.

Nous avons effectué au total 36 mono substitutions et 20 bi substitutions à travers lesquelles nous avons pu remarquer une amélioration significative de l'affinité (7.72 à 10.46 M⁻¹) par rapport à l'affinité de la molécule de base qui était de (5,52 M⁻¹).

Parmi ces composés présentant des affinités supérieures à celle du Sofosbuvir, nous avons choisi les 6 molécules ayant la meilleure affinité pour évaluer les paramètres permettant leur validation comme substances antivirales. Parmi ces 6 molécules il y a 4 molécules issues de la mono substitution et 2 de la bi substitution à savoir : les composé (N° 04, 26, 27,17, 37 et 53) qui ont des affinités de (10,37 ; 9,07 ; 10,46 ; 9,06 ; 7,72 ; 8,30 M⁻¹) respectivement.

Nous avons constaté que les 6 composés étudiés répondent parfaitement à la règle de 5 de *Lipinski*, et s'inscrivent ainsi dans la marge des critères des propriétés physico-chimiques.

Nous avons complété notre travail par l'étude des interactions des molécules retenues : N° 26, 27, 04, 17 avec le site actif de l'ARN polymérase NS5B en visualisant les différents types de liaisons faibles mis en jeu, notamment les liaisons H.

Nos résultats montrent que ces composés forment de nombreuses liaisons hydrogène, mais également plusieurs interactions hydrophobes avec le site actif de l'ARN polymérase NS5B. A travers l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que ces composés N°: 26, 27, 04, 17 peuvent être proposés comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme ARN polymérase NS5B.

Par ailleurs, nous envisageons de poursuivre ce travail par une étude approfondie de l'effet de ces composés sur l'inhibition de l'ARN polymérase NS5B, en faisant appel à d'autres programmes de docking et de simulation *in silico*. Notre étude n'étant que préliminaire, des tests complémentaires *in vitro* et/ou *in vivo* s'imposent pour valider ces résultats théoriques.

Références bibliographiques

A

1. Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., and Miyano, M. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure*, 7(11): p. 1417-26.
2. Ait-Goughoulte, M., C. Hourieux, Patient R, Trassard S, Brand D, Roingeard P. (2006). "Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly." *J Gen Virol* 87(Pt 4): 855-60.
3. Aligo, J., S. Jia, Manna D. et Konan KV. (2009). "Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein." *Virology* 393(1): 68-83.
4. Alter, H. J., R. H. Purcell, P. V. Holland, et H. Popper. (1978). Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1: 459-63.
5. Appel, N., M. Zayas, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, (2008). "Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly." *PLoS Pathog* 4(3): e1000035.
6. Armstrong G.L., Wasley A., Simard E. P. et *al.*, (2006). The Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med.*, 144:705-714.

B

7. Bartenschlager, R., M. Frese, et Holland M.. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." *Adv Virus Res* 63: 71-180.
8. Behrens, S.E., Tomei, L., et De Francesco, R., (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.*, 15(1): p. 12- 22.

9. Bihl, F., and F. Negro. (2009). Chronic hepatitis E in the immunosuppressed: a new source of trouble? *Journal of Hepatology*. 50:435-437.
10. Boucherit H. (2012). These de magister en Biochimie, Université Frères Mentouri.
11. Boehringer, D., R. Thermann, A. Ostareck-Lederer, J. D. Lewis, and H. Stark. (2005). Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13: 1695-706.
12. Boulant, S., R. Montserret, et Wiging L. (2006). "Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *J Biol Chem* 281(31): 22236-47.
13. Branch, A. D., D. D. Stump, et Tran V. (2005). "The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others." *Semin Liver Dis* 25(1): 105-17.
14. Brass, V., E. Bieck, et Charlton M. (2002). "An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A." *J Biol Chem* 277(10): 8130-9.
15. Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F.A., (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96(23): p.13034-9.
16. Buléon A., Pérez S., Tran V. (2011) La modélisation moléculaire Visualiser, Calculer, Simuler. [En ligne]. <http://www.abi.snv.jussieu.fr/jompo/Public/PSF/modelisation.pdf>.

C

17. Charlton, M. (2001). Hepatitis C infection in liver transplantation. *Am J Transplant* 1: 197-203.
18. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A. J., (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne Non-A, Non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902):359-62.

19. Choo, Q. L., K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P. J. Barr, and et al. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2451-5.
20. Clarke, D., S. Griffin, et Snoeck, J. (2006). "Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro." *J Biol Chem* 281(48): 37057-68.
21. Coelmont, L., Hanouille, X., Chatterji, U., Berger, C., Snoeck, J., Bobardt, M., Lim, P., Vliegen, I., Paeshuyse, J., Vuagniaux, G., Vandamme, A.M., Bartenschlager, R., Gallay, P., Lippens, G., Neyts, J., (2010). DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS one* 5, e13687.



22. Damborsky J., Brezovsky J. (2009). Computational tools for designing and engineering biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. 13 : 26-34.
23. De Niet, A., H.L. Zaaijer, I. Ten Berge, C.J. Weegink, H.W. Reesink, and U. Beuers. (2012). Chronic hepatitis E after solid organ transplantation. *Netherlands Journal of Medicine*.70:261-266.
24. DK news, (2015) Traitement de l'hépatite C\Sofosbuvir 400, des laboratoires Beker : Un traitement révolutionnaire qui peut guérir jusqu'à 90% des malades atteints d'hépatite C [En ligne] <http://www.dknews-dz.com/article/52564-traitement-de-lhepatite-c-sofosbuvir-400-des-laboratoires-beker-un-traitement-revolutionnaire-qui-peut-guerir-jusqua-90-des-malades-atteints-dhepatite-c.html>. Consulter le: 23/04/2016
25. Domingo, E., (1998). Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin Diagn Virol.*, 10(2-3): p. 97-101.
26. Duarte, E.A., Novella IS, Weaver SC, Domingo E, Wain-Hobson S, Clarke DK, Moya A, Elena SF, de la Torre JC, Holland JJ. (1994) RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect Agents Dis*. 3(4): p. 201-14.

27. Dubuisson, J., F. Penin, et Moradpour D. (2002). "Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids." *Trends Cell Biol* 12(11): 517-23.

E

28. Eng, F., Branch, A. D.; Stump, D. D.; Gutierrez, J. (2007). A novel IRES in the core-encoding region stimulates production of mini-core, a small protein comprised of the C-terminal portion of the core protein, in 14th International Symposium on HCV and related viruses.: Glasgow, Scotland, UK.

F

29. Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J., and Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New England Journal of Medicine*, 292, 767-770.
30. Flint, M., T. von Hahn, J. Zhang, M. Farquhar, C. T. Jones, P. Balfe, C. M. Rice, and J. A. McKeating. (2006). Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* 80: 11331-42.
31. Foote J., Milstein C. (1994). Conformational isomerism and the diversity of antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:10370–74
32. Fraser CS, Doudna JA. (2007). Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* ;5:29–38. [[PubMed](#)]
33. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol.* ;75:12047–12057. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
34. Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F.L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J., (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine* 347, 975-982.

G

35. Gabb J., Jackson R.M., Sternberg M.J.E. (1997). Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* 272 :106–120.
36. Gao, D. Y., X. LI , X. Zhang, (2008). "Assessment of specific antibodies to F protein in serum samples from Chinese hepatitis C patients treated with interferon plus ribavirin." *J Clin Microbiol* 46(11): 3746-51.
37. Geldenhuys W. J., Gaasch K. E., Watson M., Allen D. D., Van der SchyfC. J. (2006). Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. *Drug Discovery Today*.11: 127-132.
38. Gilead. (2013).European Medicines Agency, Summary on compassionate use for Sofosbuvir. [En ligne].
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2013/12/WC500156825.pdf. consulter le 13/04/2016
39. Gilead. (2014). European Medicines Agency - Sovaldi résumé caractéristique du produit. [En ligne]. http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002798/WC500160597.pdf. consulter le 13/04/2016
40. Gosert, R., Egger D. et Lohmann V. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*, 77(9): p. 5487-92.
41. Griffin, S. D., L. P. Beales, (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." *FEBS Lett* 535(1-3): 34-8.

H

42. Hadziyannis, S.J., Sette, H., Jr., Morgan, T.R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Jr., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P.J., Lin, A., Ackrill, A.M., Group, P.I.S., (2004). Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of internal medicine* 140, 346-355.
43. Haute Autorité de Santé (HAS). (2006). Hépatite Chronique C - Guide Affection Longue durée. [En ligne]. [.http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/06-072_hepat-c_internet_sans_liste .pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/06-072_hepat-c_internet_sans_liste.pdf).
44. Helle F. Cocquerel. L. (2008). L'entrée du virus de l'hépatite C dans ses cellules cibles. *Virologie*, 12 (2) : 105-16
45. Hellen, C. U., and P. Sarnow. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15: 1593-612.
46. Herker, E., Ott, M., (2011). Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22, 241-248.
47. Honda M, Rijnbrand R, Abell G, Kim D, Lemon SM. (1999). Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long- range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol.* ; 73:4941–4951. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
48. Huang, H., F. Sun, (2007). "Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(14): 5848-53.

I

49. Imbert I, Dimitrova M, M Wolf, Schuster C, (2004). Réplication du virus de l'hépatite C : systèmes d'étude, avantages et limites. *Virologie*. Volume 8, Numéro 4, 281-95

J

50. Jhaveri, R., G. Qiang, et Dieh A M. (2009). "Domain 3 of hepatitis C virus core protein is sufficient for intracellular lipid accumulation." *J Infect Dis* 200(11): 1781-8.
51. Jones G., Willett P., Glen RC. (1995). Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol.* 245 : 43–53.
52. Journal el watan, (2015). Traitement de l'hépatite C : Mise sur le marché d'un nouveau médicament fabriqué en Algérie numéro du . 13.12.2015

K

53. Kim M, Kim H, Cho SP, Min MK. (2002). Template requirements for de novo RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase on the viral X RNA. *J Virol.* 76:6944–6956. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
54. Kolykhalov, A.A., S.M. Feinstone, et C.M. Rice, (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol.*, 70(6): p. 3363-71.
55. Kuo, G., Q. L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, T. Miyamura, J.L. Dienstag, M. J. Alter, C. E. Stevens, (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-4.

L

56. Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., Orum, H., (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198-201.
57. Lawitz, E., M. Rodriguez-Torres, et J. Denning. (2011). Once daily dual-nucleotide combination of PSI-938 and PSI-7977 provides 94% HCV-RNA <LOD at day 14: first purine/pyrimidine clinical combination data (the nuclear study). *Journal of Hepatology*. 54 (Suppl 1):543.
58. Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M. (2007). Hepatitis C Virus. In : Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. : 1253-304
59. Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., and Weber, P.C., (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat. Struct. Biol.* 6(10): p. 937-43.
60. Lohmann, V., Korner, F., Herian, U., and Bartenschlager, R., (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J.Virol.*, 71(11): p. 8416-28.
61. Luik, P., C. Chew, Aittoniemi J, Chang J, Wentworth P, Jr., Dwek RA, (2009). "The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31): 12712-6.

M

62. Ma, Y., J. Yates, Yuqiong Liang et MinKyung Yi. (2008). "NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly." *J Virol* 82(15): 7624-39.
63. Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K., (2001). Peginterferon alfa-2b

plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965.

64. MAST E. E., HWANG L.Y., . SETO D. S. Y., (2005). Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C Virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J. Infect. Dis.*, 192:1880–9.
65. McCarthy D. J. (1999). Computational approaches to structure-based ligand design. *Pharmacology & Therapeutics*. 84: 179-191.
66. Merzoug , A. , Mermoum S. , Khaled S. , Chikhi A. , Bensegueni A. , Boucherit H. (2015). Theoretical Study of the Interactions Involved in the Inhibition of *Staphylococcus aureus* Peptide Deformylase by GSK1322322 Derivatives, *Journal Academica* Vol. 5(2), pp. 16-29.
67. Meguenani K. et Zebila A. (2014) : inhibition in silico dde la Shikimate 5-Déshydrogénase (aroE) de *Helicobacter pylori* pour combattre l'ulcère : mémoire de Master en Biochimie, Université Frères Mentouri.
68. Mitsui, T., K. Iwano, K. Masuko, C. Yamazaki, H. Okamoto, F. Tsuda, T. Tanaka, and S. Mishiro. (1992). Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology* 16: 1109-14.
69. Miyanari, Y., K. Atsuzawa, Usuda N. ,et Shimotohno K. (2007). "The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production." *Nat Cell Biol* 9(9): 1089-97.
70. Molina, S., V. Castet, C. Fournier-Wirth, L. Pichard-Garcia, R. Avner, D. Harats, J. Roitelman, R. Barbaras, P. Graber, P. Ghersa, M. Smolarsky, A. Funaro, F. Malavasi, D. Larrey, J. Coste, J. M. Fabre, A. Sa-Cunha, et P. Maurel. (2007). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46: 411-9.

N

71. Navas, S., Martin J., Quiroga J A., Castillo I, et CarreñoV. (1998). "Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients." *J Virol* 72(2): 1640-6.

72. Neumann, A.U., Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS., (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*,. 282(5386): p. 103-7.
73. Nicot T., Rogez S. , Deniz F. (1997). Epidemiology of hepatitis C in Africa. *Gastroenterol Clin Biol.* ; 21(8-9):596-606.

O

74. Ohto, H., S. Terazawa, N. Sasaki, N. Sasaki, K. Hino, C. Ishiwata, M. Kako, N. Ujiie, C. Endo, A. Matsui, (1994). Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 330: 744-50.
75. OMS, (2004). Department of Measurement and Health Information. Estimated total deaths by cause and WHO Member State, 2002. www.who.int/evidence/bod consulter le 13/04/2016
76. OMS, (2015). Hépatite C Aide-mémoire N°164 [En ligne] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/fr/> consulter le 13/04/2016
77. Op De Beeck, A., L. Cocquerel, et Dubuisson J. (2001). "Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *J Gen Virol* 82(Pt 11): 2589-95.

P

78. Paul D., Dominique R., (2003). "Virus de l'hépatite C". Elsevier, Ed. Paris, p. 190, 2003.
79. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D. (2004). Structure and function of the membrane anchor

domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. J Biol Chem. 279:40835–40843. [PubMed]

- 80.** Pietschmann, T., A. Kaul, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R. (2006). "Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras." Proc Natl Acad Sci U S A 103(19): 7408-13.
- 81.** Pomper, G. J., Y. Wu, and E. L. Snyder. (2003). Risks of transfusion-transmitted infections: 2003. Curr Opin Hematol 10: 412-8.

Q

- 82.** Qian Z., Fields C. J., Yu Y., Lutz S. (2007). Recent progress in engineering alpha/beta hydrolase-fold family members. Biotechnology Journal. 2: 192-200.

R

- 83.** Robertson, B., et Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A, (1998) .Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol, 143(12): p. 2493-503.
- 84.** Rong, L., Dahari, H., Ribeiro, R.M., Perelson, A.S., (2010). Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. Science translational medicine 2, 30ra32.
- 85.** Roussel, J., A. Pillez, et al. (2003). "Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein." J Gen Virol 84(Pt 7): 1751-9.

S

86. Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2001) . Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 276(47): p. 44052-63.
87. Shavinskaya, A., S. Boulant, (2007). "The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly." *J Biol Chem* 282(51): 37158-69.
88. Sherman, M., S. Shafran, K. Burak, K. Doucette, W. Wong, N. Girgrah, E. Yoshida, E. Renner, P. Wong, et M. Deschenes. (2007). Management of chronic hepatitis B: consensus guidelines. *Can J Gastroenterol* 21 Suppl C: 5C-24C.
89. Soriano V, Vispo E, Poveda E (2011). Directly acting antivirals against hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother.* 66(8): p. 1673-86.
90. Sousa S. F., Fernandes P. A., Ramos M. J. (2006). Protein ligand docking: current status and future challenges. *Proteins.* 65, 15–26.
91. Steinmann, E., F. Penin, (2007). "Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions." *PLoS Pathog* 3(7): e103.
92. Sutton AJ, Edmunds WJ, Sweeting MJ, Gill ON (2008). The cost-effectiveness of screening and treatment for hepatitis C in prisons in England and Wales: a cost-utility analysis. *Journal of Viral Hepatitis*, 15 : 797-808
93. Sy, T., et M. M. Jamal. (2006). Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 3: 41-6

T

94. Taylor R. D., Jewsbury P. J., Essex J. W. (2003). FDS: flexible ligand and receptor docking with a continuum model and soft-core energy function. *J. Comput. Chem.* 24 (13), 1637–1656.

95. Teniou S. (2012) : Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Thèse de magistère : Technologie des Explorations Biochimiques, Université Frères Mentouri Constantine.
96. Thiriot E. (2009). Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. 291 p.
97. Tocino Diaz JC. (2000). Développement d'un programme d'amarrage protéine-protéine. Thèse Master: Bioinformatique. Bruxelles : Université Libre de Bruxelles. Belgique. 72p.
98. Troesch, M., I. Meunier, (2006). "Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein." *Virology* 352(2): 357-67.



99. Vassilaki, N. and P. Mavromara (2003). Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem*, 278(42): p. 40503-13.
100. Vassilaki, N., P. Friebe, (2008). "Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication." *J Virol* 82(23): 11503-15.
101. Vieth M., Hirst JD., Kolinski A., Brooks CL. (1998). Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.* 19 : 1612-1622



102. Welsch, C., Jesudian, A., Zeuzem, S., Jacobson, I., (2012). New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* 61 Suppl 1, i36-46.

- 103.** Wodak S. J., Janin J. (1978). Computer analysis of protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 124, 323-342.

X

- 104.** Xu, Z., et Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J.*, 20(14): p. 3840-8.

ANNEXE

Liste des 140 complexes et leur RMSD utilisés pour tester le programme Surflex :

N°	Complexe	RMSD (Å)
1	3drs	1,792
2	3pw1	1,817
3	4uru	0,694
4	1e18	1,105
5	4r0i	1,176
6	3lop	0,035
7	4dwb	4,324
8	4dwg	4,565
9	4dxj	1,318
10	4izs	0,779
11	3iuy	0,724
12	2iv3	1,969
13	4oic	1,462
14	3ns2	0,974
15	3nr4	0,953
16	3kdi	1,438
17	1rty	1,024
18	2ah6	1,1
19	2ohv	1,222
20	5cgw	0,039
21	5cgx	1,291
22	5dgz	1,783
23	5dhj	1,983
24	5dia	1,984
25	5djf	1,888
26	1asd	1,883
27	3ert	1,929
28	1cnb	0,059
29	1wbv	1,703
30	1xws	1,521
31	2vcn	0,256
32	4eds	1,635
33	4yku	1,832
34	4dgm	1,995
35	4wqa	1,265
36	4wty	1,007

37	4aga	1,495
38	4rcd	0,887
39	2ybi	10,245
40	3rt4	4,396
41	3sdf	1,124
42	4wxc	0,032
43	1ide	1,449
44	1sde	0,739
45	1tde	1,459
46	2war	1,129
47	2way	0,712
48	2wbn	4,414
49	2wdo	5,201
50	2wds	4,769
51	2wdy	5,299
52	2wjh	1,662
53	3wsx	0,033
54	4pdx	0,435
55	4tqx	1,355
56	4tsx	0,049
57	4wdt	1,12
58	4wdu	4,417
59	4wxp	1,154
60	4wy3	1,552
61	4xve	0,613
62	3onc	0,941
63	5hrt	1,635
64	4xf9	0,762
65	4xfa	1,435
66	1rai	1,232
67	1zag	1,529
68	1za2	0,904
69	1qab	1,293
70	1qaf	1,348
71	1qag	0,387
72	1qan	0,567
73	1qao	0,841
74	1qap	0,046
75	1qaq	0,752
76	1qax	1,636
77	1qay	1,548
78	1rae	1,144
79	4qrf	1,814

80	4gq0	1,874
81	4e9a	1,624
82	1d2z	0,748
83	1azs	1,809
84	4aen	5,82
85	4ah2	1,465
86	3onb	1,832
87	3d1y	0,379
88	3cyx	0,739
89	3cyw	0,763
90	3D20	4,202
91	3fr0	1,628
92	4wte	0,915
93	3d10	5,17
94	3df7	1,98
95	4u5l	1,523
96	4ong	9,573
99	3tro	1,638
100	4as9	1,807
101	4as2	1,404
102	1bqn	0,494
103	2qd6	1,476
104	2qd1	4,362
105	2qd3	0,38
106	1bqm	0,888
107	2ynx	8,523
108	2yoi	0,921
109	3hkt	1,172
110	4b1r	2,083
111	4eat	0,048
112	4wt9	1,436
113	4wte	0,69
114	4wtd	4,662
115	5c7h	9,459
116	4d7m	2,216
117	4ufd	4,193
118	4ufg	4,094
119	3DLE	1,863
120	3c6u	0,435
121	3c6t	1,536
122	2c2s	0,966
123	3m8p	1,847
124	3m8q	1,755

125	1ZAF	0,814
126	3fr2	1,331
127	3fr4	4,791
128	2c2t	0,926
129	4xfi	1,63
130	3d1x	0,828
131	1g2a	1,371
132	1g27	4,942
133	2b5j	0,821
134	2ban	0,29
135	2be2	4,37
136	2i5j	0,893
137	3dle	0,768
138	3dlg	0,908
139	3dRp	1,077
140	3dRR	1,178

التهاب الكبد الوبائي هو مرض ناجم عن فيروس التهاب الكبد الوبائي بحيث لم يتوصل الباحثون الى حد الساعة الى علاج فعال او ما يعرف بلقاح يقضي على المرض 100 %.

و في الاونة الاخيرة تم تسويق دواء جديد تحت اسم سوفوسوفير كعلاج لالتهاب الكبد ج و هو مركب كايح لARN بوليميراز NS5B هذا الاخير هو عبارة عن بروتين فيروسي ضروري للنشاط الحيوي للفيروس .

نظرا للأعراض الجانبية التي تنتج عن استعمال هذا الدواء يجب تطوير جزيئات جديدة اكثر فعالية . ومن خلال هذه الفكرة تمكن دراستنا. حيث قمنا بإدخال عدة تبادلات على البنية الجزيئية للسوفوسوفير لدراسة تثبيت RNA بوليميراز NS5B و كذلك لدراسة التفاعلات الحاصلة مع هذا الإنزيم باستخدام تكنولوجيا الالتحام الجزيئية عن طريق برنامج Surflex.

سابقا اختبرنا فعالية هذا البرنامج من خلال التجربة التي أعطت أكثر من 82% من قيم Å2 أقل من RMSD ومعامل الارتباط حوالي 0.52 والتي تعتبر جيدة بما فيه الكفاية. ويمكن استخدام البرنامج بكل ثقة لدراسة الهياكل الجزيئية المختلفة المدرجة في هذا العمل. في الواقع لقد قمنا بإننتاج 36 مركب احادي التبدل و 20 مركب ثنائي التبدل حيث لاحظنا تحسنا كبيرا في قيم التقارب مقارنة بما كان عليه قبل عملية التبدل (M-1 5,52).

من بين هذه المركبات ذات قيم التقارب الاعلى من سوفوسوفير اخترنا المركبات (رقم 04, 26, 27, 17, 37 و 53) ذات القيم على التوالي : (10.37, 9.07, 10.46, 9.06, 7.72, 8,30 M-1) لتقييم المؤشرات التي تسمح باعتبارها كمثبطات لهذا الإنزيم.

تطبيقا لقاعدة ليبنسكي نستطيع ان نقترح 4 مركبات جديدة مثبطة لل ARN بوليميراز NS5B و هي اكثر فعالية من السوفوسوفير ومع ذلك تحتاج المصادقة عليها كمركبات مضادة لهذا الفيروس الى اجراء مزيد من الاختبارات في المختبر والجسم.

كلمات البحث: الإرساء الجزيئي , Surflex , RMSD , معامل الارتباط , بدائل, ARN بوليميراز NS5B و التهاب الكبد الوبائي ج.

Hepatitis C is a liver inflammation caused by HCV virus. That until now, researchers have been unable to develop a vaccine or an effective treatment that cures hepatitis C at 100%. Recently the sofosbuvir was marketed as a treatment for hepatitis C as an inhibitor of RNA polymerase NS5B. This protein is essential for the vital process of the virus.

In fact, sofosbuvir creates some unwanted effects. The limits of this treatment needed to develop new and more effective molecules.

In this idea, we made several substitutions sofosbuvir: 36 mono-substituted and 20 bi-substituents that we studied their inhibition of RNA polymerase NS5B as they interact with this enzyme using the technique of molecular docking by Surflex program.

This software and with over 82% of the RMSD values less than 2 Å and a correlation coefficient $r = 0.52$ is considered good enough and fit perfectly with different molecular structures included in this study.

Indeed, we have made 36 mono substitutions and 20 bi substitutions. by this, we noticed a significant improvement in affinity compared to that of the Sofosbuvir that was (5.52 M⁻¹).

Among these compounds with affinities greater than that of sofosbuvir we chose the best namely compounds (No. 04, 26, 27,17, 37 and 53) which have respective affinities (10.37; 9.07; 10.46; 9.06; 7.72; 8.30 M⁻¹) to evaluate the parameters for validation as inhibitors of the enzyme.

The application of the Rule of Lipinski helped us to propos 4 molecules that are considred as potentially more active than sofosbuvir inhibitors.

Keywords: Molecular Docking, Surflex-Dock, RMSD, correlation coefficient, RNA polymerase NS5B, hepatitis C, substitutions.

**Inhibition *in silico* de l'ARN polymérase NS5B pour combattre le virus
l'hépatite C**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en BMS

L'hépatite C est une inflammation du foie provoquée par le virus VHC pour laquelle les chercheurs n'ont pu mettre au point ni vaccin ni traitement efficace jusqu'à aujourd'hui. Récemment, le sofosbuvir, un inhibiteur de l'ARN polymérase NS5B, a été mis sur le marché comme traitement de l'hépatite C. Cependant, les limites de ce traitement en termes d'efficacité et d'effets indésirables imposent de développer de nouvelles molécules.

Dans cette optique, nous avons effectué plusieurs substitutions du Sofosbuvir afin d'étudier l'inhibition de l'ARN polymérase NS5B ainsi que leur mode d'interaction avec cette enzyme en utilisant la technique du docking moléculaire via le programme Surflex. Auparavant, nous avons testé l'efficacité de ce logiciel à travers une expérimentation qui a donné plus de 82% des valeurs du RMSD inférieures à 2 Å et un coefficient de corrélation de l'ordre de 0.52, ce qui est jugé assez performant. Le logiciel peut donc être utilisé en toute confiance pour l'étude des différentes structures moléculaires retenues dans ce travail.

En effet, nous avons effectué 36 mono substitutions et 20 bi substitutions. par ce fait, nous avons remarqué une amélioration significative de l'affinité par rapport à celle de la molécule de base qui était de (5,52 M⁻¹).

Parmi ces composés présentant des affinités supérieures à celle du Sofosbuvir nous avons choisi les meilleurs à savoir les composés (N° 04, 26, 27,17, 37 et 53) qui ont des affinités respectives de (10,37 ; 9,07 ; 10,46 ; 9,06 ; 7,72 ; 8,30 M⁻¹) pour évaluer les paramètres permettant leur validation comme inhibiteurs de l'enzyme.

L'application de la règle de 5 de Lipinski nous a permis de proposer 4 molécules parmi les substituants obtenus et que nous recommandons comme des inhibiteurs potentiellement plus actifs que le Sofosbuvir. Leur validation en tant que nouveaux composés antiviraux reste, cependant, tributaire de tests complémentaires *in vitro* et *in vivo*.

Mots clés : Docking moléculaire, Surflex-dock, RMSD, coefficient de corrélation, l'ARN polymérase NS5B, Hépatite C, substitutions.

Laboratoire de recherche :

Jury d'évaluation :

Président du jury : BENSEGUENI A. (Professeur - UFM Constantine),
Rapporteur : MOKRANI E.H. (MAA - UFM Constantine),
Examineur : TENIOU S. (MAA- UFM Constantine).

Date de soutenance : 15/06/2016