

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Mathématiques et de l'Informatique et des Sciences de la Matière
Département des Sciences de la Matière
Spécialité : Chimie Physique



**Mémoire de fin d'études
Master**

Présenté par : **M^{elle} HIMEUR Loubna**
M^{elle} NEMAMCHA Zahra

Intitulée

**Investigation théorique de l'interaction de la chloroquine
et ses dérivés avec la protéase majeure du covid-19**

Sous la direction de :
D^r. AIMENE Yassine

Juillet 2021



Remerciements

Tout d'abord, nous remercions le DIEU, notre créateur de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

À notre encadreur de mémoire le [Dr Aimene yassine](#), pour avoir accepté de nos encadrer, pour son dynamisme, son aide et ses précieux conseils, nous ont permis d'avancer plus loin dans nos recherches, nous tiens à lui exprimer toute nos gratitude et tout particulièrement à le remercie profondément.

Nos sincères remerciements vont au [Pr. Mekki Kadri](#), le directeur du Laboratoire de Chimie Physique (LCP) de l'Université de Guelma, de nous avoir accueilli dans son Laboratoire de recherche.

Nous réservons une mention particulière à toutes les personnes qui nous ont apporté leur soutien et leur aide et tout particulièrement [Zeyneb Ourdjini](#) et un remerciement spécial au [Dr Kamel Zakri](#).

Pour finir, Un grand merci et spécial au [Dr Aimene Yassine](#) Nous lui souhaitons plus d'éclat et de succès.





DEDICACE

Dieu merci

Je dédie ce projet :

A MON CHER PÈRE

A MA CHÈRE MÈRE

Qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études et leurs Sacrifices sans limites.

A MON FRÈRES Mohamed Nour Al islam et mahdi **A MES SŒURS** Imen Siham Wiam Selma ImenMLk **MON NEVEU GÂTÉ** Kosia Fajre Al islam **MON BEAU FRÈRE** issam

Pour ses soutiens moraux, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

A MON CHER BINÔME *Zahra*

Pour sa entent et sa sympathise, et Pour lui d'indéfectible soutien et lui patience infinie

MES CHÈRES AMIES Chamso Youssra Fatma khawla

Pour leurs encouragements permanents.

A MA GRANDE PÈRE Lakhdar **MES OISEAUX** *tilou et mizou*

foubna himeur





DEDICACE

Je dédie ce travail :

D'ABORD POUR MES PARENTS

Qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour. Merci pour leur soutien tout au long de mes études et leurs sacrifices sans fin.

À MES CHÈRES SŒURS

Karima, Hayette, Aida à mon frère *Bachir*, sa femme *Warda*
et MON PETIT *Jojo*

Pour leur soutien, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite. A ma grand-mère, à tous mes cousins, et à toute ma famille

Merci beaucoup, ma partenaire de travail et MA SŒUR *Loubna*.

À TOUS MES CHERS AMIS

Ahlam, Chaïma, Rayan Chaimouma, Najwa et Dodo

Merci à tous les amis que je me suis fait pendant mes études, j'espère que notre amitié continuera.

Nemamcha Zahra



Résumé :

Depuis décembre 2019, la maladie à coronavirus (Covid-19) causée par le syndrome respiratoire aigu coronavirus 2 (Sars-CoV-2) est apparue à Wuhan et est devenue par la suite une épidémie mondiale. En l'absence de traitements reconnus efficaces contre le Covid-19, l'Algérie a opté dès le départ pour l'hydroxychloroquine afin de traiter les patients hospitalisés. Le but de notre étude est l'évaluation *in-silico* de l'activité biologique de la chloroquine et ses dérivés vis-à-vis la protéase majeure du sars-cov-2 (M^{pro}). Le programme d'Autodock4.2 est utilisé pour développer *in-silico* de nouveaux inhibiteurs (CQ-Br, CQ-NH₂ et CQ-CH₃) potentiellement plus efficaces que la chloroquine et/ou hydroxychloroquine. Les résultats préliminaires montrent une forte affinité du médicament hydroxychloroquine, envers de la protéase majeure M^{pro} du Sars-CoV-2, par comparaison à son analogue chloroquine ; ce qui est cohérent avec les résultats cliniques. Parmi les trois dérivés nouvellement conçus, le composé CQ-NH₂ montre une nette amélioration de son énergie d'interaction, qui passe de -7,03 (dans le cas de CQ) à -8,11 Kcal/mole. La meilleure affinité du dérivé CQ-NH₂ peut s'expliquer par la contribution importante de l'extrémité -NH₂ dans les interactions Ligand-Enzyme, ce qui rend le dérivé CQ-NH₂ un candidat potentiel en tant qu'agent antiviral. Enfin, nous suggérons de vérifier ces résultats théoriques par des études expérimentales *in-vitro* et/ou *in-vivo*.

Mots clés : Covid-19, protéase majeure M^{pro} , chloroquine, amarrage moléculaire.

Abstract:

Since December 2019, a disease of coronavirus (Covid-19) caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (Sars-CoV-2) appeared at Wuhan and became later a global epidemic. In the absence of recognized effective treatments against Covid-19, Algeria opted from the outset for hydroxychloroquine to treat hospitalized patients. The aim of our study is to evaluate *in-silico* of the biological activity of chloroquine and its derivatives against Sars-cov-2 main protease (M^{Pro}). Autodock4.2 program is used to develop *in-silico* new inhibitors (CQ-Br, CQ-NH₂ and CQ-CH₃) potentially more efficient than chloroquine and/or hydroxylchloroquine. The preliminary results show a strong affinity of the hydroxychloroquine drug, towards the Sars-CoV-2 main protease, compared to its chloroquine analogue; which is consistent with the clinical results. Among the three newly designed derivatives, the compound CQ-NH₂ shows a fine improvement in its binding energy, decreasing from -7.03 (in the case of CQ) to -8.11 Kcal/mol. The best affinity of the CQ-NH₂ derivative can be explained by the important contribution of the -NH₂ end in “Ligands-Enzyme” interactions, which makes the CQ-NH₂ derivative a potential antiviral candidate. Finally, we suggest to verify these theoretical results by experimental studies *in-vitro* and/or *in-vivo*.

Keywords : Covid-19, main protease M^{Pro}, chloroquine, molecular docking.

ملخص:

منذ ديسمبر 2019 ، ظهر مرض فيروس كورونا في اووهان (كوفيد-19) ناجم عن متلازمة الالتهاب التنفسي الحاد (سارس كوفيد-2) حيث اصبح بعد ذلك وباءا عالميا. في ظل عدم وجود علاجات فعالة معترف بها ضد كوفيد-19 ، اختارت الجزائر منذ البداية استعمال الهيدروكسي كلوروكين لعلاج المرضى في المستشفى. الهدف من دراستنا هو تقييم النشاط البيولوجي للكلورين ومشتقاته تجاه البروتياز الرئيسي لفيروس كورونا المستجد، باستخدام طرق المحاكاة النظرية. بمساعدة برنامج المحاكاة Autodock4.2 ، قمنا بتصميم مثبطات جديدة يحتمل ان تكون أكثر كفاءة من الكلوروكين و/أو الهيدروكسي كلوروكين. تظهر النتائج الأولية عن طريق المحاكاة وجود ترابط قوي وفعال لدواء الهيدروكسي كلوروكين تجاه البروتياز الرئيسي لفيروس كورونا المستجد، بالمقارنة مع نظيره الكلوروكين، وهو ما يتوافق مع النتائج السريرية. من بين المشتقات الثلاثة المصممة حديثا، يظهر المركب CQ-NH₂ تحسناً ملحوظاً في طاقة التفاعل الخاصة به، حيث انخفضت من 7.03- (في حالة الكلوروكين) إلى 8.11- كيلو كالوري/مول. يمكن تفسير هذا التقارب القوي لمشتق CQ-NH₂ من خلال المساهمة المهمة لمجموعته الوظيفية الأمينية في تفاعلات "إنزيم-مثبط"، مما يجعله مرشحا محتملا كمضاد للفيروسات. في الأخير، نقترح التحقق من هذه النتائج النظرية من خلال الدراسات التجريبية في المختبر و/أو في الكائن الحي.

الكلمات المفتاحية: كوفيد-19، البروتياز الرئيسي M^{pro}، الكلوروكين، الإلتحام بالمحاكاة.

Liste des figures

Figure 1 : Le Sars-CoV-2, coronavirus responsable de la maladie covid-19, n'épargne personne.....	4
Figure 2 : Modélisation du virus Sars-CoV-2 (Covid-19).....	6
Figure 3 : Topologie des protéines structurales présentes du l'enveloppe des coronavirus.	7
Figure 4 : Représentation schématique de la production de particules virales par une cellule	8
Figure 5 : structure 3D de la protéase majeure du sars-cov-2 ($M^{pro}/3Cl^{pro}$) et l'identification du site actif	10
Figure 6 : schémat montrant la protéase M^{pro} clivant la polyprotéine.....	11
Figure 7 : Mécanisme de clivage des protéases a cystine.....	12
Figure 8 : principe d'action des inhibiteur de protease	12
Figure 9 : Surface du site actif de la M^{pro} en contact avec N3	13
Figure 10 : Activité antivirale de molécules nouvellement découvertes contre le Sars-CoV-2.	14
Figure 11 : Mécanismes généraux possibles de l'interaction N3- M^{pro} . R1 et R2 représentent les substituants du groupe vinyle (R : Recepteur, I : Inhibiteur)	15
Figure 12 : structure de la chloroquine et hydroxychloroquine.....	16
Figure 13 : Utilisation des différents logiciels d'amarrage moléculaire en 2010-2011 (fréquence de citation des noms des logiciels dans les titres et les résumés dans PubMed)	18
Figure 14 : Principe général de docking moléculaire.....	19
Figure 15 : Liaison hydrogène.....	21
Figure 16 : Interactions de Van Der Waals	21
Figure 17 : Interaction hydrophobe.....	22
Figure 18 : Interactions π - π	22
Figure 19 : Interaction halogène	23
Figure 20 : Interaction π - sulfure	23
Figure 21 : Visualisation de la molécule de la chloroquine (CQ) par le programme Chem3D.	28
Figure 22 : Les étapes essentielles de l'amarrage moléculaire	29
Figure 23 : Position de la boîte d'amarrage dans le site actif de la M^{pro}	31
Figure 24 : Superposition de la géométrie du ligand N3 naturel (couleur bleu) et de celle calculée par l'amarrage moléculaire (couleur rouge) dans le site actif de la protéase M^{pro}	33
Figure 25 : Interactions de l'inhibiteur N3 re-amarré avec les résidus de chaîne latérale dans la cavité du site actif de la protéase M^{pro} . La structure (A) 3D présentée par le programme AutoDock Tools et la projection (B) 2D présentée par le programme Discovery studio.	34
Figure 26 : Projection 2D des interactions de l'inhibiteur N3 naturel avec les résidus de chaîne latérale du site actif de la M^{pro}	34
Figure 27 : Alignements des dérivés de chloroquine dans le site actif de la M^{pro} . Ligand naturel N3 est coloré en rouge.....	36
Figure 28 : Histogramme des interactions des inhibiteurs avec les résidus de site actif de la M^{pro}	37
Figure 29 : Les énergies d'amarrage et les constants d'inhibition.....	37
Figure 30 : Résidus impliqués dans des contacts protéine-ligands dans le site actif de la protéase M^{pro}	38
Figure 31 : Superposition des ligands CQ et CQ-OH dans le site actif de la M^{pro} . Code de couleur : atomes de carbones en rouge pour CQ et en jaune pour CQ-OH.....	39
Figure 32 : Projection 2D (Discovery Studio) et 3D (AutoDock) des interactions ligand-récepteur, de la chloroquine avec M^{pro}	40
Figure 33 : Projection 2D (Discovery Studio) et 3D (AutoDock) des interactions ligand-récepteur, de l'hydroxy-chloroquine avec M^{pro}	40

Figure 34 : Interaction ligand-récepteur du complexe M^{pro} -CQ-Br. Projection 2D par « discovery studio » et 3D par « AutoDock ».....	42
Figure 35 : Interaction ligand-récepteur du complexe M^{pro} -CQ-NH ₂ . projection 2D par « discovery studio » et 3D par « AutoDock ».....	42
Figure 36 : Interaction ligand-récepteur du complexe M^{pro} -CQ-CH ₃ . Projection 2D par « discovery studio » et 3D par « AutoDock ».....	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les dérivées de chloroquine.....	28
Tableau S1 : Résultats d'amarrage moléculaire de la chloroquine et ses dérivés avec M^{pro}	47
Tableau S2 : Résidus impliqués dans des contacts protéine-ligands dans le site actif de la protéase Mpro ; liaison hydrogène (H), liaison carbone classique (CH), interaction hydrophobe (hy), interaction van-der-waals (vd), interaction π -sulfure (S), interaction halogène (hg).....	48

Abréviations

3CL^{pro}	3C-like protéase
ACE	Angiotensin-converting enzyme
ADT	AutoDock Tools
Ala	Alanine
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
Asn	Asparagin
Asp	Aspartique
CoV	Coronavirus
Covid-19	Coronavirus Disease 2019
CQ	Chloroquine : (4-[(7-Chloroquinolin-4-yl)amino]pentyl)diéthylamide
CQ-Br	N-(bromoéthyl) -N-(7-Chloroquinolin-4-yl)-N-ethylpentane-1,4diamine
CQ-CH₃	N-(7-Chloroquinolin-4-yl) -N-éthyle- N-propylpentane-1,4diamine
CQ-NH₂	N-(aminoéthyl) -N-(7-Chloroquinolin-4-yl)-N-ethylpentane-1,4diamine
CQ-OH	Hydroxychloroquine : 2-((4-(7-Chloroquinolin-4-yl)amino) pentyl)(éthyl)amino)éthanol
Cys	Cystéine
dlg	docking log file
Dpf	Docking Paramètre File
Glg	Grid LoG file
Glu	Glutamique
Glu	Glutamin
Gly	Glycine
Gpf	Grid Paramètre File
His	Histidine
Ile	Isoleucine
Ki	Constante d'inhibition
Leu	Leucine
Lys	Lysine
MERS	Syndrome respiratoire du Moyen-Orient
Met	Méthionine
MM	Mécanique moléculaire
M^{pro}	Protéase Majeure
N3	(N-[(5-METHYLISOXAZOL-3-YL) CARBONYL] ALANYL-L-VALYL-N~1~((1R,2Z) -4-(BENZYLOXY) -4-OXO-1-[(3R) -2-OXOPYRROLIDIN-3-YL] METHYL} BUT-2-ENYL) -L-LEUCINAMIDE)
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDB	Protéine Data Bank
Phe	Phénylalanine
Pro	Proline
RMSD	Root Mean Square Déviation
Sars-Cov	Syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus
SDF	Standard Data-base Format
Ser	serin
Thr / Trp	Théréonine /Tryptophane
Try / Tyr	Tyrosine / Therocine
Val	Valine
VDW	Van Der Waals
ΔG	Energie d'interaction

Table des matières

Introduction générale.....	1
Références.....	3

Partie bibliographique

I. Coronavirus humain, Sars-Cov-2 (Covid-19)	4
I.1. Définition	4
I.2. Chronologie de l'épidémie	5
I.3. Structure du coronavirus	6
I.4. Mécanisme d'action et de réplication virale.....	7
I.5. Comment peut-on limiter l'infection par les coronavirus ?.....	9
II. Protéase majeure M^{pro} du Sars-Cov-2, une cible thérapeutique	9
II.1. Structure	9
II.2. Rôle viral	11
II.3. Mécanisme de clivage.....	11
II.4. Inhibition de la protéase M ^{pro}	12
III. Chloroquine et hydroxychloroquine	15
III.1. Histoire et identification.	15
III.2. Utilisation dans le traitement du Covid-19	16
IV. L'amarrage moléculaire	17
IV.1. Généralités.....	17
IV.2. Programmes utilisés	17
IV.3. Principe théorique.....	18
IV.4. Les outils d'amarrage moléculaire	19
IV.5. Algorithme Génétique (AG)	19
IV.6. Les fonctions de score	20
IV.7. Interaction intermoléculaires Récepteur–Inhibiteurs	21
IV.7.1. Les liaisons hydrogène	21
IV.7.2. Les interactions de Van Der Waals	21
IV.7.3. Les interactions hydrophobes	22
IV.7.4. Les interactions entre systèmes π	22
IV.7.5. Interaction halogène.....	22
IV.7.6. Les interactions π -sulfure.....	23
Références.....	24

Partie computationnelle

V. Matériels et méthodes	27
V.1. Programmes utilisés	27
V.2. Préparation des molécules à l'amarrage	27

V.2.1. Préparation du récepteur (protéase M ^{pro}) :	27
V.2.2. Préparation des ligands	28
V.3. Réalisation d'amarrage moléculaire.....	29
V.3.1. Calcul des grilles de potentiel (Calcul AutoGrid4) :	30
V.3.2. Recherche des solutions d'amarrage (Calcul AutoDock4)	30
VI. Résultats et discussions	32
VI.1. Evaluation de la fiabilité du programme d'amarrage.....	32
VI.1.1. RMSD et analyse visuelle	32
VI.1.2. Interaction ligand naturel-récepteur (N3-M ^{pro}).....	33
VI.2. Amarrage des dérivés de la chloroquine	35
VI.2.1. Alignements des dérivés	35
VI.2.2. Etude de l'interaction de la chloroquine et hydroxychloroquine avec le récepteur M ^{pro}	39
VI.2.3. Etude de l'interaction de dérivé CQ-Br avec le récepteur M ^{pro}	41
VI.2.4. Etude de l'interaction de dérivé CQ-NH ₂ avec le récepteur M ^{pro}	41
VI.2.5. Etude de l'interaction de dérivé CQ-CH ₃ avec le récepteur M ^{pro}	43
Références	44
Conclusion générale	45
Annexe	47



Introduction générale

Introduction générale

La maladie à coronavirus 2019 (covid-19) est une maladie provoquée par un virus de la famille des Coronaviridae, le Sars-CoV-2. Cette maladie infectieuse est une zoonose, dont l'origine est encore débattue, qui a émergé en décembre 2019 dans la ville de Wuhan, dans la province du Hubei en Chine. Elle s'est rapidement propagée, d'abord dans toute la Chine, puis dans tout le monde, provoquant une épidémie mondiale [1,2].

La protéase majeure du Sars-CoV-2 (M^{pro}) est une enzyme essentielle au cycle de vie du virus. Pour comprendre le fonctionnement cette protéase virale M^{pro} , il faut d'abord connaître leur séquence d'acides aminés et leur structure tridimensionnelle. Cela permet alors de caractériser précisément le site catalytique de l'enzyme, qui sera la cible des molécules à usage thérapeutique capables de le bloquer [3].

Plus récemment, des efforts ont été faits pour développer de nouveaux systèmes de criblage permettant d'identifier les inhibiteurs susceptibles de bloquer efficacement l'action de la protéase M^{pro} du Sars-CoV-2, et donc de stopper la prolifération du virus. Les molécules identifiées pourront aider à développer des médicaments efficaces pour contrôler la propagation du Sars-CoV-2 et limiter son impact sur la santé publique et l'économie mondiales [4].

La chloroquine (un ancien médicament antipaludique) a démontré à plusieurs reprises sa capacité à réduire la réplication de diverses souches de coronavirus par le passé, y compris celles responsables de l'épidémie du syndrome respiratoire aigu sévère (Sars) des années 2002 et 2003 [5-7]. Des études récentes réalisées sur les souches de coronavirus, responsables du covid-19, viennent appuyer l'intérêt antiviral potentiel de la chloroquine et de l'hydroxychloroquine [8,9]. D'autre part, les résultats d'un essai *in-vitro* ont révélé un effet synergique de l'association de l'hydroxychloroquine et de l'azithromycine sur la réduction de la réplication du virus Sars-CoV-2 et ce, à des concentrations compatibles avec celles pouvant être obtenues au niveau pulmonaire chez l'humain [10].

Comme il n'y a pas encore de traitement capable d'éradiquer le virus, ni des doses suffisantes de vaccin contre le covid-19, le ministère algérien de la santé a déclaré que les

hôpitaux du pays peuvent utiliser un protocole thérapeutique à base d'hydroxychloroquine pour traiter les patients infectés par le covid-19.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à comprendre les mécanismes d'action de la chloroquine (CQ) et hydroxychloroquine (CQ-OH) contre la protéase virale M^{pro} , en faisant appel aux approches *in-silico* de modélisation des interactions « enzyme-inhibiteur » par l'amarrage moléculaire. Nous avons également tenté de développer de nouveaux inhibiteurs à base de chloroquine, contenant des groupes fonctionnels substitués : bromure (CQ-Br), amino (CQ-NH₂) et méthyle (CQ-CH₃). Ces groupes fonctionnels ont été choisis en raison de leurs interactions potentielles avec les acides aminés du site catalytique de l'enzyme.

Notre travail est divisé en deux grandes parties :

La partie bibliographique qui comprend des notions générales sur le covid-19, la protéase majeure du coronavirus et le traitement potentiel aux chloroquines. Nous avons également présenté les méthodes théoriques permettant l'étude d'amarrage moléculaire et les interactions intermoléculaires inhibiteur-protéine.

Partie computationnelle est dédiée à la description de la méthodologie du docking utilisée ainsi que les résultats et discussions.

Références

- [1] Lai, Chih-Cheng, et al. "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges." *International journal of antimicrobial agents* 55.3 (2020): 105924.
- [2] Wang, L. S., et al. "A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence." *Inter J Antimicrob Agents.* (2020).
- [3] Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, et al. Coronavirus main proteinase (3CL^{pro}) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 2003 ; 300 : 1763–1767 (Paris) 2020, 36: 633–41.
- [4] Zhang L, Lin D, Sun X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. *Science* 2020; 368 : 409–12
- [5] De Wilde, Adriaan H., et al. "Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58.8 (2014): 4875-4884.
- [6] Yan, Yiwu, et al. "Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an animal model." *Cell research* 23.2 (2013): 300-302.
- [7] Barnard, Dale L., et al. "Evaluation of immunomodulators, interferons and known in vitro SARS-coV inhibitors for inhibition of SARS-coV replication in BALB/c mice." *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 17.5 (2006): 275-284.
- [8] Wang, Manli, et al. "Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro." *Cell research* 30.3 (2020): 269-271.
- [9] Yao, Xueting, et al. "In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)." *Clinical infectious diseases* 71.15 (2020): 732-739.
- [10] Andreani, Julien, et al. "In vitro testing of combined hydroxychloroquine and azithromycin on SARS-CoV-2 shows synergistic effect." *Microbial pathogenesis* 145 (2020): 104228.



Partie bibliographique



I. Coronavirus humain, Sars-Cov-2 (Covid-19)

I.1. Définition

Les coronavirus ont été signalés comme causes d'infections respiratoires légères et modérées depuis plus de 50 ans ils peuvent infecter aussi bien l'homme que l'animal [1]. Les coronavirus appartiennent à une grande famille de virus qui causent un large éventail de maladies principalement liées au système respiratoire et l'infection peut varier du rhume aux maladies respiratoires plus graves [2].

Ces virus sont d'origine animale (Chauves-souris, chameau...) et se propagent aux humains. Il est possible d'attraper le Sars-Cov-2 lorsque le virus pénètre dans le système respiratoire par la bouche et le nez (figure 1), et une situation plus probable lorsque les personnes sont en contact direct avec une personne infecté, car cette personne porteuse du virus laisser des gouttelettes infectieuses lorsqu'elles éternuent toussent ou touchent des objets ou des surfaces [3].



Figure 1 : Le Sars-CoV-2, coronavirus responsable de la maladie covid-19, n'épargne personne.

Le covid-19 a été identifiée pour la première fois lors d'une enquête sur une épidémie à Wuhan, en Chine, et s'est rapidement propagé à travers le monde pour devenir la première pandémie causée par un coronavirus [3].

En janvier 2020, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré que l'écllosion d'une nouvelle maladie à coronavirus, covid-19, constituait une urgence de santé publique de portée internationale. L'OMS a indiqué qu'il existe un risque élevé de propagation de la maladie covid-19 dans d'autres pays du monde. En mars 2020, l'OMS a déclaré que le covid-19 pouvait être qualifiée de pandémie [4].

Le 11 mars 2020, une pandémie officielle a été déclarée. La situation est encore aggravée en raison de l'absence de médicaments ou de vaccins spécifiques autorisés ou approuvés par la FDA (Food and Drug Administration : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) pour le traitement du covid-19 [4].

I.2. Chronologie de l'épidémie

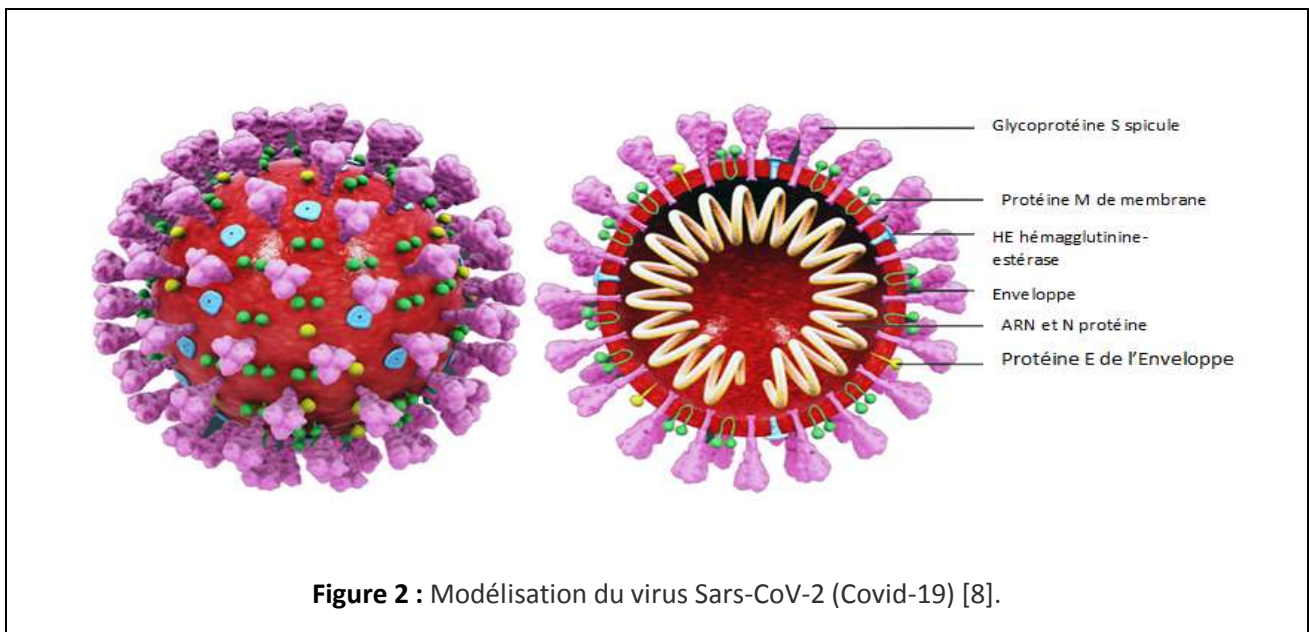
Le coronavirus est une immense famille de virus longtemps bénins jusqu'en 2002 et l'apparition du Sars-CoV-1, un nouveau coronavirus entraînant un syndrome respiratoire aigu sévère (Sars). Le Sars est donc une maladie infectieuse et contagieuse causée par un virus appartenant à la famille des coronavirus, le Sars-CoV-1. Ce virus apparut pour la première fois en Chine en novembre 2002, qui a provoqué une épidémie à partir de mai 2003 dans 29 pays, infecté plus de 8 000 personnes et fait au moins 774 morts [5].

En 2012, un deuxième coronavirus apparut en Arabie Saoudite, Mers-CoV (l'épidémie de coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient). Contrairement au Sars-CoV, la transmission du Mers-CoV se poursuit aujourd'hui, même si elle est de faible ampleur [6].

En décembre 2019 dans la ville de Wuhan (Chine), une nouvelle souche de coronavirus, cousin du Sars-CoV, est apparue chez l'humain sous le nom Sars-CoV-2 (Sévère acute respiratoire syndrome coronavirus). L'émergence rapide du Sars-CoV-2 et sa diffusion pandémique montrent que ce virus est bien plus contagieux que les Sars-CoV-1 et que le Mers-CoV [7]. Contrairement au Sars-CoV-1 et au Mers-CoV, le virus est abondamment excrété par voie respiratoire par des sujets asymptomatiques ce qui favorise grandement sa diffusion [7].

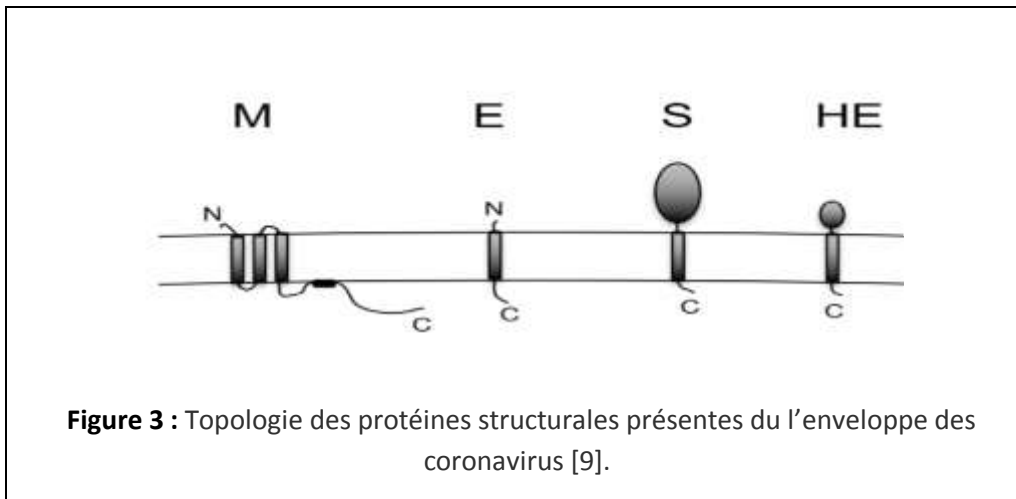
I.3. Structure du coronavirus

Les coronavirus sont des particules virales enveloppées (voir la figure 2). Le génome des coronavirus est une molécule d'ARN simple brin de sens positif (+ ARN). La taille du génome varie entre 27 et 32 kpb, l'un des plus grands virus à ARN connus. Le génome du Sars-CoV-2 comprend environ 30 000 nucléotides organisés en gènes spécifiques codants pour des protéines structurales et des protéines non structurales [8].



Les protéines structurales comprennent les protéines (voir la figure 3) :

- La glycoprotéine de surface (S), responsable de la reconnaissance des récepteurs des Cellules hôtes.
- Les protéines membranaires (M), responsables de la mise en forme des virions.
- Les protéines d'enveloppe (E), responsables de l'assemblage et de la libération des virions.
- Les protéines de la nucléocapside (N) sont impliquées dans l'empaquetage du génome de l'ARN [9].



I.4. Mécanisme d'action et de réplication virale

Le Sars-CoV-2 infecte principalement les cellules épithéliales bronchiques ciliées et les pneumocytes de type II, où il se lie au récepteur de surface, l'ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme-2 : enzyme de conversion de l'angiotensine 2 :), par l'intermédiaire de la glycoprotéine **S** située à sa surface. Lorsque la glycoprotéine **S** se lie à l'ACE2, le clivage de la protéine trimère **S** est déclenché par la protéase transmembranaire sérine 2 (TMPRSS2) associée à la surface cellulaire et la cathepsine. La glycoprotéine **S** comprend deux sous-unités, S1 et S2. La sous-unité S1 détermine la gamme d'hôtes et le tropisme cellulaire et facilite l'attachement viral aux cellules cibles. La sous-unité S2 est une unité qui intervient dans la fusion des membranes virales et cellulaires, assurant l'entrée virale par endocytose. L'affinité entre les protéines de surface du virus et ses récepteurs est une étape cruciale pour l'entrée virale [10].

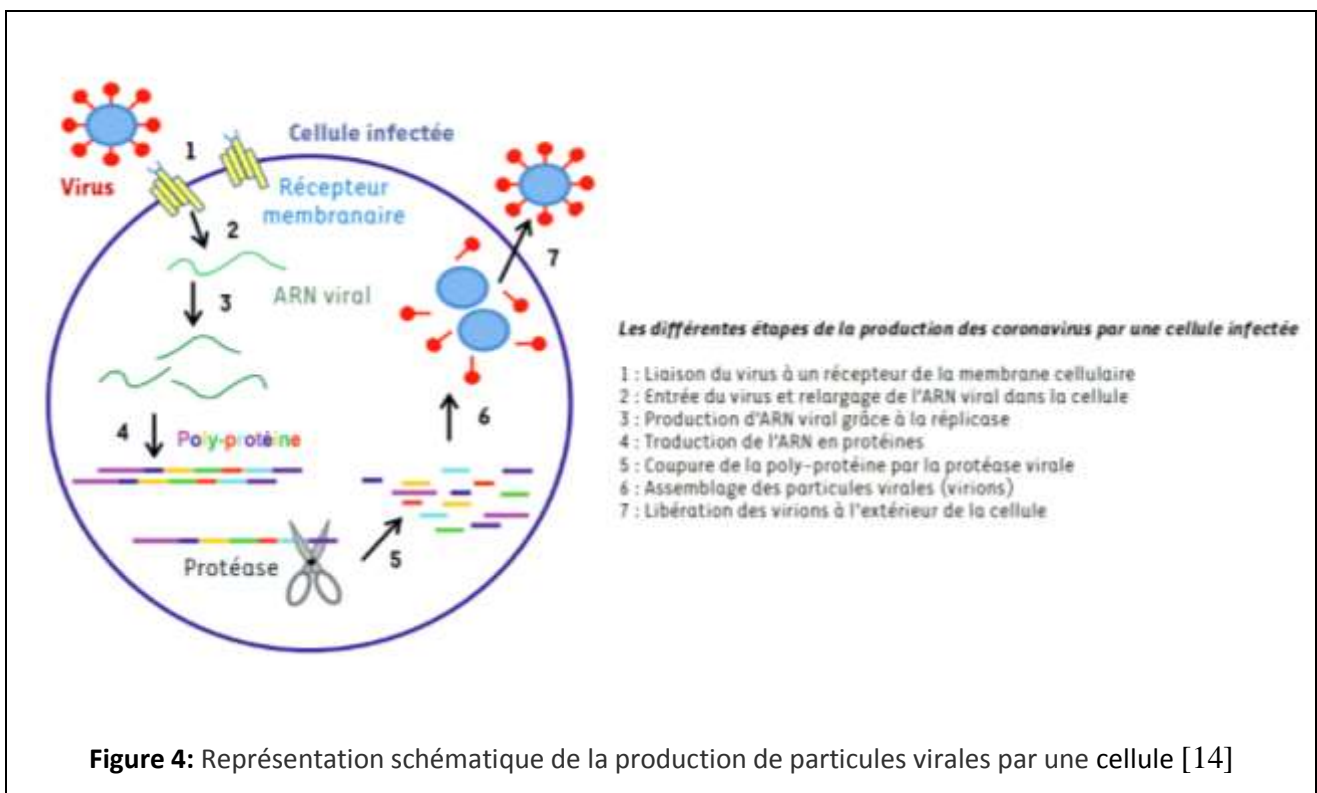
La fusion entre les membranes cellulaires et virales libère l'ARN viral dans le cytoplasme cellulaire où se met en place la réplication du virus [11].

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, le virus va détourner les processus cellulaires de production de protéines au profit de la synthèse de ses propres composants. La première protéine produite est une réplicase virale (ARN polymérase ARN-dépendante), une enzyme qui fabrique des nouvelles molécules d'ARN en prenant comme modèle le brin d'ARN viral [11]. Ces ARN nouvellement synthétisés sont ensuite traduits par les ribosomes et enzymes de la cellule infectée pour produire les protéines qui formeront les nouvelles particules virales (virions). Une longue poly-protéine unique est d'abord synthétisée. Elle sera ensuite coupée

par une protéase virale (M^{pro}) issue de cette poly-protéine par auto-clivage [12] en protéines de tailles plus petites, qui formeront notamment la capsid virale, c'est-à-dire la coque dans laquelle l'ARN viral sera empaqueté. C'est ainsi que se forment les nouveaux virus infectieux.

Plusieurs étapes sont donc nécessaires pour la formation de nouvelles particules virales : entrée du virus dans la cellule qu'il va infecter, copie de l'ARN viral, synthèse de la poly-protéine et sa découpe en protéines fonctionnelles de tailles plus petites, et enfin, reconstitution de nouvelles particules virales infectieuses et leur relargage à l'extérieur de la cellule infectée (voir la figure 4).

Il est à noter que la protéase primaire du Sars-CoV-2 joue un rôle important dans la réplication virale des gènes protéiques, car elle clive la poly-protéine en plusieurs sites bien déterminés (sites de clivage) pour créer de nouvelles particules virales. Cet enzyme est nommé : la protéase majeure du sars-cov-2 (M^{pro}) [13].



I.5. Comment peut-on limiter l'infection par les coronavirus ?

Plusieurs stratégies existent pour lutter contre les virus :

- On peut envisager de bloquer l'entrée du virus dans la cellule si on connaît le «récepteur» de la membrane plasmique sur lequel il se fixe, ce qui n'est pas toujours le cas. Parfois, cette stratégie s'avère impossible à mettre en œuvre car le récepteur en question est nécessaire à d'autres fonctions cellulaires vitales.
- On peut tenter d'empêcher la formation d'ARN viral.
- On peut aussi envisager de bloquer la protéase M^{pro} du virus pour l'empêcher de couper la poly-protéine virale synthétisée par la cellule infectée. Les particules virales ne pourront ainsi pas s'assembler dans la cellule, ce qui stoppera l'infection. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour traiter plusieurs infections virales dans des maladies comme le Sida ou l'hépatite C, bien que cela ne permette pas d'éliminer complètement le virus de l'organisme hôte [14].

II. Protéase majeure M^{pro} du Sars-Cov-2, une cible thérapeutique

La protéase principale du coronavirus 2 (nommée en anglais : Sars-CoV-2 M^{pro} ou 3C-like protéase / $3CL^{pro}$) de syndrome respiratoire aigu sévère est une enzyme impliquée dans la transcription et la réplication du coronavirus. Elle est donc essentielle au cycle de vie du virus, et est hautement conservée dans la famille des bêta-coronavirus.

La protéase virale M^{pro} est essentielle à la production de virions par la cellule infectée car elle participe à une étape de maturation en coupant les poly-protéines virales synthétisées à des sites bien précis [15].

II.1. Structure

La structure cristalline de la protéase majeure du Sars-CoV-2 ($M^{pro}/3CL^{pro}$) vient d'être publiée [16]. Sa séquence protéique est identique à 96% à celle des protéases $3CL^{pro}$ des autres coronavirus, qui ont été très étudiées [17,18].

La protéase majeure du covid-19 M^{pro} est formée d'une chaîne protéique de 306 acides aminés, où sa structure secondaire révèle une architecture de trois domaines principaux (voir la figure 5) : Le domaine I est formé d'une séquence d'acides aminés 8 à 101 et le domaine II est de 102 à 184, tandis que le troisième domaine est composé des résidus 201 à 306.

Cette protéase virale contient un site actif dans une fente entre les domaines I et II (figure 5). Elle possède une dyade catalytique cystéine-histidine (Cys145-His41) sur son site actif, qui peut cliver une liaison peptidique Gln-(Ser/Ala/Gly) [19]. Le soufre de la cystéine 145 joue le rôle d'un nucléophile, tandis que le cycle imidazole de l'histidine 41 agit comme une base.

A proximité du domaine dyade (Cys145-His41), où le substrat se lie, la poche de liaison est divisée en quatre sous-sites différents : **S1'**, **S1**, **S2** et **S4** (figure 5). Le sous-site **S1** est composé des acides aminés : Phe140, Leu141, Asn142, His163, Glu166 et His172. Une petite partie **S1'**, séparée du sous-site **S1** par le résidu Asn142, est composée des résidus : Thr25, Thr26 et Leu27. Le sous-site hydrophobe **S2** contient les résidus : His41, Met49, Tyr54, Met165 et Asp187. Le dernier sous-site **S4** implique les acides aminés : Met165, Leu167, Phe185, Gln189 et Gln192 [19].

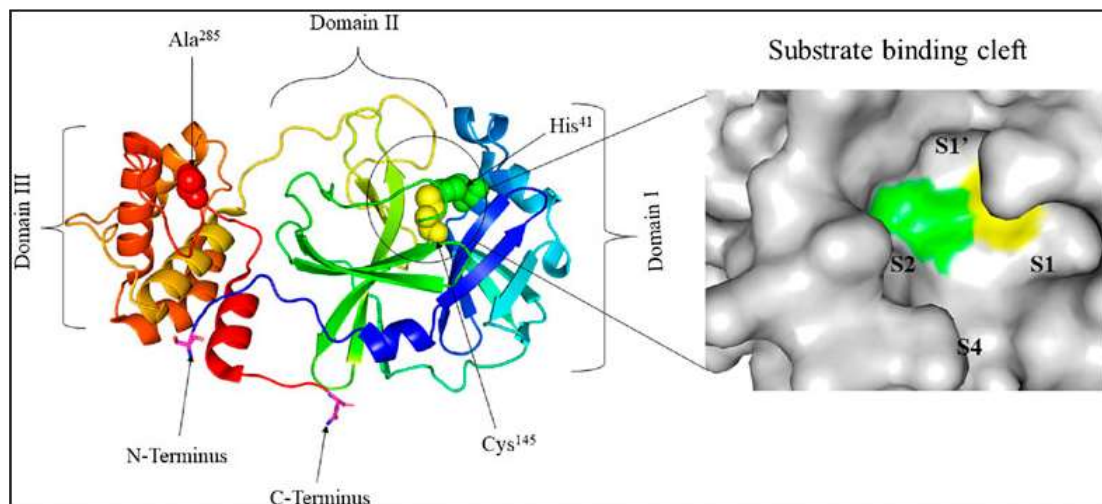
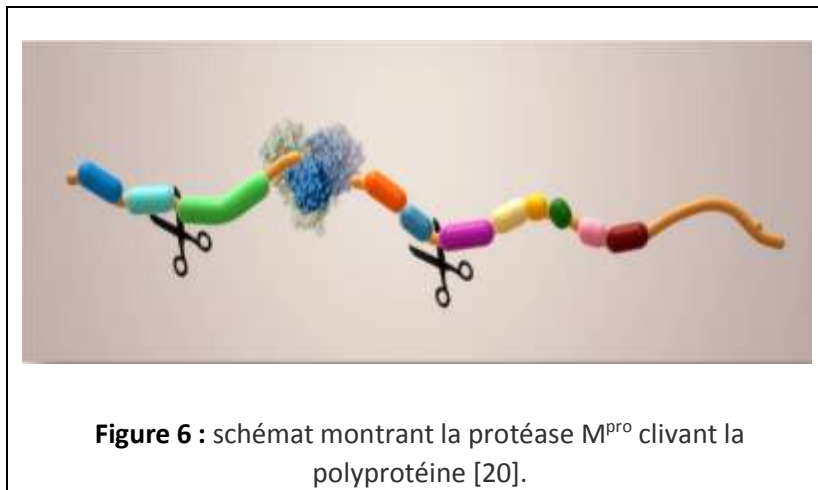


Figure 5 : structure 3D de la protéase majeure du sars-cov-2 ($M^{pro}/3Cl^{pro}$) et l'identification du site actif [19]

II.2. Rôle viral

La protéase majeure du Sars-CoV-2 est spécifique d'un coronavirus et agit sur les protéines virales, ainsi que sur quelques protéines de la cellule hôte, pour favoriser la réplication virale [20]. Elle contribue au traitement de plusieurs protéines dérivées de la traduction de l'ARN viral et est ainsi responsable de la libération de la plupart des protéines virales fonctionnelles (figure 6) [20]. C'est pour cela qu'elle suscite un grand intérêt pour stopper la propagation des épidémies virales.

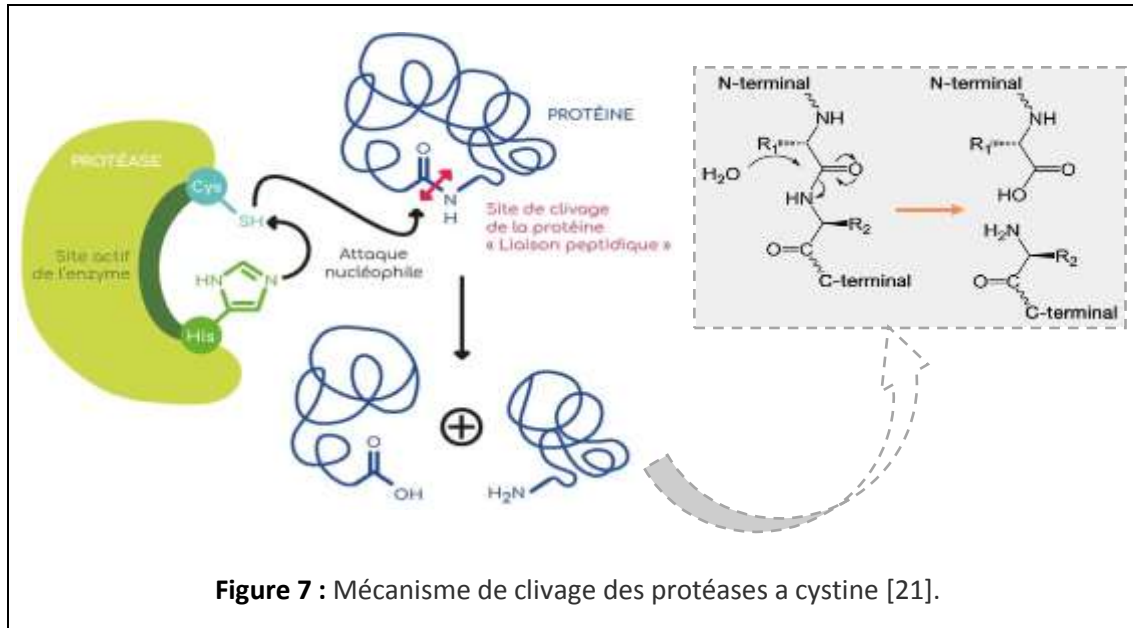


II.3. Mécanisme de clivage

La protéase principale M^{pro} se clive la poly-protéine virale 11 fois au niveau de motifs Leu-Gln-(Ser/Ala/Gly) [15]. Ce processus consiste à lier le substrat au centre actif de l'enzyme pour former un complexe « Protéase—Substrat ».

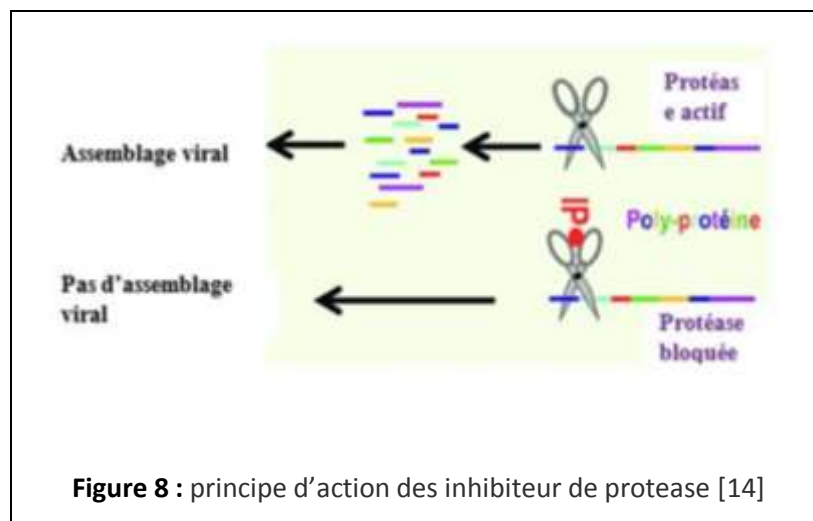
La protéase majeure M^{pro}, agissant comme les protéases à cystéine, suit un mécanisme en 2 étapes (voir la figure 7) :

- La première étape du mécanisme réactionnel catalysé par la protéase est la déprotonation du groupement thiol, porté par le résidu cystéine (Cys145) du site actif, par la chaîne latérale basique d'un acide aminé voisin (His41).
- L'étape suivante est l'attaque nucléophile de l'atome de carbone constituant le carbonyle du substrat par l'anion sulfure de la Cys145 déprotonée. Cette liaison thioester est ensuite hydrolysée, ce qui libère à la fois le fragment C-terminal du substrat et l'enzyme régénérée dans sa forme active [21].



II.4. Inhibition de la protéase M^{pro}

Les inhibiteurs de protéase (IP) sont des molécules capables de se lier au site actif de la protéase M^{pro}, conduisant à la formation de particules virales immatures (non infectieuses) et empêchent donc l'enzyme de couper les poly-protéines virales fabriquées par la cellule infectée [22]. Le principe d'action des molécules bloquant les protéases est schématisé dans la figure 8.

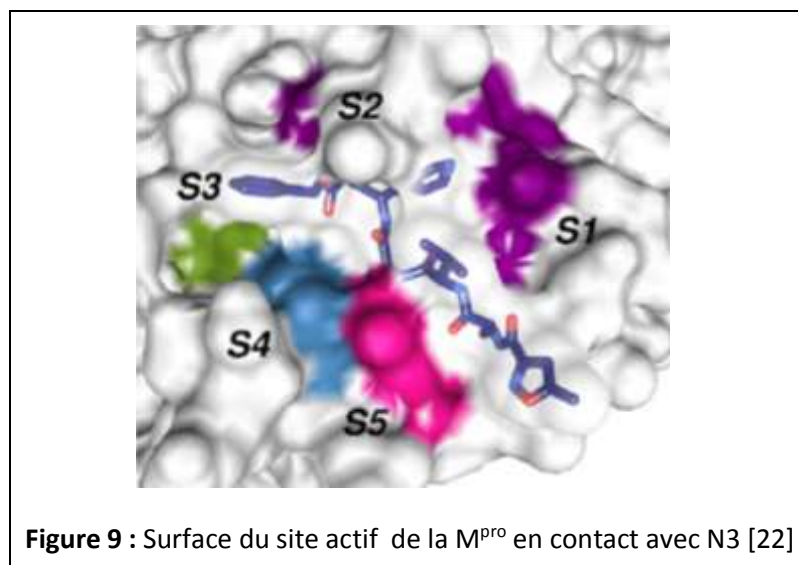


Des inhibiteurs de la protéase M^{pro} des coronavirus déjà connus ont été testés pour leur capacité à inhiber celle du Sars-CoV-2. Dans un effort pour découvrir des inhibiteurs plus

puissants, Jin et ses collaborateurs [23] ont utilisé plusieurs médicaments cliniquement connus pour cibler la protéase M^{pro} , sur la base du mécanisme d'inhibition de la molécule **N3** [23]. Nous citons quelques exemples de molécules dans la figure 10. **N3** est un inhibiteur peptidomimétique, conçu à l'origine pour traiter les maladies infectieuses causées par d'autres coronavirus [24]. Il utilise le groupe de vinyle pour inhiber le processus catalytique par une liaison covalente à la cystine de la dyade catalytique (Cys145-His41). De plus, un cycle lactame, un groupe iso-butyle aliphatique et un groupe méthyle, forment des contacts avec les résidus latéraux qui correspondent respectivement aux sous-sites **S1**, **S2** et **S4** (voir figure 9).

Comme le présente la figure 11, le mécanisme d'inhibition montre également une liaison covalente formée entre l'atome Soufre de Cys145 et le Carbone du groupe vinyle du **N3**. D'autres liaisons hydrogène se forment entre **N3** et les résidus dans la poche de liaison, adaptant l'inhibiteur à l'intérieur.

Les substituants d'inhibiteur **N3** couvrent presque tous les sous-sites du domaine actif, par rapport aux autres candidats, donc son mécanisme de reconnaissance devrait représenter un modèle canonique pour les autres inhibiteurs- M^{pro} . Sur la base de ce mécanisme, plus de 10 000 médicaments candidats en essais cliniques et d'autres composés pharmacologiquement actifs ont été criblés. Plusieurs inhibiteurs puissants du SRAS-CoV-2 ont été découverts, tels que le Disulfiram, Carmofur, Ebselen, Shikonin, Tideglusib, PX-12 et le TDZD-8 [23].



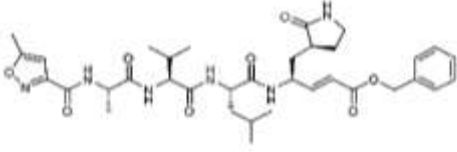
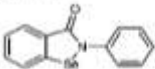
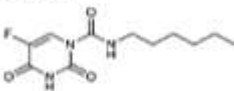
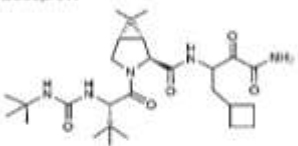
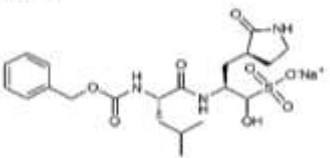
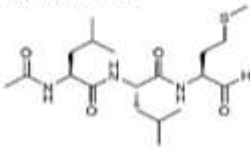
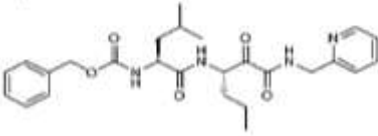
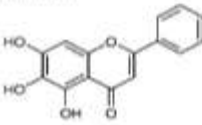
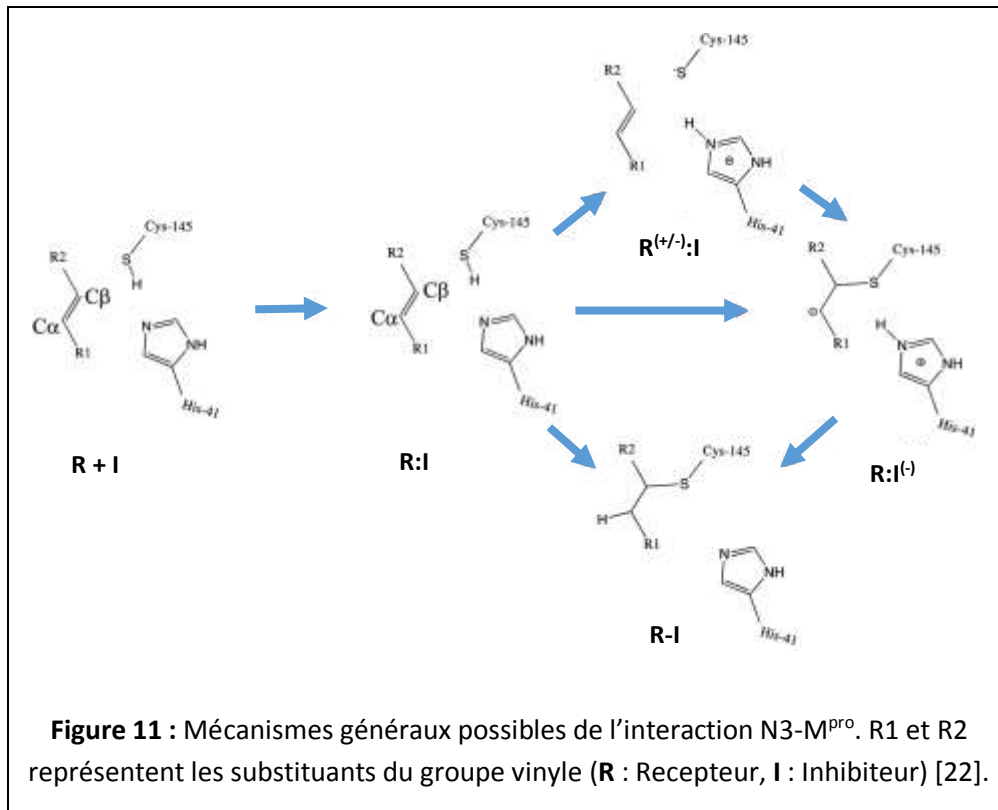
Compounds	SARS-CoV-2 M^{50} inhibition (μM)	SARS-CoV-2 antiviral activity (μM)
<p>N3</p> 	$k_{\text{obs}}/[\text{I}] = 11,300 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\text{EC}_{50} = 16.77$
<p>Ebselen</p> 	$\text{IC}_{50} = 0.67$	$\text{EC}_{50} = 4.67$
<p>Carmofur</p> 	$\text{IC}_{50} = 1.82$	$\text{EC}_{50} = 24.87$
<p>Boceprevir</p> 	$\text{IC}_{50} = 4.13$	$\text{EC}_{50} = 1.9$
<p>GC-376</p> 	$\text{IC}_{50} = 0.03$	$\text{EC}_{50} = 2.07$
<p>Calpain inhibitor II</p> 	$\text{IC}_{50} = 0.97$	$\text{EC}_{50} = 0.49$
<p>Calpain inhibitor XII</p> 	$\text{IC}_{50} = 0.45$	$\text{EC}_{50} = 3.37$
<p>Baicalein</p> 	$\text{IC}_{50} = 0.94$	$\text{EC}_{50} = 1.69$

Figure 10 : Activité antivirale de molécules nouvellement découvertes contre le Sars-CoV-2 [23].

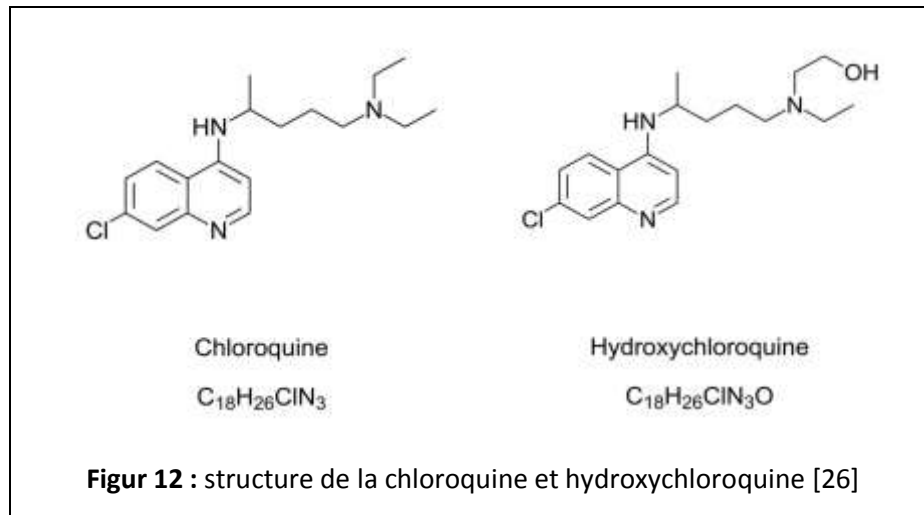


III. Chloroquine et hydroxychloroquine

III.1. Histoire et identification.

La chloroquine et l'hydroxychloroquine (voir la figure 12) font partie des 4-aminoquinoléines, largement utilisées comme antipaludiques de synthèse, ces deux molécules trouvent également leur place en rhumatologie, notamment dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et du lupus érythémateux disséminé [25].

Chloroquine et hydroxychloroquine : En plus de leurs effets antipaludiques et immunomodulateurs, ils inhibent la réplication de plusieurs virus *in vitro* dont le Sars-CoV-2. Bien que leurs mécanismes d'action ne soient pas encore entièrement compris, il a été démontré que ces molécules s'accumulent dans les endosomes et les lysosomes et augmentent le pH de ces organites, altérant ainsi leur fonction principale dans l'endocytose cellulaire des coronavirus [26].



III.2. Utilisation dans le traitement du Covid-19

Il n'existe pour le moment aucun traitement capable d'éradiquer le virus, ni de doses suffisantes de vaccin contre le covid-19 [27]. Le traitement du covid-19 repose initialement sur la prévention de la contamination. Cependant, la plupart des symptômes de la maladie sont traitables et une prise en charge médicale rapide peut atténuer les risques. Plusieurs essais cliniques sont en cours de réalisation afin d'évaluer de potentiels traitements thérapeutiques pour le covid-19. Dans environ 80 % des cas, les patients guérissent spontanément, sans avoir besoin de traitement particulier. Les cas les plus graves sont pris en charge dans des unités de soins intensifs à l'hôpital où ils font l'objet d'une surveillance étroite.

Après de nombreuses études confirmant sa capacité de réduction de l'exacerbation de la pneumonie, la durée des symptômes et le retard de la clairance virale, le tout en l'absence d'effets secondaires sévères, la chloroquine est un traitement efficace pour la prévention et le traitement de la pneumonie à covid-19. L'hydroxychloroquine a probablement la même action sur les virus que celle de la chloroquine puisque le mécanisme d'action de ces deux molécules est identique, et l'hydroxychloroquine peut être prescrite pendant de longues périodes, ce qui serait donc le premier choix dans le traitement du covid-19 [8].

Actuellement, l'Algérie poursuivra l'utilisation du protocole thérapeutique à base d'hydroxychloroquine contre le nouveau coronavirus (covid-19), lequel a contribué efficacement à la guérison de personnes atteintes de ce virus en Algérie, sans qu'aucun effet secondaire n'ait été décelé jusqu'à présent chez ces derniers, Selon la déclaration de M. Bekkat Berkani, membre du Comité scientifique de suivi.

IV. L'amarrage moléculaire

IV.1. Généralités

Dans le domaine de la modélisation moléculaire, l'amarrage moléculaire (connu aussi sous le nom docking moléculaire) est devenu un outil important dans la compréhension des réactions biologiques. La conception de médicaments est un processus de simulation qui prédit la conformation (position et orientation relatives) la plus favorable de deux molécules en interaction et formant un complexe récepteur-ligand stable. Le récepteur macromoléculaire étant généralement une protéine et le ligand est soit une petite molécule soit une autre protéine [28,29]. La connaissance de cette conformation préférentielle permet par la suite l'estimation de la force d'association (affinité de liaison) entre ces deux molécules. Cependant, chaque programme de d'amarrage diffère par rapport aux autres par son algorithme d'échantillonnage, sa manière de manipuler la flexibilité du ligand et de la protéine ainsi que sa fonction d'évaluation des complexes.

Il existe deux grands types de d'amarrage moléculaire. L'amarrage 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 [30]. Actuellement cette approche est utilisée dans le d'amarrage protéine-protéine. L'approche la plus récente dans le traitement de la flexibilité, considère la cible protéique comme corps rigide tandis que le ligand est flexible. En effet elle représente l'approche la plus utilisée dans la plupart des logiciels ou programmes d'amarrage moléculaire. Néanmoins, celle-ci reste approximative, du fait que le récepteur ne doit pas être considéré comme corps rigide (au moins la flexibilité du site d'interaction doit être prise en compte).

IV.2. Programmes utilisés

De nombreux logiciels de d'amarrage moléculaire sont actuellement disponibles et la plupart sont conçus pour le criblage virtuel. Les cinq les plus fréquemment cités pèsent 80% du total de citations trouvées dans la littérature (figure 13) : AutoDock, GOLD, Glide, Surflex-Dock et FlexX [31]. Il est intéressant de remarquer que les deux logiciels les plus cités, AutoDock et GOLD, reposent sur une fonction objective basée sur un champ de force

combiné avec un algorithme évolutionnaire (génétique). Dans notre étude, nous choisirons un programme d'amarrage moléculaire, AutoDock4.2, qui utilise un algorithme génétique (GA).

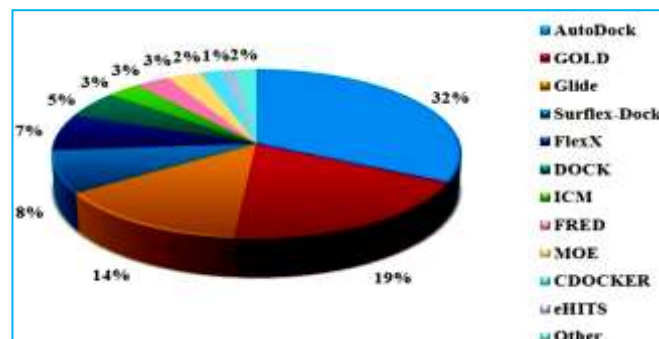
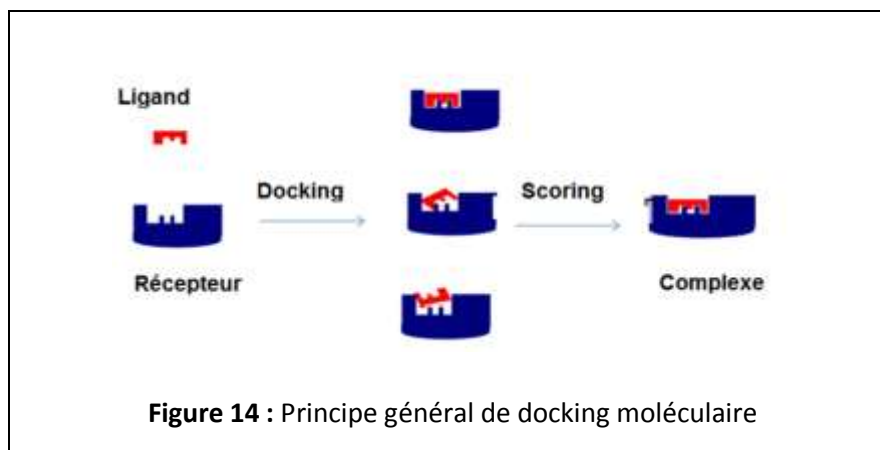


Figure 13 : Utilisation des différents logiciels d'amarrage moléculaire en 2010-2011 (fréquence de citation des noms des logiciels dans les titres et les résumés dans PubMed) [31].

IV.3. Principe théorique

L'amarrage moléculaire est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interactions entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire (cible d'amarrage) dont la structure tridimensionnelle est connue et d'une petite molécule (ligand). Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine [32]. Une simulation d'amarrage moléculaire comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (figure 14).

- ✓ Le docking est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- ✓ Le scoring est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées [32,33].



IV.4. Les outils d'amarrage moléculaire

Récepteur (protéase) : Cette étape préliminaire du docking moléculaire est consistée au téléchargement des structures chimiques (Enzyme dans notre cas). La plupart des structures sont disponibles via la « Protéine Data Bank » (<http://www.pdb.org>) et téléchargés sous forme PDB. Protéine Data Bank ou PDB est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéase essentiellement et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées Par cristallographie aux rayons X [34].

Ligand : Les structures de nos ligands ont été téléchargées depuis PubChem et enregistrées au format SDF. Les fichiers ont été convertis du format SDF au format PDB à l'aide de Chem3D.

IV.5. Algorithme Génétique (AG)

Les algorithmes génétiques (AG) reprennent des mécanismes et la terminologie de la génétique naturelle et de l'évolution biologique. L'organisation d'un ligand en complexe avec un récepteur peut être définie par un jeu de paramètres décrivant la position, l'orientation et la conformation du ligand par rapport au récepteur. Ces paramètres sont les « variables d'état » et dans un AG, chaque variable d'état correspond à un gène. La valeur de ces variables correspond au génotype et les coordonnées atomiques associées correspondent au phénotype. Chaque état défini du ligand correspond à un individu [35].

Pour l'implémentation de l'AG dans AutoDock, le chromosome est composé d'une chaîne de valeur-gènes réelle qui décrit :

- L'emplacement ligand (trois coordonnées).
- L'orientation : trois coordonnées pour définir l'axe principal de la rotation, et une valeur pour l'angle de rotation du ligand autour de l'axe principal. Ces 4 coordonnées constituent le « quaternion » d'orientation.
- La conformation (une valeur pour chaque torsion).

IV.6. Les fonctions de score

Les méthodes de “scoring” sont utilisées pour estimer mathématiquement l'affinité de liaison entre un récepteur et chacune des poses générées pendant le Docking. Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. L'association non covalente et réversible d'un récepteur (R) et d'un ligand (L) pour former un complexe récepteur-ligand (RL), dans un milieu aqueux contenant des électrolytes peut être décrite par l'équation (1) [36].



À l'équilibre, cette réaction est déterminée par l'énergie libre de liaison ΔG . Cette quantité est liée (équation 2) aux constantes d'association (inhibition) K_i , qui peuvent être déterminées expérimentalement (Équation3) [36].

$$\Delta G = -RT \ln K_i \dots\dots\dots (2)$$

$$K_i = \frac{[\mathbf{RL}]}{[\mathbf{R}][\mathbf{L}]} \dots\dots\dots (3)$$

Le principe thermodynamique est le suivant : $\Delta G = \Delta G^{\text{Complexe}} - (\Delta G^{\text{Ligand}} + \Delta G^{\text{protéine}})$

L'association entre protéines et ligands est gouvernée par plusieurs paramètres thermodynamiques : [37]

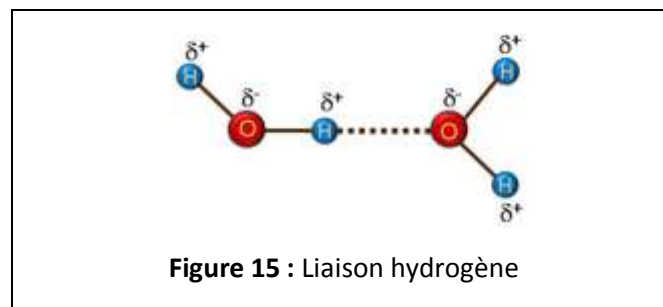
- Les liaisons hydrogène.
- Les interactions de Van Der Waals.
- Les interactions hydrophobes.
- Les interactions entre systèmes π .

IV.7. Interaction intermoléculaires Récepteur–Inhibiteurs

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Cette association est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles.

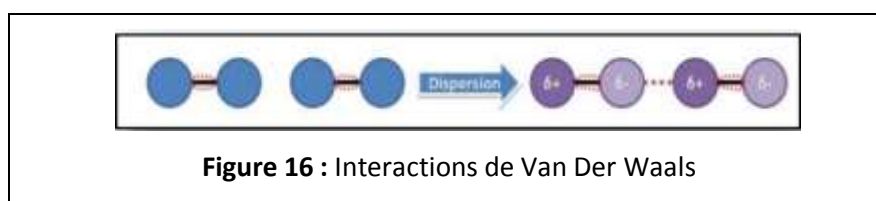
IV.7.1. Les liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène sont des interactions d'origine électrostatique de type dipôle-dipôle entre un atome électronégatif dit "accepteur" (porteur d'une charge partielle δ^-) et un atome d'hydrogène polaire (porteur d'une charge partielle δ^+) qui est lié de manière covalente à un atome électronégatif dit "donneur" (porteur d'une charge partielle δ^-). Une distance faible entre le donneur et l'accepteur est nécessaire pour qu'une liaison hydrogène soit significative (0,8 à 2,8 Å), et son énergie est maximale (de l'ordre de 5 kcal.mol) [38].



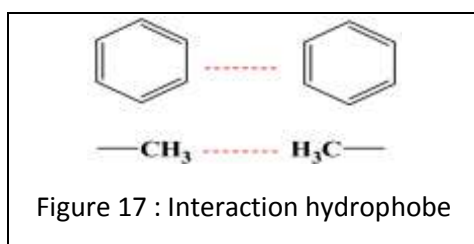
IV.7.2. Les interactions de Van Der Waals

Ce sont des interactions entre atomes, molécules, ou entre une molécule et un cristal. Ces interactions Van Der Waals s'appliquent à très courte distance et ne concernent donc que les atomes de surface. Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice. Les interactions de VDW sont de faible intensité (ordre de grandeur du kcal.mol⁻¹) de distance entre 3 à 4 Å.



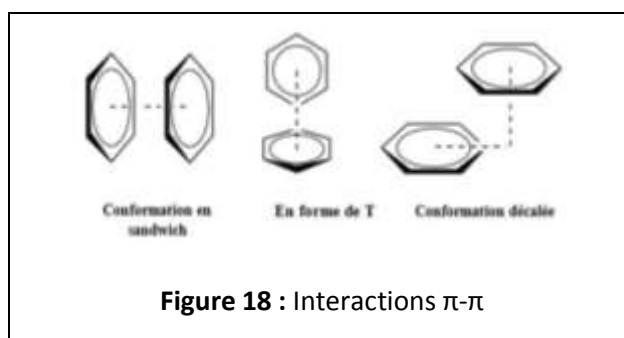
IV.7.3. Les interactions hydrophobes

Les interactions non liées π - π impliquent des systèmes π comme les cycles aromatiques. Ces derniers sont très souvent présents dans les ligands organiques et dans les macromolécules biologiques [39].



IV.7.4. Les interactions entre systèmes π

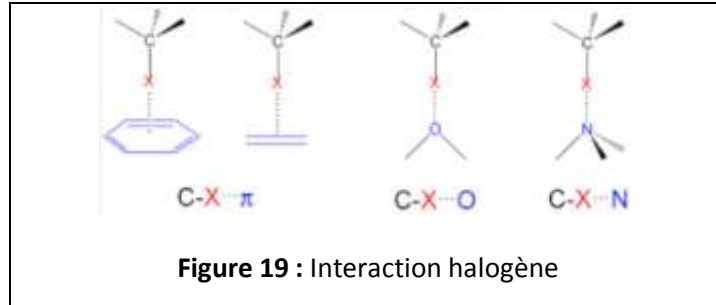
- L'interaction π - π face à face : les deux cycles aromatiques sont parallèles et leurs centres géométriques sont distants de moins de 4 Å environ. Deux sous-catégories peuvent être créées selon la présence (conformation décalée) ou non (conformation en sandwich) d'un décalage entre les deux cycles parallèles.
- L'interaction π - π en forme de T : les deux cycles aromatiques forment un angle droit et leurs centres géométriques (centroïde) sont distants de moins de 5,5 Å environ [40].



IV.7.5. Interaction halogène

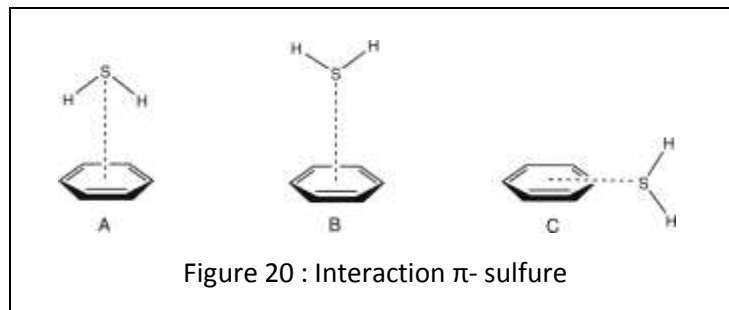
La liaison halogène est une liaison de nature proche de la liaison hydrogène. Elle s'établit entre les atomes d'halogènes électrodéficients (appauvris en densité électronique), facilement polarisables tels que l'iode (I) et le brome (Br), et les entités riches en densité

électronique comme les dérivés azotés et oxygénés (amines, éthers, amides, etc). La force de cette interaction augmente quand la distance entre l'halogène et l'accepteur diminue [41].



IV.7.6. Les interactions π -sulfure

Les interactions π -sulfure se produisent plus fréquemment dans les structures cristallines des protéines que ce qui serait attendu d'une association aléatoire de la structure. Les interactions π -sulfure sont répandues en biochimie et jouent un rôle important dans le repliement et la stabilisation des protéines [42].



Références

- [1] Bulut, Cemal, and Yasuyuki Kato. "Epidemiology of COVID-19." *Turkish journal of medical sciences* 50.SI-1 (2020): 563-570.
- [2] Vabret, A., et al. "Coronavirus humains (HCoV) Human coronaviruses." *Pathol. Biol* 57 (2009): 149-160.
- [3] Chhikara, Bhupender S., et al. "Corona virus SARS-CoV-2 disease COVID-19: Infection, prevention and clinical advances of the prospective chemical drug therapeutics." *Chemical Biology Letters* 7.1 (2020): 63-72.
- [4] Organisation Mondiale de la Santé. *Considérations liées à la santé mentale et au soutien psychosocial pendant la pandémie de Covid-19, 18 mars 2020*. No. WHO/2019-nCoV/MentalHealth/2020.1. Organisation mondiale de la Santé, 2020.
- [5] Tratner, I. (2003). SRAS : 1. Le virus. *M/S : médecine sciences*, 19(8-9), 885–891.
- [6] Bonnin, Ariane. Caractérisation de la protéine S du coronavirus humain 229E. Diss. Université du Droit et de la Santé-Lille II, 2018.
- [7] Sanche, Steven, et al. "High contagiousness and rapid spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2." *Emerging infectious diseases* 26.7 (2020).
- [8] Ait Addi, R., et al. "COVID-19 outbreak and perspective in Morocco. *Electron J Gen Med*. 2020; 17 (4): em204." (2020): 4.
- [9] Bonnin, Ariane. Caractérisation de la protéine S du coronavirus humain 229E. Diss. Université du Droit et de la Santé-Lille II, 2018.
- [10] L. Alanagreh, F. Alzoughool, et M. Atoum, « The human coronavirus disease COVID-19: its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms », *Pathogens*, vol. 9, no 5, p.331, 2020.
- [11] Le cycle viral de SARS-CoV-2, Par Matthew Borok. Institut Mondor de Recherche Biomédicale – Université Paris-Créteil, <https://arbre-des-connaissances-apsr.org/2020/05/29>
- [12] Juckel D, Dubuisson J, Belouzard S. Les coronavirus, ennemis incertains. *Med Sci (Paris)* 2020, 36 : 633–41.
- [13] Structure-cristalline-de-linhibiteur-de-la-protease-SARS-CoV-2-dans-le-compose-avec-une-herbe-chinoise-Shikonin By Dr. Liji Thomas, MD/Jun 18 2020.
- [14] Ladoux, Annie, Stéphane Azoulay, and Christian Dani. "Cibler la protéase majeure du SARS-CoV-2 pour fabriquer un médicament efficace contre ce coronavirus." *médecine/sciences* 36.6-7 (2020): 555-558 . Source. "Cibler la protéase majeure du SARS-CoV-2 pour fabriquer un médicament efficace contre ce coronavirus.
- [15] Cui, Wen, Kailin Yang, and Haitao Yang. "Recent progress in the drug development targeting SARS-CoV-2 main protease as treatment for COVID-19." *Frontiers in molecular biosciences* 7 (2020). doi: 10.3389/fmolb.2020.616341.
- [16] Zhang L, Lin D, Sun X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. *Science* 2020; 368 : 409–12.

- [17] Juckel, Dylan, Jean Dubuisson, and Sandrine Belouzard. "Les coronavirus, ennemis incertains." *médecine/sciences* 36.6-7 (2020): 633-641.
- [18] Organisation mondiale de la Santé. *Considérations liées à la santé mentale et au soutien psychosocial pendant la pandémie de Covid-19*, 18 mars 2020. No. WHO/2019-nCoV/MentalHealth/2020.1. Organisation mondiale de la Santé, 2020.
- [19] Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y et al (2020) Structure of M^{pro} from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors. *Nature* 582:286–293.
- [20] L. Alanagreh, F. Alzoughool, et M. Atoum, « The human coronavirus disease COVID-19: its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms », *Pathogens*, vol. 9, no 5, p.331, 2020.
- [21] Schaecher, S. R., A. Pekosz, and S. K. Lal. "Molecular biology of the SARS-coronavirus." (2010): 153-166.
- [22] Arafet, Kemel, et al. "Mechanism of inhibition of SARS-CoV-2 M pro by N3 peptidyl Michael acceptor explained by QM/MM simulations and design of new derivatives with tunable chemical reactivity." *Chemical Science* 12.4 (2021): 1433-1444.
- [23] Jin, Zhenming, et al. "Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors." *Nature* 582.7811 (2020): 289-293.
- [24] (a) Wang, Fenghua, et al. "Structure of main protease from human coronavirus NL63: insights for wide spectrum anti-coronavirus drug design." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-12, (b) Wang, Fenghua, et al. "Crystal structure of feline infectious peritonitis virus main protease in complex with synergetic dual inhibitors." *Journal of Virology* 90.4 (2016): 1910-1917.
- [25] Wrapp, Daniel, et al. "Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation." *Science* 367.6483 (2020): 1260-1263.
- [26] Al-Bari MAA. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1608-21.
- [27] Matusik, Élodie, Mériam Ayadi, and Nicolas Picard. "Covid-19, prise en charge, pistes thérapeutiques et vaccinales." *Actualites Pharmaceutiques* 59.599 (2020): 27-33
- [28] Brooijmans, Natasja, and Irwin D. Kuntz. "Molecular recognition and docking algorithms." *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 32.1 (2003): 335-373
- [29] Heberlé, G., and W. F de Azevedo. "Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations." *Current medicinal chemistry* 18.9 (2011): 1339-1352.
- [30] Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, 3(11), 935
- [31] Sousa, S. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2006). Protein–ligand docking: current status and future challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(1), 15-26.
- [32] Warren, G. L., Andrews, C. W., Capelli, A. M., Clarke, B., LaLonde, J., Lambert, M. H., ... & Tedesco, G. (2006). A critical assessment of docking programs and scoring functions. *Journal of medicinal chemistry*, 49(20), 5912-5931.

- [33] Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(4), 409-443.
- [34] Sekiou, Omar, et al. "In-silico identification of potent inhibitors of COVID-19 main protease (M^{pro}) and angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) from natural products: Quercetin, hispidulin, and cirsimaritin exhibited better potential inhibition than hydroxy-chloroquine against COVID-19 main protease active site and ACE2." *ChemRxiv*. Preprint. Retrieved from <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12181404> (2020): v1.
- [35] Fortuné, A. (2006). Techniques de Modélisation Moléculaire appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance (Doctoral dissertation, Université JosephFourier-Grenoble I)
- [36] DU TITRE, PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Diss. UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER, 2007
- [37] Bohacek, R.; McMartin, C.; Guida, W. The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. *Med. Res. Rev.*, 1996, 16 (1), 3-50.
- [38] Hajduk, Philip J., Warren RJD Galloway, and David R. Spring. "A question of library design." *Nature* 470.7332 (2011) : 42-43.
- [39] SALAHI DEHBIA. Mémoire de Master. Modélisation de la structure d'une protéine impliquée dans le cancer et de ses interactions avec quelques ligands. Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzo, (2014).
- [40] Borsi, V.; Calderone, V.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Sarti, N. Entropic contribution to the linking coefficient in fragment based drug design: A case study. *J. Med. Chem.*, 2010, 53 (10), 4285- 4289 .
- [41] Liaison halogène - Définition et Explications https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Liaison-halogene.html#ref_1
- [42] ASHLEY L. RINGER, ANASTASIA SENENKO, AND C. DAVID SHERRILL, Models of S/p interactions in protein structures: Comparison of the H₂S–benzene complex with PDB ,dataCenter for Computational Molecular Science and Technology, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia 30332-0400, USA School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia 30332-0400, USA College of Computing, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia 30332-0400, USA 200 .<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2204139>



Partie computationnelle

V. Matériels et méthodes

V.1. Programmes utilisés

Pour étudier les interactions Ligands-Protéase, nous choisisons le programme Autodock4.2 dans sa version la plus récente [1]. AutoDock est un ensemble de trois sous-programmes destinés pour prédire la conformation la plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur. Nous avons également utilisé l'interface graphique "ADT" (AutoDock Tools) version 1.5.4 pour visualiser la localisation précise de l'espace à l'intérieur duquel vont se faire les calculs [2]. Le logiciel Chem3D [3] a été utilisé pour dessiner et minimiser les énergies des molécules avant l'amarrage moléculaire. Les résultats des calculs ont été visualisés en format 2D et traités par le code de visualisation "Discovery Studio" [4].

V.2. Préparation des molécules à l'amarrage

Le fichier du récepteur utilisé par AutoDock doit être sous format mol2 ou pdb. En consultant la banque PDB, il est possible de télécharger le fichier du récepteur, la protéase M^{pro} dans notre cas, dans le format PDB. Parmi les complexes proposés par la PDB, nous avons choisi le code 6LU7 (M^{pro}-N3), car il s'agit d'une structure très récente (date de sortie : 5/2/2020) et correctement définie avec une résolution de 2.16 Å.

V.2.1. Préparation du récepteur (protéase M^{pro}) :

En consultant la banque PDB, avant son utilisation par AutoDock, le complexes protéase-ligand (M^{pro}-N3) est séparé de son ligand naturel N3 afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre. Le récepteur est ensuite préparé en définissant les charges partielles de ses atomes par l'intermédiaire du sous-programme Autodock Tools qui attribue des charges de type "Kollman" calculées avec le champ de forces empirique Amber [5]. Il est aussi nécessaire de rajouter à ce récepteur les hydrogènes dits polaires c'est à dire « essentiels ». Le fichier du récepteur ainsi préparé est converti par AutoDock au format pdbqt qui correspond aux données des charges.

V.2.2. Préparation des ligands

La préparation du fichier d'entrée du ligand naturel **N3** s'est faite de la même manière que nous l'avons fait avec son récepteur. Ce fichier est également converti par AutoDock au format pdbqt qui correspond aux nouvelles données des hydrogènes et des charges.

D'autre part, la structure initiale de la chloroquine, non disponible dans la base PDB, a été téléchargée à partir de la base de données PubChem [6] et visualisé à l'aide du programme Chem3D (voir la figure 21).

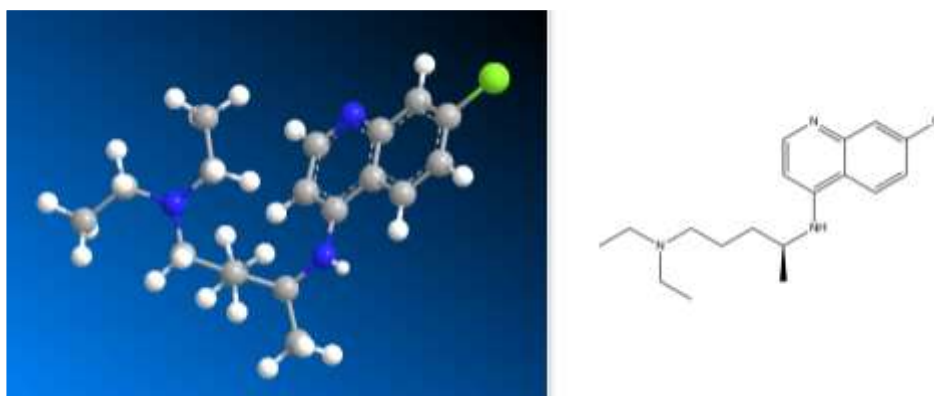


Figure 21: Visualisation de la molécule de la chloroquine (CQ) par le programme Chem3D.

	Composés	R
	CQ	H
	CQ-OH	OH
	CQ-Br	Br
	CQ-NH ₂	NH ₂
	CQ-CH ₃	CH ₃

Tableau 1 : Les dérivées de chloroquine.

Toutes les géométries initiales des dérivées utilisées dans ce travail (voir le tableau 1) sont conçues à partir de la structure de CQ et optimisées avec la méthode de MM pour minimiser leurs énergies et enfin enregistrées au format pdb. La phase finale de préparation de

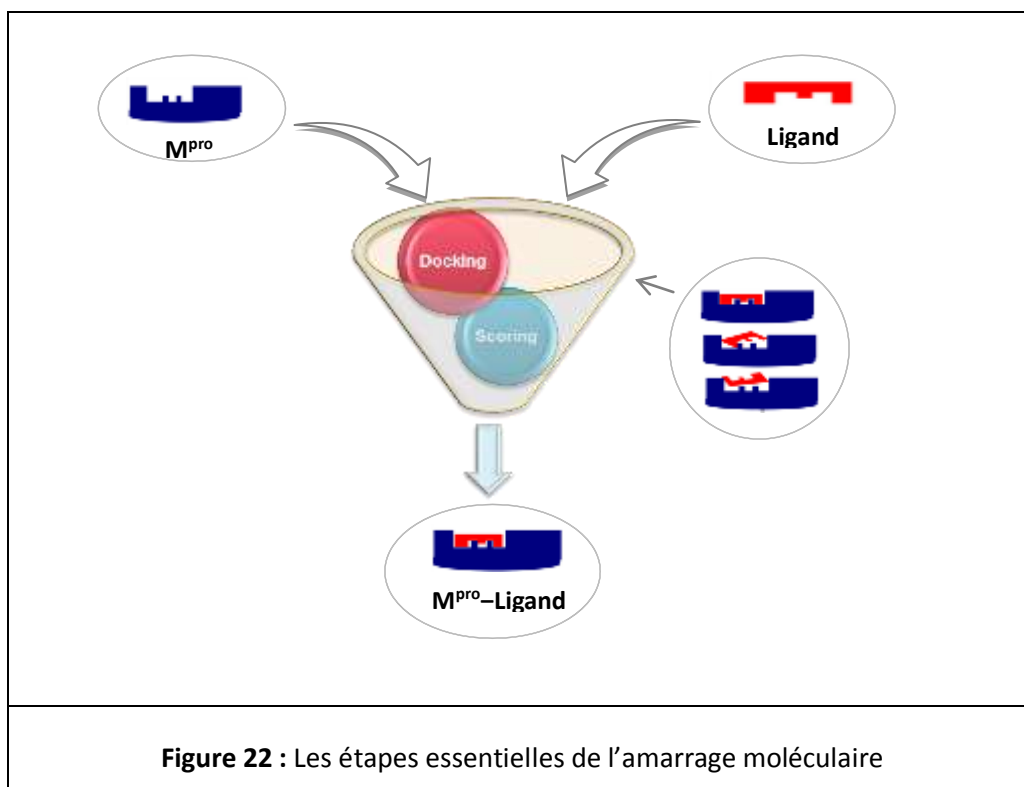
tous les dérivés est réalisée par le sous-programme AutoTors4. Ce dernier a pour rôle de contrôler les mouvements des ligands, en définissant les atomes aromatiques, les liaisons flexibles et les angles de torsion. Les molécules finales sont enregistrées au format pdbqt avant leur utilisation par AutoDock4.

V.3. Réalisation d'amarrage moléculaire

La simulation de l'amarrage moléculaire comprend essentiellement deux étapes : le docking et le scoring (voir la figure 22).

- Le processus docking consiste à placer le ligand dans le site actif de la protéine, en ne retenant que la position qui représente le mode d'interaction le plus favorable.
- Le scoring est l'étape de classement, permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées.

Dans cette étude, nous avons choisi le model protéique M^{pro} co-cristallisés avec son inhibiteur naturel **N3** (pdb id : 6LU7).



V.3.1. Calcul des grilles de potentiel (Calcul AutoGrid4) :

Pour augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système, le récepteur M^{pro} est plongé dans une grille tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéase étudiée et permettant la rotation libre du ligand dans ce site.

Le centre de cette boîte est déterminé par les coordonnées « $x = -9.768 \text{ \AA}$, $y = 11.436 \text{ \AA}$ et $z = 68.584 \text{ \AA}$ » avec les dimensions $40*54*40 \text{ \AA}^3$ (voir la figure 23).

L'espacement ou la maille de la grille est fixé par défaut à 0.375 \AA . La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les dérivés étudiés. L'ensemble de ces instructions sont sauvegardées dans un fichier texte avec l'extension GPF (Grid Paramètres File).

L'étape suivante du programme AutoDock4 consiste à exécuter les instructions (fichier GPF) grâce au sous-programme AutoGrid4. Il s'agit de calculer l'affinité entre les différents types d'atomes, de la protéase et l'inhibiteur, à l'intérieur de la boîte. Les résultats sont générés dans un autre fichier texte avec l'extension GLG (Grid LoG file).

V.3.2. Recherche des solutions d'amarrage (Calcul AutoDock4)

L'étape d'amarrage moléculaire est réalisée grâce au sous-programme AutoDock4. Il cherche les solutions d'amarrage en fonction des paramètres suivants qu'il retrouve dans le fichier des ordres DPF (Docking Paramètres File). Dans notre étude, nous avons utilisé l'algorithme AGL avec un nombre de cycles à exécuter, c'est-à-dire le nombre de solutions souhaitées, est égal à 500.

Les résultats de docking effectués par le sous-programme AutoDock4 sont générés dans un fichier texte avec l'extension DLG (docking log file), Ce fichier fournit les coordonnées atomiques de 500 meilleures positions du ligand dans le site actif de la protéase étudiée (M^{pro}), leur énergie d'interaction ΔG et les différentes valeurs de l'RMSD (Ecart quadratique moyen ; Root Mean Square Déviation) entre le ligand de référence et celui amarré.

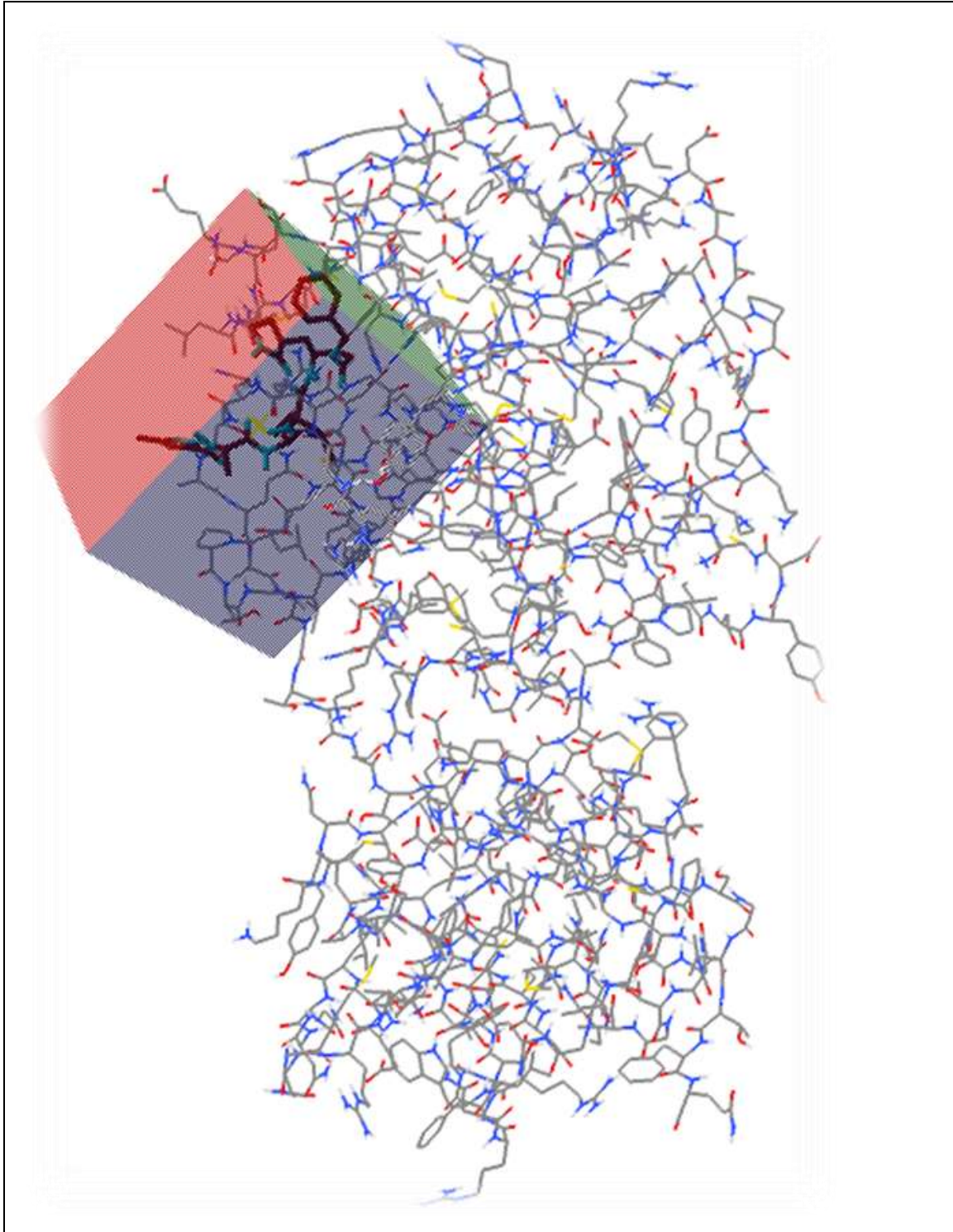


Figure 23 : Position de la boîte d'amarrage dans le site actif de la M^{pro}

VI. Résultats et discussions

VI.1. Evaluation de la fiabilité du programme d'amarrage

Le but de cette partie est de déterminer le positionnement correct du ligand par rapport au récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugée par ΔG et au RMSD de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB (code pdb du ligand : **N3**).

VI.1.1. RMSD et analyse visuelle

Le test de fiabilité du programme AutoDock4.2 a été réalisé avec le complexe co-cristallisé protéase–ligand, M^{pro}–**N3** (pdb id : 6LU7), pris de manière arbitraire de la PDB.

Durant les processus de docking moléculaire, 500 conformations sont calculées tandis que la conformation préférée est sélectionnée en regardant le cluster qui a l'énergie de liaison la plus faible. On utilise également une grandeur scalaire RMSD qui représente la moyenne des différences de positions des atomes appartenant à deux conformations différentes.

La pose la plus favorable du ligand **N3** re-amarré est inférieure à 2 Å en RMSD (1.66 Å). La valeur du RMSD est conforme aux résultats de Chikhi et Bensegueni (2008) [7] et Gabb (1997) [8] qui démontrent que tout programme de docking n'est performant que lorsque le RMSD est inférieur ou égal à 2 angströms.

Ces résultats sont fortement appuyés par l'analyse visuelle qui montre une superposition maximale de la meilleure conformation du ligand simulé par AutoDock4.2 avec la géométrie du même ligand donnée par diffraction des rayons-X (voir la figure 24).

Le test par RMSD nous permet de conclure, que le logiciel AutoDock peut être utilisé pour prédire les interactions protéase-inhibiteur.

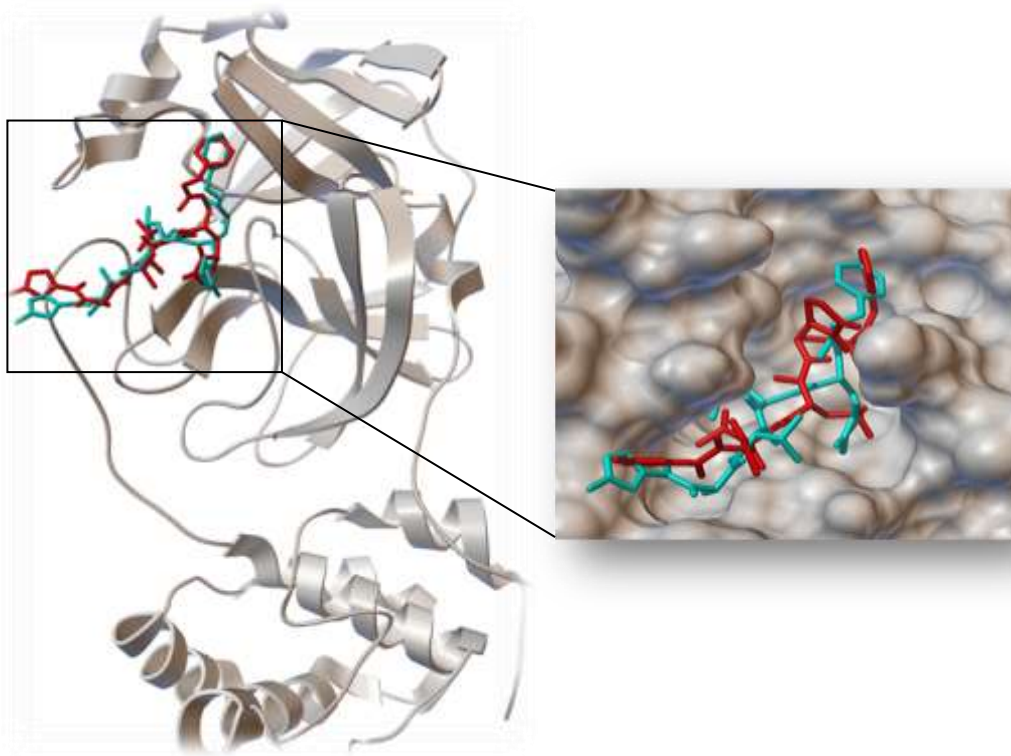


Figure 24 : Superposition de la géométrie du ligand N3 naturel (couleur bleu) et de celle calculée par l'amarrage moléculaire (couleur rouge) dans le site actif de la protéase M^{pro} .

VI.1.2. Interaction ligand naturel-récepteur (N3- M^{pro})

Dans le but de comprendre le mode d'interaction de nos dérivés de CQ avec le site actif de la M^{pro} , il nous a semblé judicieux d'étudier, en premier lieu, le mécanisme d'inhibition mis en place par l'inhibiteur **N3** qu'on retrouve sous forme de complexe avec M^{pro} au niveau de la PDB. Il s'agit de même complexe M^{pro} -**N3** (pdb id : 6LU7) utilisé précédemment dans le test de performance du programme.

Les interactions entre le site actif de protéase majeur (M^{pro}) et le ligand (**N3**) sont calculés à l'aide du programme AutoDock4.2. L'interface graphique de l'AutoDock-Tools 1.5.6 (ADT) et le code de visualisation "Discovery Studio nous ont aidé à visualiser les contacts de Van der Waals et les liaisons hydrogène mises en jeu lors de ces interactions.

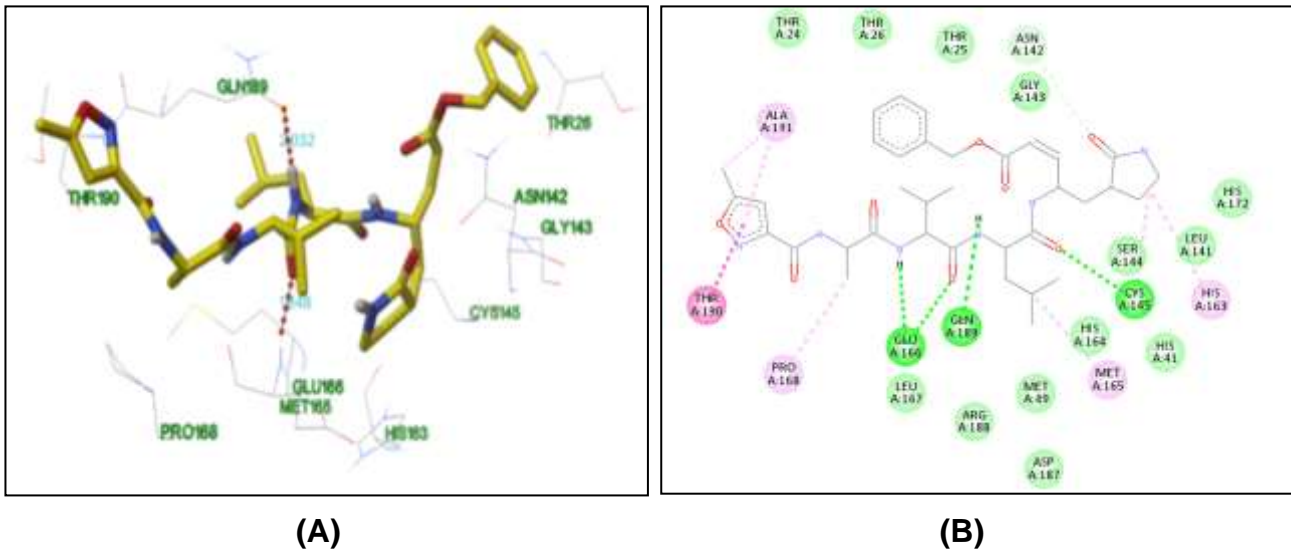


Figure 25 : Interactions de l'inhibiteur N3 re-amarré avec les résidus de chaîne latérale dans la cavité du site actif de la protéase M^{pro}. La structure (A) 3D présentée par le programme AutoDock Tools et la projection (B) 2D présentée par le programme Discovery studio.

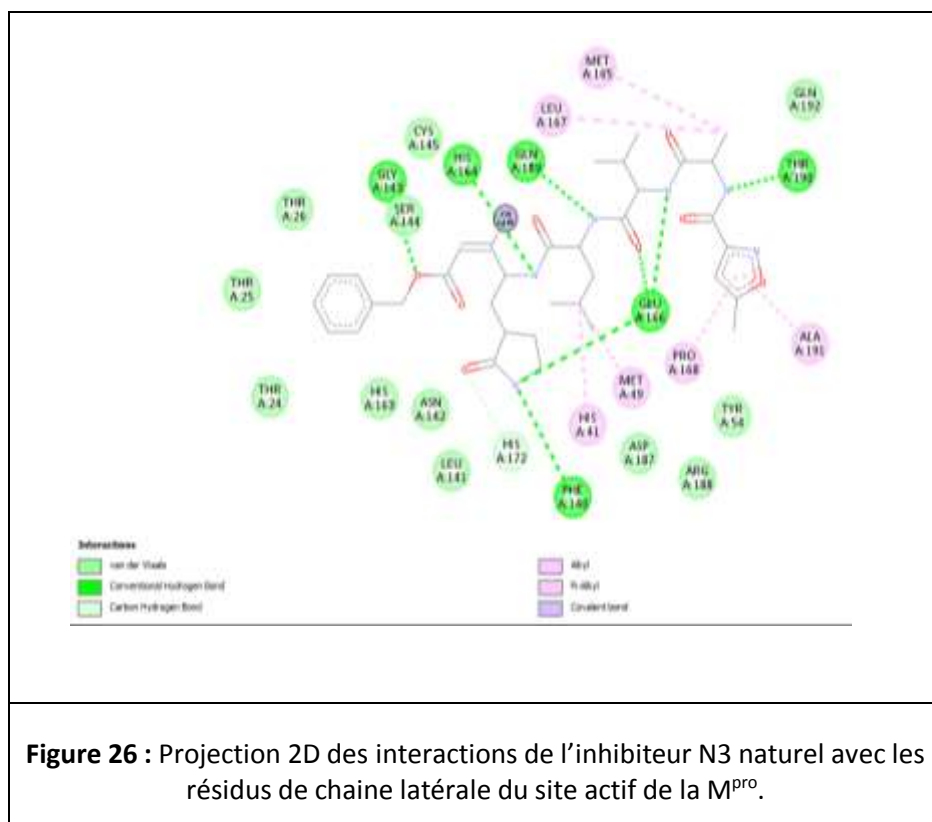


Figure 26 : Projection 2D des interactions de l'inhibiteur N3 naturel avec les résidus de chaîne latérale du site actif de la M^{pro}.

L'analyse visuelle montre que l'inhibiteur **N3** forme quatre liaisons hydrogènes avec les résidus de chaîne latérale « Gln189, Cys145, Glu166 » ($\text{N3-NH}\cdots\text{OC-Gln189}$; $d = 2.03 \text{ \AA}$, $\text{N3-NH}\cdots\text{OC-Glu166}$; $d = 2.72 \text{ \AA}$, $\text{N3-CO}\cdots\text{HN-Glu166}$; $d = 1.85 \text{ \AA}$, (voir la figure 25) et une liaison hydrogène (dite classique) avec le carbone de l'acide aminé Asn142. L'inhibiteur **N3** est stabilisé par d'autres interactions hydrophobes dont : une interaction π -Amide entre l'acide aminé Thr190 et le lactame (amide cyclique) du ligand **N3**, cinq interactions π -Alkyle avec les acides aminés « Cys145, His163, Met165, Pro168, Ala190 », et beaucoup d'interactions Van-Der-Wals avec les acides aminés « Thr24, Thr26, Thr25, Gly143, His172, Leu141, Ser14, His164, His41, Met49, Arg188, Leu167, Asp187. L'énergie d'amarrage prédite par AutoDock était « $\Delta G = -7.81 \text{ Kcal/mol}$ » pour la meilleure conformation (pose 60). Ce mode d'interaction est presque similaire à celui présent dans la projection 2D du complexe $\text{M}^{\text{Pro}}-\text{N3}$ co-cristallisé (voir la figure 26). On peut conclure que le programme Autodock reproduit correctement le mode de liaison.

VI.2. Amarrage des dérivés de la chloroquine

A la lumière des résultats obtenus avec le ligand **N3** re-amarré, nous pouvons conclure que le programme Autodock est performant et qu'on peut l'utiliser sans trop de risque d'erreurs pour générer (par docking moléculaire) d'autres inhibiteurs et de prédire leur mode d'interaction. À cet effet, nous avons amarré nos dérivés de la chloroquine ($\text{CQ-R/ R} = \text{H, OH, Br, NH}_2 \text{ et CH}_3$) dans la même cavité occupée par le ligand **N3**. En utilisant toujours la protéase M^{Pro} (code pdb : 6LU7) avec les mêmes conditions de calcul.

VI.2.1. Alignements des dérivés

Au vu des résultats obtenus, comme le montre la figure 27, les meilleures conformations pour tous les dérivés sont bien placées dans le site actif de la M^{Pro} où ils sont alignés avec l'inhibiteur naturel **N3**.

L'histogramme de la figure 28 (tableau S1) montre que la plupart des acides aminés du site actif sont généralement impliqués dans plusieurs types d'interactions, notamment : les hydrogènes, van-der-waals et hydrophobes. Une interaction spécifique, de type π -soufre, a été observée dans les trois dérivés CQ, CQ-NH₂ et CQ-CH₃, et une autre de type halogène pour le dérivé CQ-Br (figure 28).

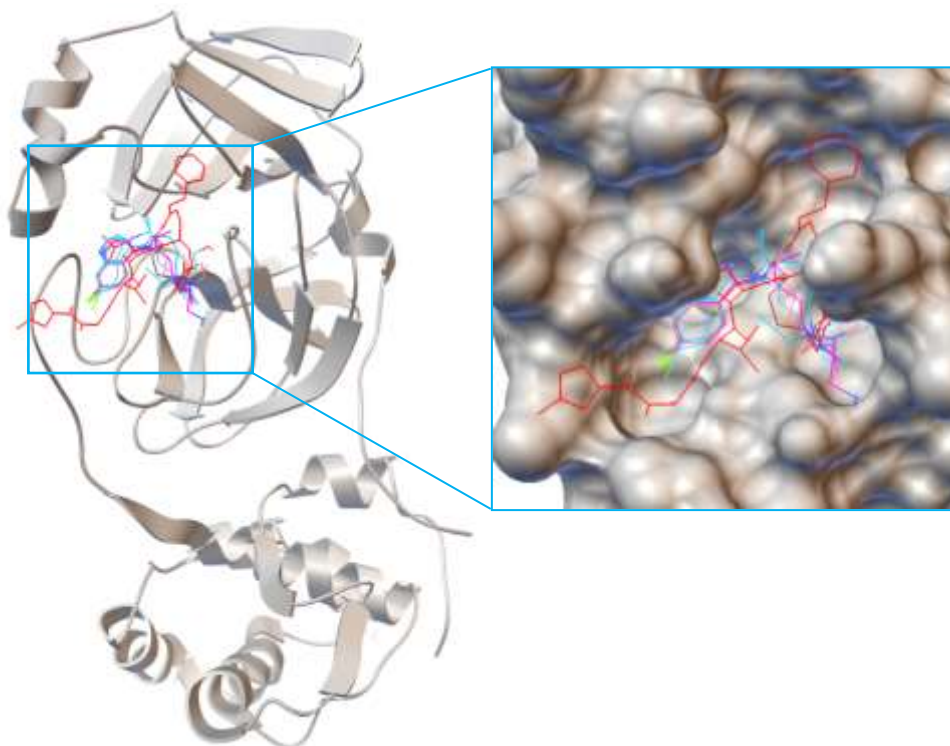


Figure 27 : Alignements des dérivés de chloroquine dans le site actif de la M^{pro}. Ligand naturel N3 est coloré en rouge.

Avec très peu de données publiées dans ce contexte, il nous a semblé intéressant de déterminer théoriquement, certains paramètres décrivant l'activité inhibitrice, le K_i et l'énergie d'interaction ΔG notamment.

Comme la montre l'histogramme de la figure 29, la modélisation de l'énergie d'interaction (ΔG) entre les dérivés de CQ et le site actif de la M^{pro} donne un score variant entre -6.76 et -8.11 Kcal/mol. Généralement, ces valeurs sont proche de celle du ligand N3 re-amarré ($\Delta G = -7.81$ Kcal/mol).

La détermination théorique de la constante d'inhibition K_i donne des valeurs dans la gamme micromolaire inférieure (entre 1,33 et 23,47 μM) (voir la figure 29). En revanche, le dérivé CQ-NH₂ présentait une valeur de K_i plus faible (1,33 μM), ce qui nous indique que l'activité inhibitrice de ce composé est relativement forte par rapport aux autres ligands amarrés.

Si nous comparons les valeurs d'énergie de liaison, nous trouvons que la valeur d'énergie minimale du dérivé CQ-NH₂ ($\Delta G = -8.11$ Kcal/mol) est meilleure que celle obtenue pour le ligand re-amarré N3 ($\Delta G = -7.81$ Kcal/mol) (voir la figure 29).

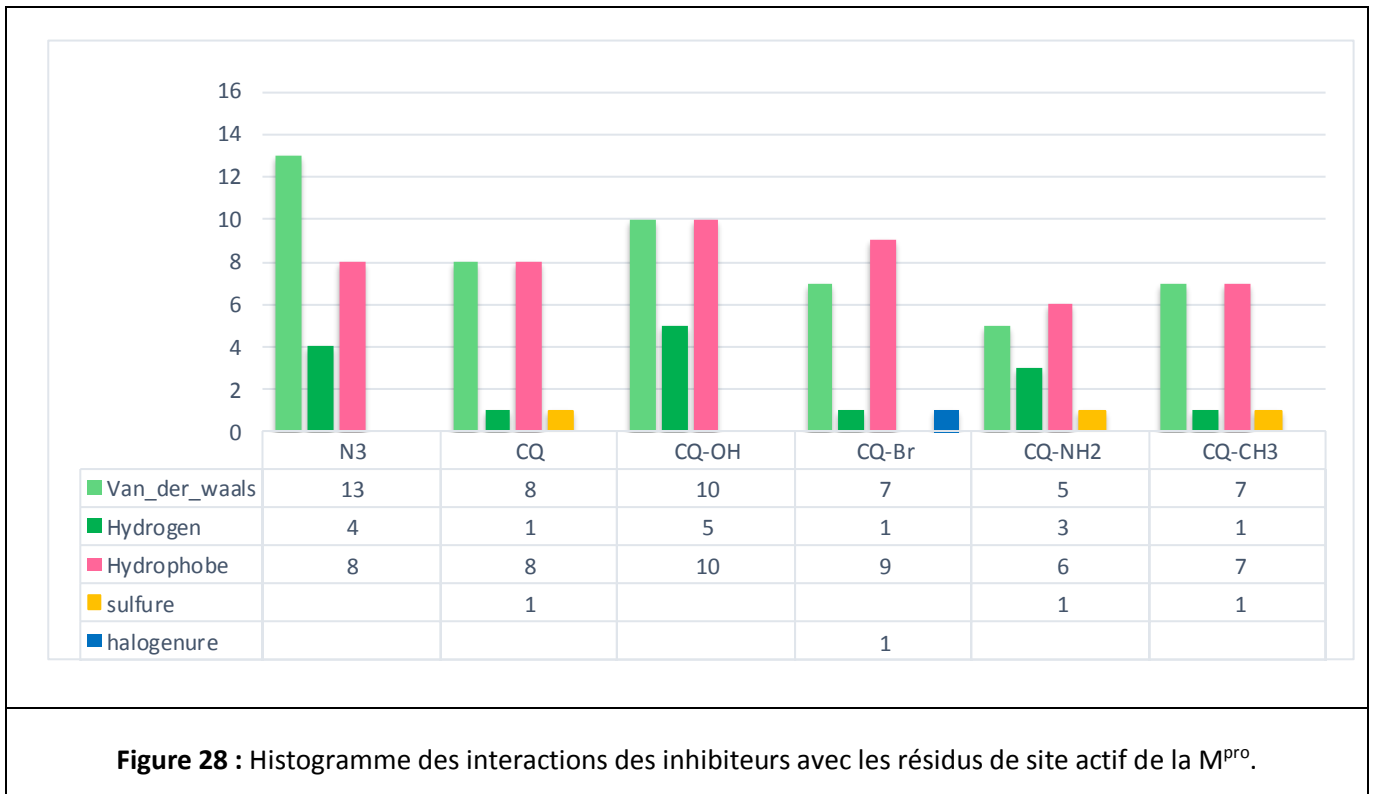


Figure 28 : Histogramme des interactions des inhibiteurs avec les résidus de site actif de la M^{pro} .

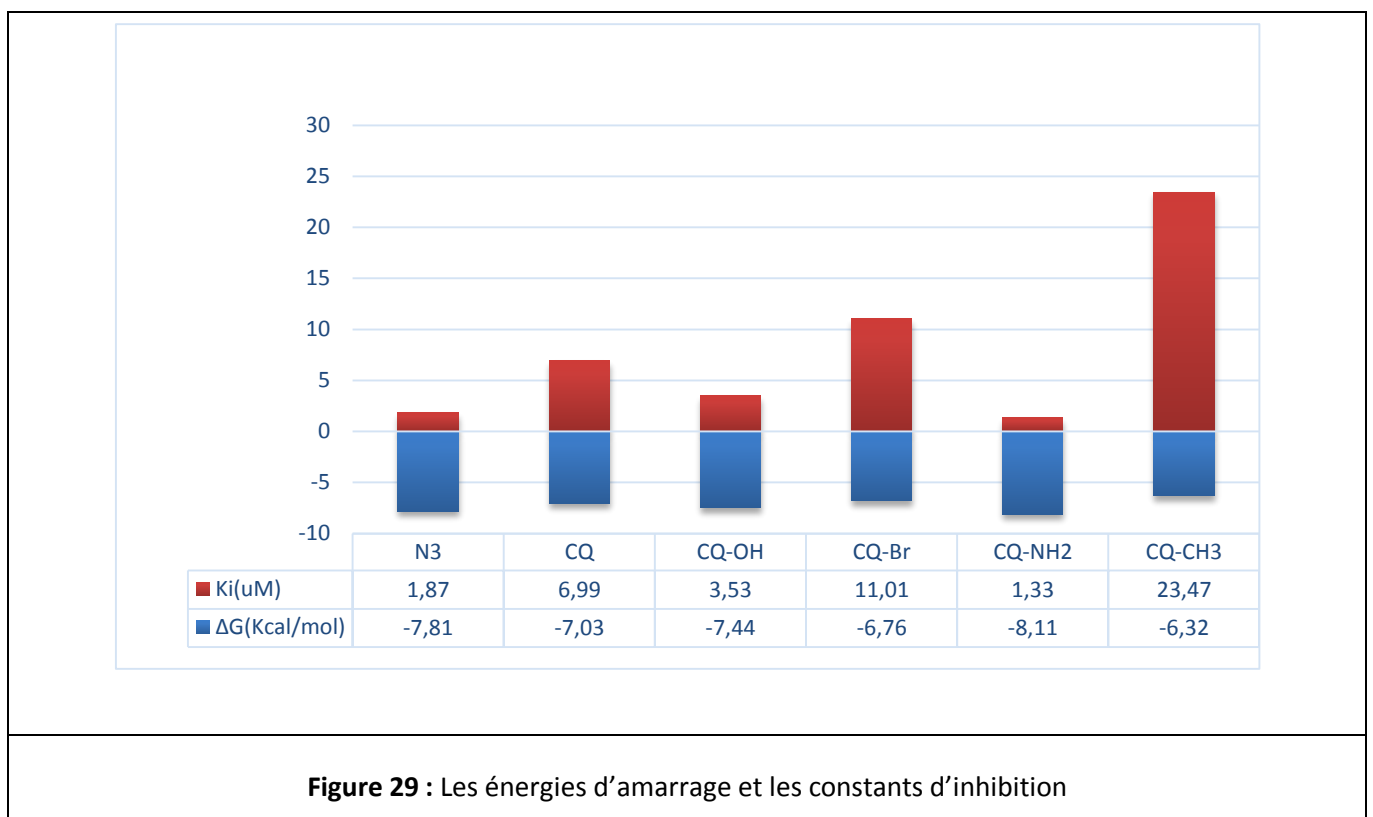


Figure 29 : Les énergies d'amarrage et les constants d'inhibition

L'histogramme de la figure 30 (tableau S2) montre que la plupart des acides aminés, situés autour de la poche catalytique de la M^{pro}, sont intervenus dans des contacts « protéine-ligand » avec tous les dérivés de chloroquine amarrés, dont le ligand naturel **N3** ré-amarré.

Le mode de liaison obtenu par l'amarrage moléculaire pour tous les résidus du domaine actif a révélé plusieurs types d'interactions, telles que : hydrogène, hydrophobe, VDW, π -soufre, halogène, ... etc (figure 30). Parmi tous les acides aminés du site actif, quatre résidus « Asn142, Met165, His41 et Cys145 » ont le plus grand nombre d'interactions favorisées avec toutes les molécules amarrées.

En cela, on note que la dyade catalytique (His41-Cys145) est impliquée dans des contacts principalement de types : hydrogène, hydrophobe et VDW. Ces contacts jouent un rôle important dans la stabilité biologique des complexes protéine-ligand, en raison de leur forte influence sur la spécificité, l'adaptation et l'adsorption des inhibiteurs, ce qui ouvre la voie à la conception de nouveaux médicaments.

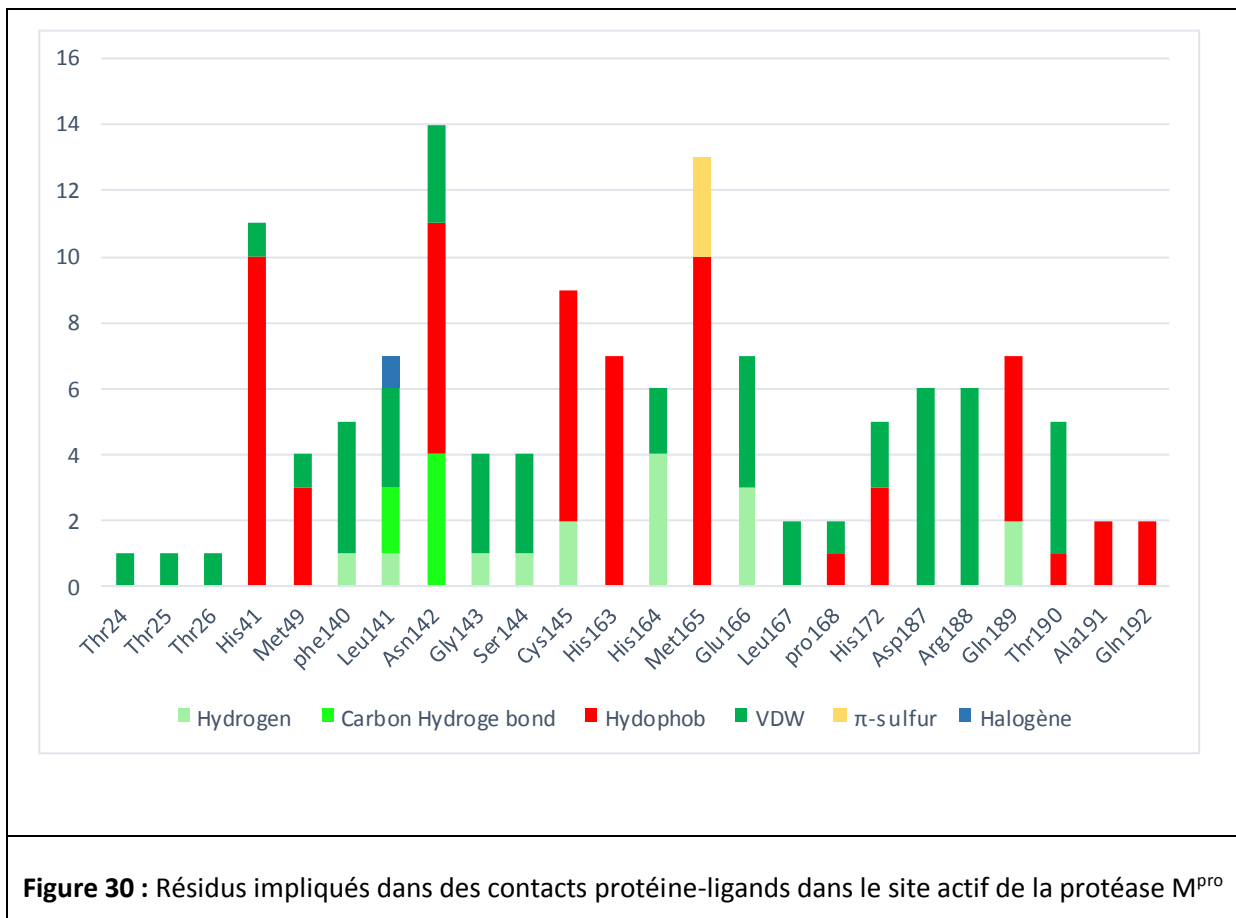


Figure 30 : Résidus impliqués dans des contacts protéine-ligands dans le site actif de la protéase M^{pro}

VI.2.2. Etude de l'interaction de la chloroquine et hydroxychloroquine avec le récepteur M^{pro}

Le but de cette étude est de comparer le mode d'interaction entre le CQ et son homologue CQ-OH. Nous avons d'abord fait superposer la meilleure conformation de CQ (pose 82) à celle de CQ-OH (pose 94), dans le site actif de la M^{pro}, afin de connaître la gamme de similarité de ces deux dérivés.

Comme le montre la figure 31, les deux composés CQ et CQ-OH sont bien placés dans la cavité protéasique où ils sont en contact avec les deux acides aminés, His41 et Cys145, responsables de la réaction de clivage viral. Ces deux dérivés présentent des conformations spatiales superposables dans le site actif avec une faible déviation en RMSD par rapport au ligand naturel N3. (RMSD = 1.52 Å pour CQ et 0.97 Å pour CQ-OH).

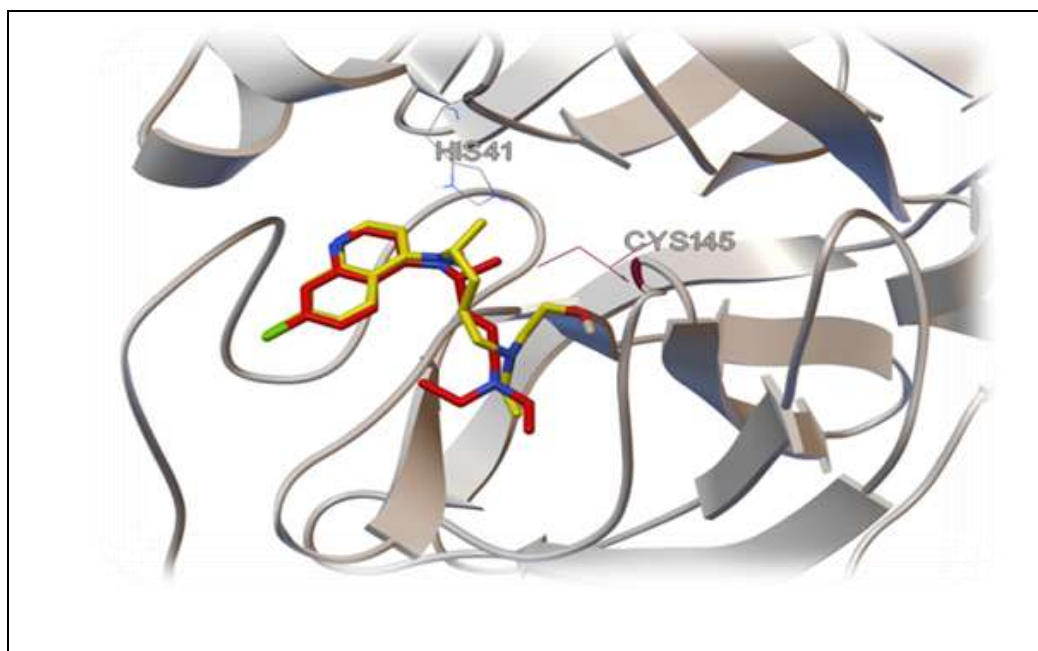


Figure 31 : Superposition des ligands CQ et CQ-OH dans le site actif de la M^{pro}. Code de couleur : atomes de carbones en rouge pour CQ et en jaune pour CQ-OH.

La visualisation des résultats d'amarrage moléculaire fournis dans les figure 32 et 33 montre que les deux dérivés (CQ et CQ-OH) partagent un mode de liaison presque similaire qui est adopté par plusieurs contacts avec les résidus « His41, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Glu166, His172, Asp187, Arg188, Gln189 et Thr190 ».

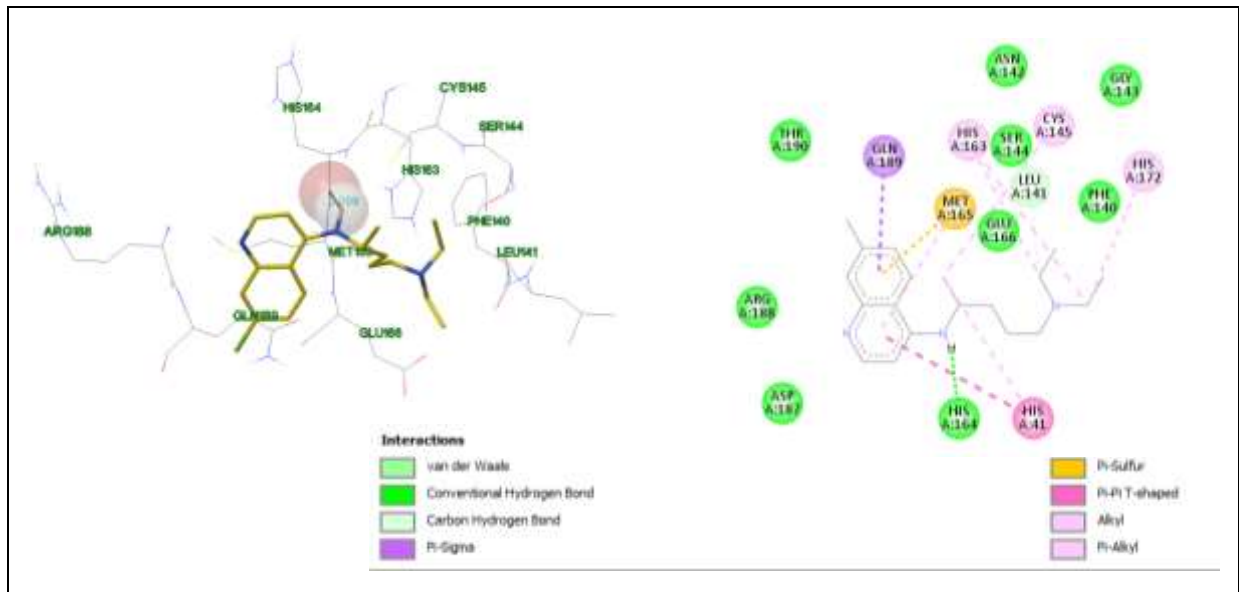


Figure 32 : Projection 2D (Discovery Studio) et 3D (AutoDock) des interactions ligand-récepteur, de la chloroquine avec M^{pro}

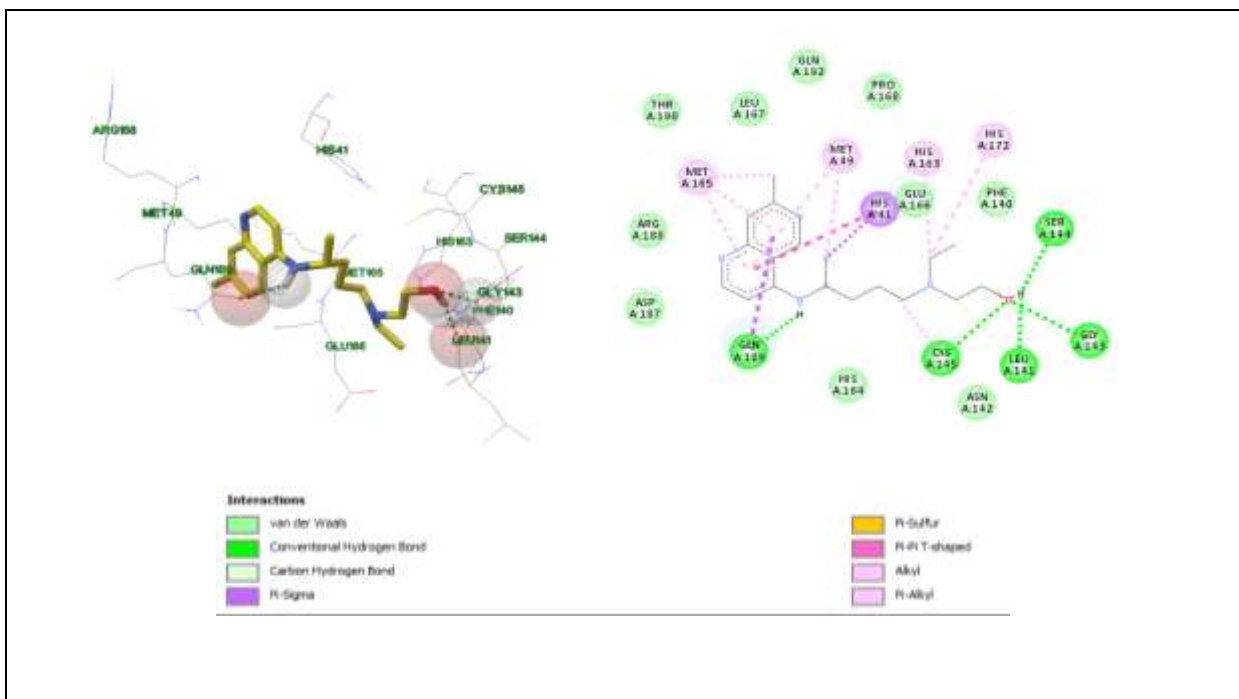


Figure 33 : Projection 2D (Discovery Studio) et 3D (AutoDock) des interactions ligand-récepteur, de l'hydroxychloroquine avec M^{pro}

La figure 32 révèle que la CQ a été stabilisé non seulement par des interactions VDW mais aussi par une liaison hydrogène avec le résidu His164 (CQ—NH•••OC—His164 ; d = 2.028 Å). Tandis que la fonction hydroxyle (-OH) dans le cas de dérivé CQ-OH forme d'autres liaisons hydrogènes supplémentaires avec les résidus « Leu141, Ser144, Gln189, Cys145 et Gly143 » : (CQ-OH)—OH•••OC—Leu141 ; d = 1.929 Å, (CQ-OH)—HO•••HN—Ser144 ; d = 2.075 Å, (CQ-OH)—NH•••OC—Gln189 ; d = 2.145 Å, (CQ-OH)—CO•••HN—Cys145 ; d = 2.41 Å, (CQ-OH)—CO•••HN—Gly143 ; d = 2.54 Å (figure 33). Les interactions fournis grâce à un groupement -OH semblent apporter une contribution importante à la stabilisation du dérivé CQ-OH, qui possède des affinités meilleures par rapport à son homologue CQ (K_i de 3.53 μM pour CQ-OH vs 6.9 μM pour CQ ; ΔG = -7.44 Kcal/mol pour CQ-OH vs -7.03 Kcal/mol pour CQ). Ces résultats sont cohérents avec les essais cliniques.

VI.2.3. Etude de l'interaction de dérivé CQ-Br avec le récepteur M^{pro}

L'analyse visuelle (voir la figure 34) montre que ce complexe (M^{pro}—CQ-Br) est stabilisé par de nombreuses types d'interactions telles que : des forces de Van-der-waals avec les résidus « Phe140, Ser144, Glu166, Asp187, Arg188, Thr190 et Gln192 » (colorés en vert), des interactions hydrophobes avec les résidus « Cys145, His163, Met165 (π-alkyl), Gln189 (π-sigma), et une interaction hydrophobique π-π (forme de T) entre les deux cycles aromatiques de la molécule CQ-Br et l'acide aminé His41 ligand-récepteur.

La projection 2D (voir la figure 34) montre également que le composé CQ-Br forme deux autres liaisons intéressantes : une liaison hydrogène entre fonction amine du dérivé CQ-Br et le carbonyle de l'acide aminé His164 (CQ-Br—NH•••OC—His164 ; d=2.13 Å), et une autre interaction, de type halogène, entre l'atome de brome et le résidu chaîne latérale Leu141 (CQ—Br•••OC—Leu141 ; d =3.28 Å).

VI.2.4. Etude de l'interaction de dérivé CQ-NH₂ avec le récepteur M^{pro}

Dans le cas d'un composé CQ-NH₂, comme indiqué dans la figure 35, on peut observer trois liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques plus fortes, de type π-π, π-sigma et π-soufre, provoquées par le contact des unités cycliques du CQ-NH₂ avec les résidus de la chaîne latérale « His41, Gln189 et Met165 », respectivement.

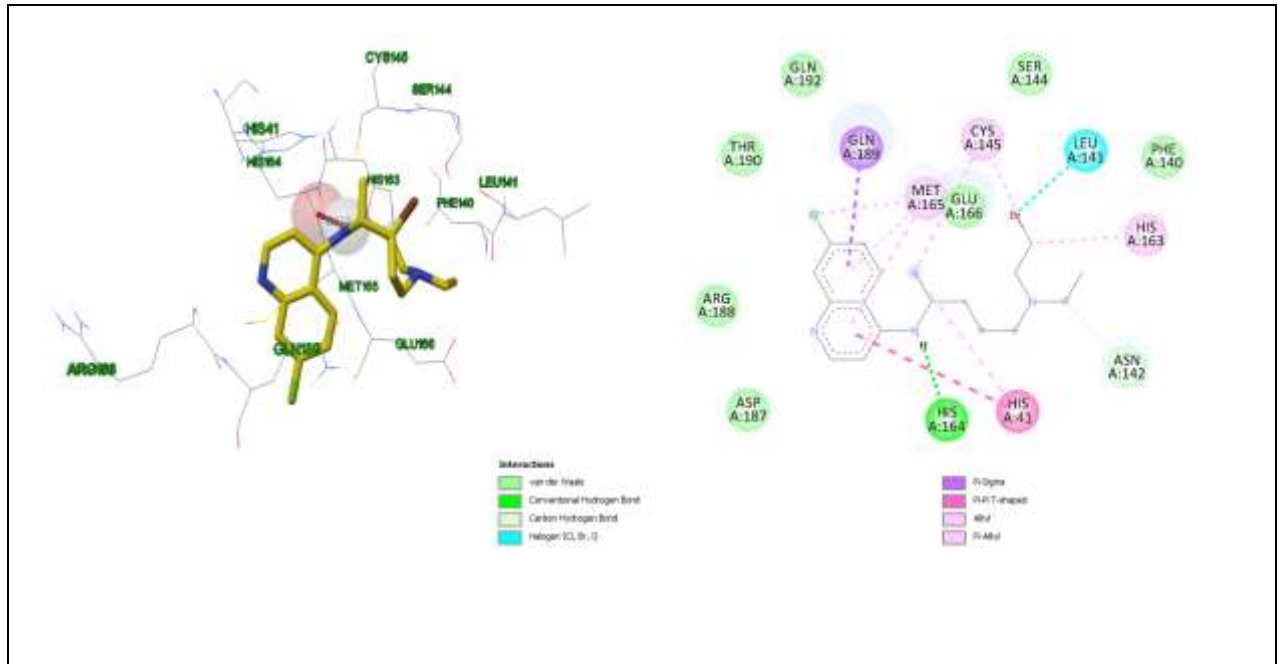


Figure 34 : Interaction ligand-récepteur du complexe M^{PRO}-CQ-Br. Projection 2D par « discovery studio » et 3D par « AutoDock ».

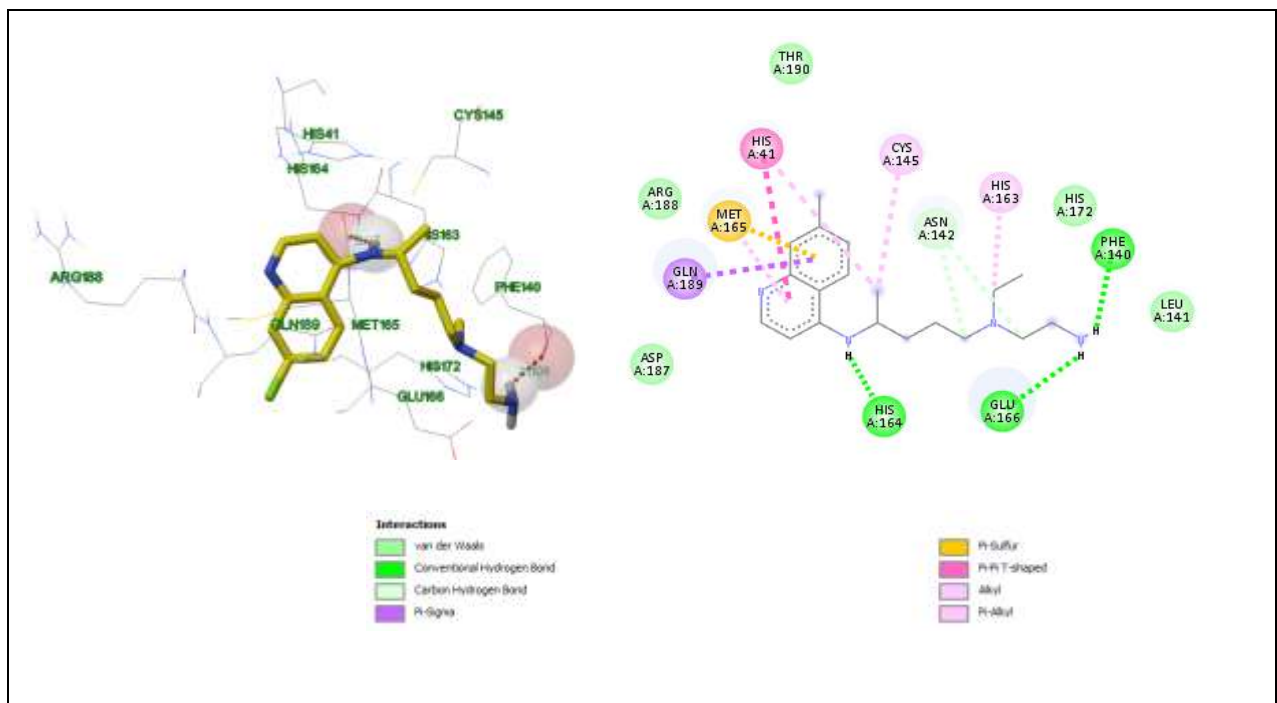


Figure 35 : Interaction ligand-récepteur du complexe M^{PRO}-CQ-NH₂. projection 2D par « discovery studio » et 3D par « AutoDock ».

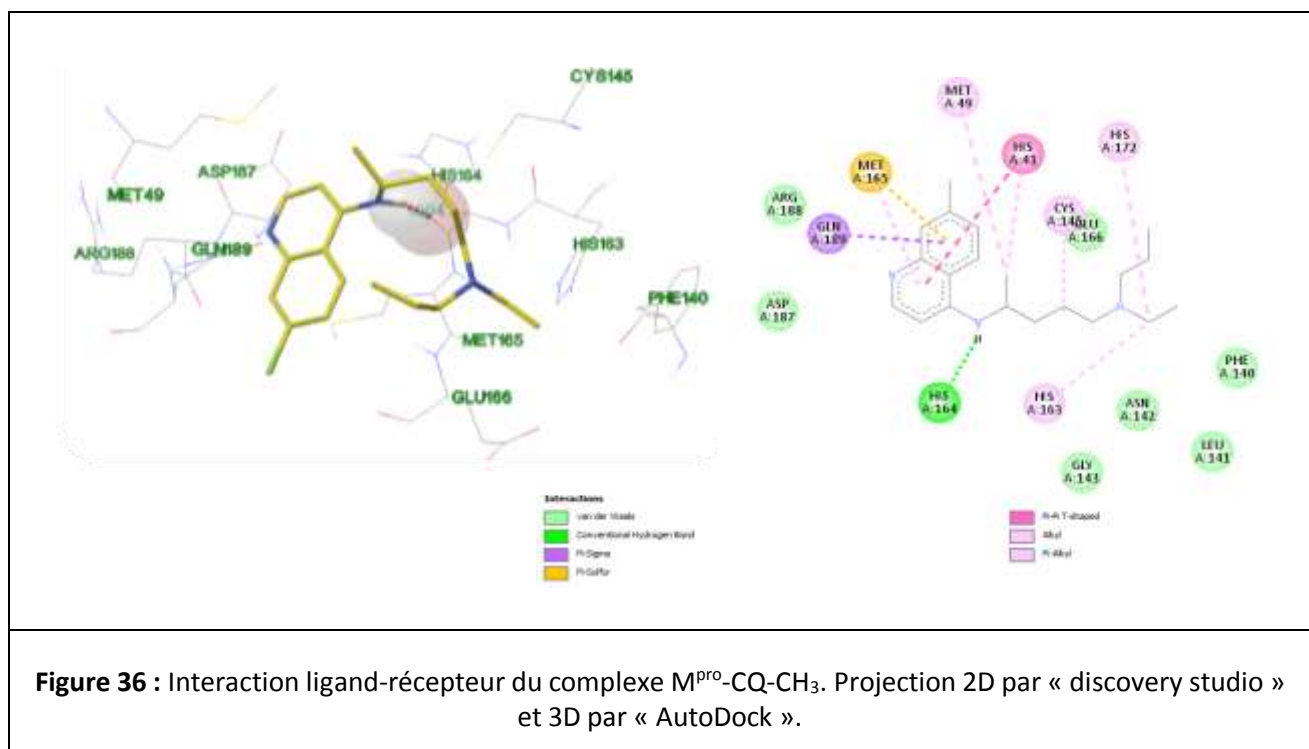
Le composé CQ-NH₂ établit également d'autres interactions hydrophobiques avec les résidus Leu141, Asn142, Cys145, His163, His172, Asp187, Arg188 et Thr190.

Ce réseau intense d'interactions fourni par la molécule CQ-NH₂ reflète les données de ΔG et K_i théoriques plus petites calculées par Autodock.

L'affinité importante du composé CQ-NH₂ vis-à-vis le site actif de la protéase M^{pro} ($\Delta G = -8.11$ Kcal/mol ; $K_i = 1,33$ μM), en comparaison avec les autres dérivés, peut également s'expliquer par la contribution de l'extrémité amine -NH₂, qui a pu établir deux liaisons hydrogène supplémentaires, l'une avec le résidu Phe140 (CQ-NH(1)•••OC-Phe140 ; $d = 2.01$ Å) et l'autre avec Glu166 (CQ-NH(2)•••OC-Glu166 ; $d = 2.05$ Å) (figure 35).

VI.2.5. Etude de l'interaction de dérivé CQ-CH₃ avec le récepteur M^{pro}

Le composé CQ-CH₃ est le dernier dérivé étudié dans cette classe d'inhibiteurs. La visualisation des résultats de l'amarrage, mentionnée dans la figure 36, montre que le composé CQ-CH₃ forme avec le site actif de la M^{pro} une seule liaison hydrogène (CQ-CH₃-NH•••OC-His164 ; $d = 1.904$ Å) et d'autres interactions VDW similaires à celles obtenues dans les autres dérivés. Il est important de souligner que le groupe méthyle n'a établi aucune interaction de type l'hydrogène.



D'autre part, le programme AutoDock nous a permis de prédire son énergie d'interaction avec la M^{pro} qui s'évalue à -6.32 Kcal/mol. Cette énergie d'interaction correspond une constante d'inhibition théorique (K_i) de l'ordre de 23.47 μM. Ces mauvaises valeurs théoriques reflètent la contribution plus faible du groupement méthyle, sur l'affinité de la molécule CQ-CH₃ vis-à-vis du site actif du récepteur M^{pro}, par rapport aux autres groupes (-OH, -Br et NH₂).

Références

- [1] Morris, Garrett M., et al. "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function." *Journal of computational chemistry* 19.14 (1998): 1639-1662.
- [2] Morris, Garrett M., et al. "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." *Journal of computational chemistry* 30.16 (2009): 2785-2791.
- [3] Zhenli, Zhong Zengpei Huang. "The Computation Basis of Software CS Chem3D and its Application in Organic Chemistry." *Guang Zhou Chemical Industry and Technology* 2 (2002).
- [4] BIOVIA, D. S., Discovery Studio Modeling Environment, Version 2.5. BIOVIA Workbook, Release 2017; BIOVIA Pipeline Pilot, Release 2017, 2007;
- [5] Weiner, Paul K., and Peter A. Kollman. "AMBER: Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions." *Journal of Computational Chemistry* 2.3 (1981): 287-303.
- [6] Lien de PubChem : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroquine-phosphate#section=3D-Conformer>
- [7] Chikhi, Abdelouahab, and Abderrahmane Bensegueni. "Docking efficiency comparison of Surflex, a commercial package and Arguslab, a licensable freeware." *Journal of Computer Science & Systems Biology* 1.01 (2008): 081-086.
- [8] Gabb, Henry A., Richard M. Jackson, and Michael JE Sternberg. "Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information." *Journal of molecular biology* 272.1 (1997): 106-120.



Conclusion générale

Conclusion générale

Notre travail a pour but essentiel d'acquérir des compétences en simulation informatique, en particulier l'amarrage moléculaire par un programme AutoDock4.2, afin d'identifier *in-silico* de nouveaux inhibiteurs candidats efficaces contre le covid-19.

Cette étude *in-silico* porte sur l'identification et l'inhibition du site catalytique de la protéase virale M^{pro} (Cys145-His41) responsable de la réplication et de la maturation du coronavirus, empêchant ainsi le cycle de vie viral.

Nous avons donc essayé de contribuer, d'une part, à la compréhension du mécanisme d'action de deux analogues commerciaux de la chloroquine (CQ) et de l'hydroxychloroquine (CQ-OH) contre la protéase majeure du covid-19 (M^{pro}) et, d'autre part, à la recherche de nouvelles agents thérapeutiques potentiels par criblage virtuel.

Les résultats préliminaires obtenus par l'amarrage moléculaire montrent une forte affinité du médicament hydroxychloroquine vis-à-vis la protéase majeure du Sars-CoV-2, en comparaison avec son analogue chloroquine, grâce à un réseau intense d'interactions supplémentaires (hydrogène, hydrophobe ... etc.) fournies par l'extrémité hydroxyle (Ki = 3.53 vs 6.9 μ M et $\Delta G = -7.44$ vs -7.03 Kcal/mol pour CQ-OH et CQ, respectivement). Ces résultats sont cohérents avec les essais cliniques.

L'activité inhibitrice de la chloroquine peut être améliorée par modification structurale par substitution multiple. Pour cela, nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs à base de chloroquine, contenant des groupes fonctionnels substitués : bromure (CQ-Br), amino (CQ-NH₂) et méthyle (CQ-CH₃).

Parmi les trois dérivés conçus (CQ-Br, CQ-NH₂ et CQ-CH₃), le composé CQ-NH₂ issu de l'introduction d'un groupement amine sur le radical **R** montre une nette amélioration de son énergie d'interaction, qui passe de $-7,03$ (dans le cas de CQ) à $-8,11$ Kcal/mole. La valeur théorique de son Ki diminue également de 6,99 (dans le cas de CQ) à 1,33 μ M.

La meilleure affinité du dérivé CQ-NH₂ vis-à-vis le site actif de la protéase M^{pro} peut s'expliquer par la contribution importante de l'extrémité amine -NH₂, qui a pu établir deux liaisons hydrogène supplémentaires avec les résidus Phe140 et Glu166, ce qui en rend un candidat potentiel en tant qu'agent antiviral.

En fin, En termes de perspectives d'avenir, ce travail pourra être complété et prolongé par une étude expérimentale *in-vitro* et/ou *in-vivo* afin de valider nos résultats théoriques et vérifier l'efficacité de l'approche *in-silico*.



Annexe

Tableau S1 : Résultats d'amarrage moléculaire de la chloroquine et ses dérivés avec M^{Pto}

Molécules	ΔG (Kcal/mol)	RMSD (Å)	Ki (μM)	Distance de l'interaction hydrogène (Å)	Les résidus en contacts
CQ	-7.03	1.53	6.9	CQ—NH \cdots OC—His164=2.028	His164, Met165, His41, His172, His164, Cys145, Gly143, Asn142, Ser144, Phe140, Glu166, Leu141, Asp187, Arg188, Gln189, Thr190.
CQ-OH	-7.44	0.97	3.53	HCQ—OH \cdots OC—Leu141=1.93 HCQ—OH \cdots OC—Ser144=2.53 HCQC—O \cdots HN—Cys145=2.41 HCQC—O \cdots HN—Gly143=2.54 HCQ—NH \cdots OC—Gln189=2.15	Thr190, Leu167, Gln192, Pro168, Glu166, Phe140, Asn142, His164, Asp187, Arg188, Met165, Met49, His163, His172, His41, Gln189, Cys145, Leu141, Gly143, Ser144
CQ-NH₂	-8.11	1.64	1.33	CQ-NH ₂ —NH \cdots OC—His164=2.02 CQ-NH ₂ —NH \cdots OC—Phe140=2.01 CQ-NH ₂ —NH \cdots OC—Glu166=2.05	Thr190, Asp187, Arg188, His172, Leu141, Gln189, Met165, His41, cys145, His163, Asn142, Phe140, Glu166, His164.
CQ-Br	-6.76	00	11.01	CQ-Br—NH \cdots OC—His164=2.13	Thr190, Gln192, Arg188, Asp187, Glu166, Ser144, Phe140, Leu141, Cys145, Met165, Gln189, His163, Asn142, His41, His164
CQ-CH₃	-6.32	0.84	23.47	CQCH ₃ —NH \cdots OC—His164=1.904	Arg188, Asp187, Glu166, Phe140, Asn142, Leu141, Gly143, His163, His164, His172, Cys145, His41, Met165, Gln189, Met49

Tableau S2 : Résidus impliqués dans des contacts protéine-ligands dans le site actif de la protéase M^{Pro} ; liaison hydrogène (**H**), liaison carbone classique (**CH**), interaction hydrophobe (**hy**), interaction van-der-waals (**vd**), interaction π -sulfure (**S**), interaction halogène (**hg**).

	THR 24	THR 25	THR 26	HIS 41	ME T 49	PH E 140	LE U 141	ASN 142	GL Y 143	SE R 144	CY S 145	HIS 163	HIS 164	ME T 165	GL U 166	LE U 167	PR O 168	HIS 172	AS P 187	AR G 188	GL N 189	THR 190	AL A 191	GL N 192
N3	1vd	1vd	1vd	1vd	1vd	-	1vd	1CH	1vd	1vd	1H 1hy	1hy	1vd	1hy	2H	1vd	1hy	1vd	1vd	1vd	1H	1hy	2hy	-
CQ	-	-	-	2hy	-	1vd	1CH	1vd	1vd	1vd	1hy	2hy	1H	1sf 1hy	1vd	-	-	1hy	1vd	1vd	1hy	1vd	-	-
CQ-OH	-	-	-	2hy	2hd	1vd	1H 1CH	1vd	1H	1H	1H 1hy	1hy	1vd	3hy	1vd	1v	1v	1hy	1vd	1vd	1H 1hy	1vd	-	1vd
CQ-Br	-	-	-	2hy	-	1vd	1hg	1CH	-	1vd	2hy	1hy	1H	3hy	1vd	-	-	-	1vd	1vd	1hy	1vd	-	1vd
CQ-NH₂	-	-	-	2hy	-	1H	1vd	2CH	-	-	1hy	1hy	1H	1S 1hy	1H	-	-	1vy	1vd	1vd	1hy	1vd	-	-
CQ-CH₃	-	-	-	2hy	1hd	1vd	1vd	1vd	1vd	-	1hy	1hy	1H	1S 1hy	1vd	-	-	1hy	1vd	1vd	1hy	-	-	-

Liaison H	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	2	-	4	-	3	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Liaison C...H	-	-	-	-	-	-	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrophobe	-	-	-	10	3	-	-	-	-	-	7	7	-	10	-	-	1	3	-	-	5	1	2	-
VDW	1	1	1	1	1	4	3	3	3	3	-	-	2	-	4	2	1	2	6	6	-	4	-	2
π -sulfure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halogène	-	0	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La somme	1	1	1	11	4	5	7	7	4	4	9	7	6	13	7	2	2	5	6	6	7	5	2	2