



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des Sciences Exactes
Département des Sciences de la Matière

MÉMOIRE DE MASTER

Sciences de la matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Présenté et soutenu par :

Herzallah Remaissa

Le : 02 juin 2025

DOCKING MOLECULAIRE D'UNE SERIE BIOACTIVE A INTERET THERAPEUTIQUE

Jury:

Dr. MELLAOUI MALIKA	M.C.A	Université de Biskra	Rapporteur
Pr. MELKEMI NADJIB	Professeur	Université de Biskra	Président
Pr. HARKATI DALAL	Professeur	Université de Biskra	Examinatrice

Année universitaire : 2024 / 2025

Dédicace :

Je dédie ce mémoire de fin d'études À mes chers parents

A mon cher mari ADEL Bezziou et mon fils abd RAOUF

A mes chères sœurs Soumia et Hind

À mes chers frères Imad et Issam

À mes amis, mes collègues d'études

À l'âme de ma grande mère que Dieu l'accueille dans son vaste paradis et dans son
infinie miséricorde.

À tous ceux qui ont contribué à ce travail de proche ou de loin

Remerciement

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

Le plus sincère remerciement revient à mon encadrante **DR. MELLAOUI MALIKA** Pour sa constante disponibilité, ses précieux conseils, sa patience et sa supervision éclairée a été d'une aide précieuse tout au long du processus. Je vous remercie d'avoir mis autant de volonté et d'attention à mon travail

Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury **DR. MELKEMI NADJIB et Dr. DALAL HARKATI** pour leur présence, pour leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail. Enfin nous adressons tous nos chaleureux remerciements aux enseignants Personnels du département de chimie pour leur dévouement et abnégation Et sans oublier également nos collègues de notre promotion.

Sommaire :

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Références bibliographiques3

Partie théorique :

Chapitre I : Généralités sur l'Hépatite C et la polymérase NS5B

I. Introduction.....6

II. L'infection par le virus de l'hépatite C6

II.1 Découverte de l'agent responsable6

II.2 Données épidémiologiques.....6

II.2.1 Dans le monde6

II.2.2 En Algérie 7

II.3 Modes de transmission de VHC et facteurs de risque8

II.3.1 Transfusions de produits sanguins et dérivés8

II.3.2 Drogues par voie veineuse ou nasale8

II.3.3 Transmission nosocomiale et accident d'exposition au sang9

II.3.4 Transmission familiale9

III. Virus de l'Hépatite C9

III.1 Taxonomie et description9

III.2 Génome10

III.2.1 Région 5' non codante.....10

III.2.2 Cadre ouverte de lecteur10

III.2.3 Région 3' non codante10

III.3 Variabilité génotypique et leur répartition géographique.....11

III.4 Protéines virales	12
III.4.1 Protéine NS5B.....	12
III.5 Cycle cellulaire et réplication	13
III.5.1 Rôle de NS5B dans le Réplication de l'ARN viral	14
IV. Développement de la Thérapie	15
IV.1 Historique de traitement	15
IV.2 Nouvelles molécules anti-VHC	15
IV.2.1 Antiviraux à action directe	16
IV.2.2 Anti polymérase.....	16
V. Diagnostique de VHC	17
Références bibliographiques	19

Chapitre II : Méthodes de criblage virtuelle *in silico*

I. Introduction	23
II. Docking moléculaire	23
II.1 Définition et principe	23
II.2 Domaines d'application de docking moléculaire	24
II.3 Type de docking	24
II.4 Les étapes de docking moléculaire	25
II.4.1docking	25
II.4.1.1 ligand	25
II.4.1.2 Site actif	26
II.4.2 Scoring	26
II.5 Validation de docking moléculaire.. ..	26
II.6 Interactions ligand-protéine	27
II.7 Limites de docking moléculaire	28
III.Les paramètres de "DRUG-LIKENESS	28
III.1 Règle de LIPINSKI	29
III.2 Règle de VEBER.....	29

IV. ADME	29
IV.1 Paramètres pharmacocinétiques (absorption-distribution-métabolisme – élimination).....	29
Références bibliographique.....	31

Partie pratique

Chapitre III : application, résultats et discussions

I. Introduction	36
II. Matériels utilisés.....	37
II.I Microordinateur,.....	37
II.2 Logiciels	37
II.2.1 MOE 2014	38
II.2.2 ChemDraw ultra 20.0	38
II.2.3 Hyperchem	38
II.3 Banque des données protéiques (PDB).....	39
II.4 Swissadme.....	39
II.5 BIOVIA Discovery Studio Visualizer	39
III. Méthodologie de travail.....	39
III.1 Démarche de docking moléculaire	39
III.1.1 Préparation de l'enzyme.....	40
III.1.2 Détection de la cavité.....	41
III.1.3 Préparation de ligand	43
III.2 Simulation de docking moléculaire	50
III.3 Prédiction des propriétés moléculaires des ligands	50
III.4 Prédiction des propriétés ADME	50
IV. Résultats et discussions... ..	51
IV.I Validation du protocole de criblage virtuel.....	51
IV.2 Résultat de Docking moléculaire	52

IV.3 Les interactions proteine-ligand	53
IV.4 Application des règles de Drug likeness	70
IV.5 Analyse des propriétés ADME.....	71
IV.6 Radar de biodisponibilité.....	73
Références bibliographiques	74
Conclusion	78

Résumé :

NS5B est l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'ARN viral. Elle est indispensable pour que le virus puisse se répliquer et se multiplier dans les cellules infectées. Elle est une ARN-polymérase dépendante de l'ARN.

Ce travail s'inscrit dans la perspective de la conception *in silico* des nouveaux inhibiteurs dérivés de l'indole 6 carboxamide basées sur le docking moléculaire afin de contourner les limites du criblage expérimental dans le cadre de la recherche de nouveaux médicaments contribuant au traitement de l'hépatite C.

Dans cette étude on a utilisé le logiciel MOE pour effectuer un criblage virtuel de 72 composés au niveau du site actif 3SKA, Parmi ces composés, on a identifié neuf molécules présentant une affinité supérieure à celle du composé de référence 053, dont le score était de -7.89 kcal /mol.

L'évaluation des propriétés physicochimiques relevant des règles de Lipinski et de Veber, pharmacocinétiques de ces analogues par les serveurs Swissadme a conduit à la rétention d'un seul inhibiteur L67 présentant théoriquement le meilleur profile ADME.

Ces résultats constituent une base prometteuse pour le développement de nouveaux médicaments contre le virus de l'hépatite C.

Mots clés : NS5B, ARN polymérase, MOE, 3SKA, Lipinski, Veber, Swissadme, ADME.

ABSTRAT:

NS5B is the enzyme that catalyzes the synthesis of viral RNA. It is essential for the virus to replicate and multiply in infected cells. It is an RNA-dependent RNA polymerase.

This work is part of the in-silico design of new indole-6 carboxamide-derivative inhibitors based on molecular docking to overcome the limitations of experimental screening in the search for new drugs contributing to the treatment of hepatitis C.

In this study, MOE software was used to perform a virtual screening of 72 compounds at the 3SKA active site. Among these compounds, nine molecules were identified with a higher affinity than the reference compound 053.whose score was -7.89 kcal/mol.

The evaluation of the physicochemical properties of these analogues, based on Lipinski and Veber rules, and the pharmacokinetics of these analogues by Swissadme servers, led to the selection of one inhibitor L67 theoretically exhibiting the best ADME profile.

These results provide a promising basis for the development of new drugs against the hepatitis C virus.

Keywords: NS5B, RNA polymerase, MOE, 3SKA, Lipinski, Veber, Swissadme, ADME.

Liste des figures :

Figure 01 : Prévalence globale de l'infection par le virus de l'hépatite C et répartition des différents génotypes du VHC à travers le monde.....	8
Figure 02 : structure de virus de l'hepatite C.....	10
Figure 03 : Représentation schématique du génome du VHC.....	11
Figure 04 : Structure de la protéine NS5B du VHC.....	13
Figure 05 : les étapes de Docking moléculaire.	25
Figure 06 : le protocole général de Docking moléculaire	40
Figure 07 : La structure 3D de l'enzyme 3SKA préparé.....	41
Figure 08 : la cavité choisie de 3SKA.....	43
Figure 09 : Superposition de l'053 avec sa meilleure pose obtenue par re-docking et visualisé par BIOVIA Discovery Studio 4.0.....	51
Figure 10 : Interactions entre le ligand de référence et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).....	59
Figure 11 : Interactions entre le ligand 14 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).....	60
Figure 12 : Interactions entre le ligand 24 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).....	61
Figure 13 : Interactions entre le ligand 41 et les résidus de site actif de la protéine (ID :3SKA).....	62
Figure 14 : Interactions entre le ligand 44 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).....	63
Figure 15 : Interactions entre le ligand 49 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).....	64
Figure 16 : Interactions entre le ligand 50 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).....	66
Figure 17 : Interactions entre le ligand 59 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).....	67
Figure 18 : Interactions entre le ligand 67 et les résidus de site actif de la protéine	

(ID : 3SKA).....68

Figure 19 : Interactions entre le ligand 68 et les résidus de site actif de la protéine

(ID : 3SKA).....69

Figure 20 : radar de biodisponibilité pour le composé 67.....74

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Agents antiviraux disponibles ou en cours de développement dans le traitement de l'hépatite C.....	17
Tableau 02 : données cristallographiques de 3SKA.....	40
Tableau 03 : Différentes propriétés de cavité 1 détectée par MOE de 3SKA.....	42
Tableau 04: structures 2D des 72 molécules dérivées de l'indole 6 carboxamide.....	43
Tableau 05 : les valeurs de score et RMSD de l'enzyme 3SKA avec les ligands étudiés.....	52
Tableau 06 : : les interactions entre Les ligands sélectionnés et les résidus du site actif de la protéine (ID : 3SKA).....	53
Tableau 07 : Propriétés physicochimiques des ligands sélectionnés.....	70
Tableau 08 : propriétés pharmacocinétiques des composés sélectionnés	72

Liste des abréviations :

Å : angström.

AAD : antiviraux d'action directe.

ACTN1 : actinine alpha 1.

ADME-T : adsorption distribution métabolisme élimination toxicité.

AES : accidents d'exposition au sang.

AFEF : L'Association Française pour l'Etude du Foie.

ARN : acide ribonucléique.

ATG 5 : autophagy proteine 5.

CR : récepteur de compliment.

Da : Dalton.

INN : inhibiteurs non nucléosidiques.

IN: inhibiteurs nucléosidiques.

INF α : interferon alpha.

IRES: Internal Ribosomal Entry Site.

GI: gastro intestinal.

GGTP: gamma glutamylotranspeptidase.

MOE: Molecular Operating Environment.

PDB: Protein Data Bank.

PDK: pyruvate déshydrogénase kinase.

PTB: poly binding protein.

pegIFN α : peginterféron alfa.

RE : réticulum endothélial

RBV : ribavirine.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

RMSD: root mean squared deviation.

RVS :la réponse virologique soutenue.

PCR : polymérase chaine réaction.

SDF : Structured data file

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise.

SGOT : Sérum glutamique oxaloacétique transaminase.

SGPT: Serum glutamic pyruvic transaminase.

UTR : untranslated transcribed region.

VAP : vascular adhesion proteine.

VHC : virus de l'hépatite C.

VIH : virus de l'immunodéficience humaine.

Introduction générale

Introduction :

Le terme d'hépatite est appliqué à une large catégorie d'entités cliniques et pathologiques, qui résultent de lésions hépatiques d'origine infectieuses (virales et bactérienne) et non infectieuses (alcool, prises de substances illicites, prescriptions médicamenteuses).[1]

Le terme « hépatite virale » doit être réservé aux maladies associées aux virus ayant un véritable hépatotropisme avec, comme symptôme prédominant, une hépatite clinico-biologique. En une vingtaine d'années, les progrès dans la connaissance des hépatites virales ont été considérables. [1]

L'hépatite C représente un véritable problème de santé publique c'est l'inflammation du foie provoquée par le virus de l'hépatite C (VHC).

L'infection par ce virus peut entraîner une maladie aiguë ou chronique et s'apparaissent par des formes bénignes aussi bien que par une maladie grave qui s'installe à vie, comme la cirrhose ou le cancer. Les infections aiguës par le VHC sont habituellement asymptomatiques et ne conduisent pas la plupart du temps à une maladie potentiellement mortelle. Chez environ 30 % (15 % à 45 %) des personnes infectées, le virus est spontanément éliminé dans les six mois qui suivent l'infection, sans aucun traitement. Pour les 70 % restants (55 % à 85 %), l'infection évoluera vers une forme chronique. Chez les malades chroniques, le risque de cirrhose est de 15 % à 30 % dans les 20 ans qui suivent l'infection. 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%.[1]

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. [2]

D'autre part, les mécanismes biologiques sont majoritairement fondés sur des interactions entre les protéines. L'étude détaillée de ces interactions à l'échelle moléculaire est donc d'une importance capitale et peut être réalisée grâce à la cristallographie aux rayons X ou à la résonance magnétique nucléaire (RMN). Malheureusement, ces techniques ne peuvent pas détailler toutes les interactions en raison de l'innombrable diversité de molécules présentes dans une seule cellule. [3]

Dans nos jours, la modélisation moléculaire est devenue une méthode innovante pour comprendre les phénomènes chimiques et constitue désormais un outil indispensable en chimie

structurale, notamment pour le calcul des surfaces d'énergie potentielle des molécules organiques. [4] Elle s'avère souvent nécessaire lorsque les expériences réelles sont trop difficiles, dangereuses, coûteuses, longues, rapides, éthiquement inacceptables, voire impossibles à réaliser. Actuellement, elle permet non seulement d'élaborer les mécanismes de complexation et les profils énergétiques, mais aussi de justifier et de prédire les conformations les plus stables ainsi que les interactions entre une enzyme et un ligand.

Parmi les méthodes les plus couramment utilisées dans le domaine de la modélisation moléculaire est : le docking moléculaire (ou l'amarrage moléculaire) la plus favorable de deux molécules en interaction et formant un complexe stable. [5]

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. [5]

Mon projet de fin d'étude s'inscrit justement dans ce contexte : Il s'agit de contribuer à trouver des nouvelles molécules inhibitrices de la polymérase NS5B en combinant entre deux méthodes à savoir ; docking moléculaire, et propriétés ADME. On s'intéresse à déterminer le mode d'interaction, lors de la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme durant la formation du complexe et puis trouvé la 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 mon travail sera organisé en deux parties :

- Partie théorique : dans laquelle le virus et ses caractéristiques seront décrits afin de définir les cibles thérapeutiques possibles. On décrit ensuite la technique de la modélisation moléculaire utilisée pour l'étude des interactions protéine-ligand.
- Partie pratique : dans laquelle on présente les différents matériels et méthodes utilisés dans cette étude. On y expose également l'essentiel de nos résultats qui seront interprétés et discutés.

Références bibliographiques :

- [1] OMS, 2015, Hépatite C Aide-mémoire N°164 [En ligne]
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/fr/> consulter le 13/04/2016.
- [2] 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.
- [3] Saugues, E, 2011, Synthèse de nouveaux inhibiteurs de kinases Pim et de modulateurs des protéines de la famille des Bcl-2, anticancéreux potentiels (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
- [4] Ittel, S. D., Johnson, L. K., & Brookhart, M, 2000, Late-metal catalysts for ethylene
- [5] homo-and copolymerization. Chemical Reviews, 100(4), 1169-1204.



Partie théorique

Chapitre I
Généralités sur l'Hépatite C et la polymérase
NS5B

I. Introduction :

Le virus de l'hépatite C est un virus hépatotrope, l'infection par ce virus est caractérisée par des niveaux élevés de production et de clairance virales quotidiennes. Et elle évolue dans la plupart des cas vers une infection chronique. La possibilité de guérir une majorité de patients atteints d'hépatite C justifie de renforcer les stratégies de dépistage et d'accès au traitement. Des outils sérologiques et moléculaires sont disponibles pour le dépistage, le diagnostic et la prise en charge thérapeutique de l'infection virale C. [1]

Dans ce chapitre, on va commencer par des notions générales sur l'hépatite C puis on présente la description de polymérase NS5B.

II. L'infection par le virus de l'hépatite C :**II.1 Découverte du l'agent responsable :**

Vers le milieu des années 1975, des tests sérologiques permirent de détecter la présence d'un agent infectieux dans les banques de sang. Les patients, suite aux transfusions sanguines, développaient une sévère maladie chronique inflammatoire du foie. À cette époque, les hépatites A et B avaient été découvertes et des tests avaient été instaurés pour permettre leur détection. Les personnes contaminées répondant négativement à ces Tests étaient alors dites atteintes d'un agent infectieux inconnu causant « l'hépatite post-transfusionnelle non-A non-B ». [2]

En 1989, cette entité pathologique fut rebaptisée l'hépatite C, et son agent étiologique fut appelé Virus de l'Hépatite C (VHC) suite à son isolation et caractérisation par Michael Houghton, Qui-Lim Choo, et George Kuo. Dans la même année, ces chercheurs ont achevé le séquençage complet d'un génome du VHC par des techniques de clonage moléculaire, La découverte du VHC représente la première identification d'un génome viral par l'usage de la biologie moléculaire plutôt que de la microbiologie classique. [3]

II.2 Données épidémiologiques :**II.2.1 Dans le monde :**

L'hépatite C compte aujourd'hui une grande prévalence mondiale et est considérée comme la 7ème cause de mortalité dans le monde. Il y a un peu moins d'une décennie on estimait encore qu'environ 180 millions de personnes étaient infectées dans le monde. Le dernier rapport épidémiologique établi par l'organisation mondiale de la santé estime aujourd'hui une prévalence de 71 millions de personnes infectées soit 1% de la population mondiale (figure1). Bien que le nombre de personnes infectées par le VHC ait globalement baissé ces dix dernières années, l'incidence des complications qui en résulte, dont les cirrhoses et les cancers, risque encore d'augmenter dans la

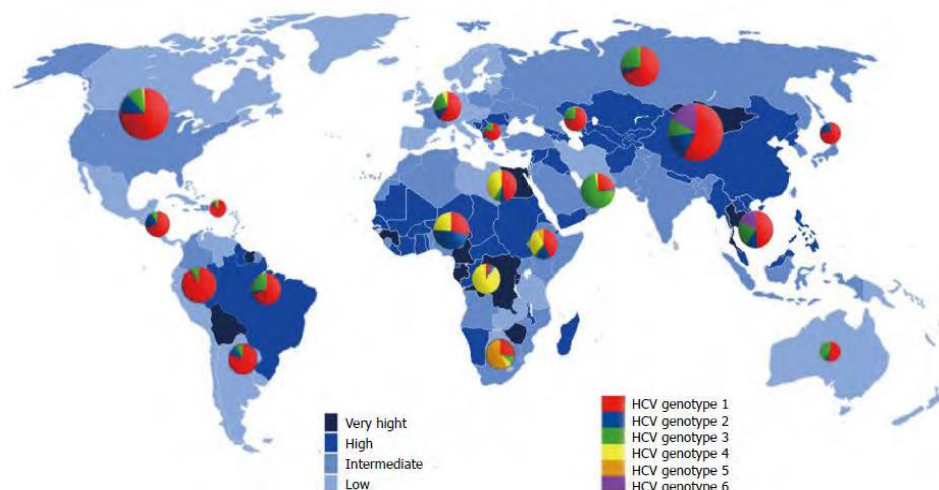
prochaine décennie. Cette chute de prévalence est en partie due à l'augmentation de la mortalité en raison de complications hépatiques liées à l'hépatite C, en Afrique notamment et principalement chez les personnes âgées [4]. L'hépatite C continue donc à être un problème majeur de santé publique avec une prévalence 7 fois supérieure à celle du SIDA et avec un nombre de décès par an estimé à environ 1,3 millions, ce qui est un taux comparable à celui du SIDA et de la tuberculose. Ceci s'explique notamment par le fait que les sujets infectés ne présentent souvent pas des symptômes durant les premières 20 à 30 années d'infection. D'autre part, le système de surveillance de l'infection par le VHC est peu performant et la politique de dépistage systématique a tendance à négliger les populations marginalisées dont font partie les sans-abris, les migrants, les toxicomanes, etc. [4]

La prévalence de l'hépatite C est distribuée de manière hétérogène autour du monde. Une plus grande prévalence est estimée dans la région de la méditerranée orientale (2,3%). Des différences importantes peuvent être notées à l'intérieur d'une même région. Sur le continent africain, l'Afrique de l'Ouest et l'Afrique centrale paraissent être des zones de haute endémicité avec des prévalences supérieures à 8%. Au nord de l'Afrique, la séroprévalence est modérée dans les pays de Maghreb par contre en Égypte, la prévalence du VHC est très forte et parfois supérieure à 15%. [5] dont la majeure cause de transmission de l'infection demeure le mode d'injections insécurisées. En Europe, environ 1,5% de la population, soit 5,6 millions de personnes, seraient chroniquement infectées. Concernant l'Europe, la plus grande prévalence concerne les consommateurs actifs de drogues injectables (la toxicomanie intraveineuse) qui est estimée de 44%. [6] [7]

II.2.2 En Algérie :

L'Algérie, pays considéré comme « émergent » en pleine transition épidémiologique, appartient à la zone de moyenne endémicité. En effet, la prévalence des anticorps anti-VHC est estimée à 1 %. [8]

La bibliographie rapporte une étude régionale, réalisée en 2005, incluant 6 Wilayas de l'est du pays (Batna, Msila, Khenchela, Oum El Bouaghi, Tébessa et Souk Ahras) rapporte une prévalence moyenne de 3,47 % pour l'hépatite C et de 1,57 % pour l'hépatite B. Ces études confirment que l'Algérie, en regard de l'hépatite C, est une zone de moyenne endémie avec une variabilité inter-régional. Aucune différence selon le sexe ou l'âge n'a été observée. [9]



II.3 Modes de transmission du VHC et facteurs de risque :

La contamination a lieu par contact direct entre le sang d'un sujet sain et celui d'un sujet porteur du virus. [11]

II.3.1 Transfusions de produits sanguins et dérivés :

Reconnue comme étant la première cause de contamination de la maladie jusqu'en 1990, la transfusion de produits sanguins et dérivés a fortement contribué à sa diffusion dans la population. En France le nombre de patients contaminés par transfusions sanguines a été estimé entre 100 000 et 400 000. La contamination a pu aussi bien se faire avec des dérivés sanguins stables que des produits labiles. Le risque de transmission était dépendant du nombre de transfusions subies par le patient. Par voie de conséquence, les hémophiles et les thalassémiques ont été des cibles préférentielles de cette dissémination du virus.

II.3.2 Drogues par voie veineuse ou nasale :

Il s'agit la mode de contamination le plus fréquent actuellement. Le VHC possède une grande résistance dans le milieu extérieur et une forte contagiosité par voie sanguine ce qui explique ce phénomène. La transmission se fait par le partage du matériel d'injection intraveineuse. Une nouvelle contamination importante est apparue résultant de l'usage de drogue par voie nasale : le sniffing. Cette pratique nécessite l'usage d'une paille pouvant provoquer des lésions de la muqueuse nasale. Le partage de cette paille alors contaminée est à l'origine de la dissémination du virus dans le groupe d'usagers.

II.3.3 Transmission nosocomiale et accident d'exposition au sang :

Bien moins fréquente aujourd'hui avec l'arrivée du matériel stérile à usage unique, la transmission nosocomiale n'est pas à exclure.

Malheureusement l'ensemble du matériel utilisé ne peut être à usage unique, une contamination peut survenir avec l'utilisation de matériel mal désinfecté, des objets souillés par le patient ou via les mains du personnel soignant porteur du virus.

De nombreux cas d'hépatite C ont également été référencés chez les sujets ayant fait des tatouages ou des piercings en raison d'une mauvaise désinfection du matériel voire de l'absence totale de désinfection dans certains commerces ou les précautions universelles n'étaient pas respectées.

Même s'ils sont rares avec les précautions actuelles prises par le personnel soignant, un accident d'exposition au sang (AES) est une cause possible de contamination via une blessure accidentelle d'un personnel de santé avec du matériel souillé par le sang du patient contaminé.

II.3.4 Transmission familiale :

Elle est possible lorsqu'un des membres de la famille est porteur d'une hépatite C via les objets de toilette personnels (rasoir, coupe-ongles), pouvant potentiellement avoir été en contact avec le sang du sujet porteur du VHC. En ce qui concerne la transmission sexuelle : l'ARN du VHC n'a pas été retrouvé de manière constante dans les sécrétions vaginales et le sperme.

La transmission mère-enfant au cours de la grossesse survient essentiellement au moment de l'accouchement. Bien que ce mode de transmission ait été prouvé, il reste faible. Toutefois le risque peut être multiplié par quatre lors d'une co-infection de la mère par le VIH. Le risque de contamination est d'autant plus grand que la charge virale maternelle est importante et que des instruments ont été utilisés par l'obstétricien pour faciliter le travail.

Dans 20% des cas, le mode de contamination par le VHC reste inconnu.

III. Le virus de l'hépatite C :

III.1 Taxonomie et description :

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae*, caractérisée par la présence d'une enveloppe et d'un génome à acide ribonucléique (ARN) monocaténaire de polarité positive. Il est le principal représentant du genre *Hepacivirus*. [12]

Il s'agit d'un virus de petite taille, la particule virale, sphérique, étant d'un diamètre compris entre 40 et 80 nm. Cette dernière est composée d'une seule copie du génome viral, d'une capside icosaédrique constituée de la protéine de core C et d'une enveloppe phospholipidique d'origine cellulaire dans laquelle sont enchâssées les deux glycoprotéines virales transmembranaires, E1 et E2.[12]

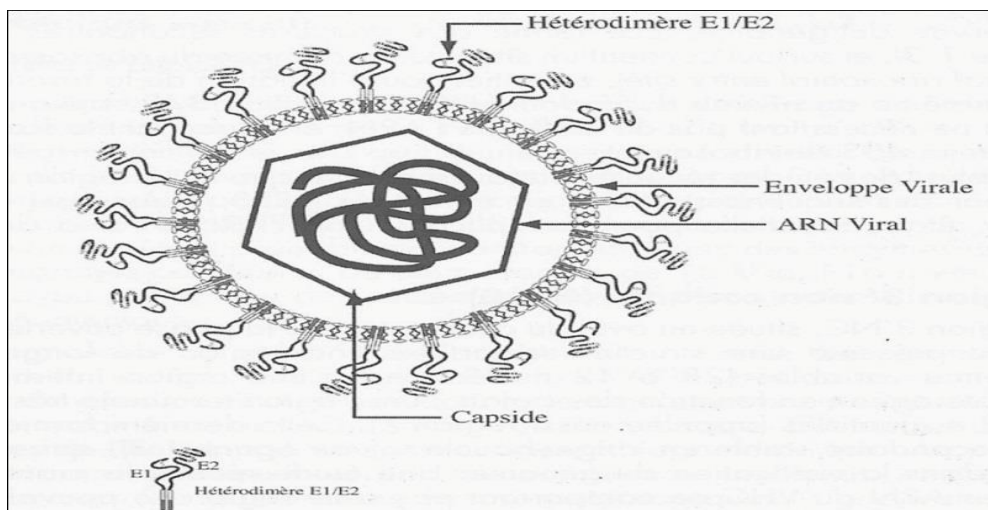


Figure 02 : structure de virus de l'hépatite C. [13]

III.2 Génome :

Le génome du VHC est une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive. Il comporte deux régions non codantes et un cadre de lecture ouvert. [14]

III.2.1 Une région 5' non codante :

Comprenant 341 nucléotides. C'est la région la plus conservée du génome. Elle forme des structures secondaires complexes formées de tiges et de boucles. Cette région comporte un site d'entrée du ribosome (ou IRES pour Internal Ribosomal Entry Site) essentiel pour le phénomène d'initiation de la traduction de la polyprotéine, mais également un signal d'encapsidation indispensable à la formation de la nucléocapside virale. Cette région intervient donc essentiellement dans les étapes de traduction et de réplication du virus.

III.2.2 Un cadre de lecture ouvert :

Unique contenant 9024 à 9111 nucléotides. Il permet la synthèse d'un précurseur polyprotéique clivé ensuite en 10 protéines virales avec de 5' en 3' : les protéines structurales (protéines de capsid C et glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) et les protéines non structurales NS (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B).

III.2.3 Une region 3' non codante :

Composée de : [15]

- Une région non traduite.
- la protéine NS5B (variable).
- une région polyuridylée.

- la région X (très conservée).

Ces deux dernières régions sont impliquées dans le potentiel infectieux du VHC.

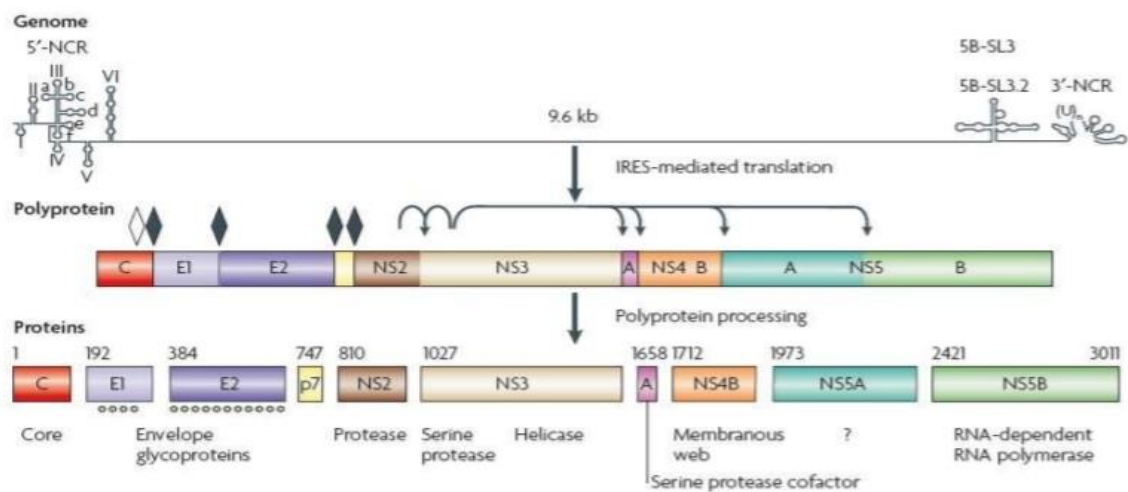


Figure 03 : Représentation schématique du génome du VHC. [14]

III.3 Variabilité Génotypique et leur répartition géographique :

Cette variabilité du VHC a été à l'origine de l'émergence et de la diversification des différents génotypes viraux au cours de l'évolution.

L'analyse phylogénique de séquences de souches virales du VHC isolées au travers des différents continents a permis d'identifier 6 groupes principaux de virus appelés « génotypes », numérotés de 1 à 6 et plus d'une centaine de « sous types », identifiés au sein de chaque génotype par une lettre minuscule (génotype 1a, 1b...).[16]

Les différents génotypes diffèrent les uns des autres par 31 à 34% de leur séquence nucléotidique et environ 30% de leur séquence en acides aminés. Les sous types diffèrent les uns des autres par 20 à 23% de leur séquence nucléotidique, avec des différences importantes selon la région du génome considérée. [17]

La répartition géographique des différents génotypes varie en fonction des continents. Les génotypes 1, 2 et 3 sont ubiquitaires avec des prévalences variables d'une région à l'autre. Le génotype 1 est le génotype le plus fréquemment rencontré à travers le monde. Les sous types 1a et 1b sont majoritairement répandus en Amérique du Nord, au Japon et en Europe, de même que les sous types 2a et 2b. La répartition des génotypes 4, 5 et 6 apparaît restreinte à certaines régions du globe. Le VHC de génotype 4 est fréquemment observé dans le pourtour méditerranéen (notamment Egypte, Moyen-Orient, Afrique du Nord). Le génotype 5 est localisé principalement en Afrique du Sud et le génotype 6 dans les pays d'Asie du Sud-Est. [18]

III.4 Protéines virales :

Le clivage de la polyprotéine précurseur du VHC est assuré de manière co- et post traductionnelle par des protéases virales et cellulaires au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique. Ainsi, la maturation de la polyprotéine aboutit à la production de protéines matures structurales (la protéine core, E1, E2) qui forment la particule virale et les protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) qui interviennent dans la réplication du génome viral et la morphogenèse des particules infectieuses. NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B constituent la réplicase du VHC (unité minimale de réplication) NS2 et p7 ne sont pas essentielles à la réplication mais participent avec les autres protéines virales à l'étape d'assemblage. [19]

III.4.1 Protéine NS5B :

NS5B est une polymérase virale [20] ancrée dans la membrane du RE [21]. Elle est capable de s'associer aux autres protéines non structurales et à certaines protéines cellulaires de l'hôte, pour constituer le complexe de réplication. En effet, elle possède une activité ARN polymérase ARN-dépendante, essentielle à la réplication du génome du VHC [20]. Une hélice α , composée des 21 derniers acides aminés situés en C-terminal, sert d'ancrage dans la membrane du RE. Celle-ci est indispensable pour la réplication. La structure tridimensionnelle de NS5B est agencée en « main droite », composée de trois domaines : des « doigts », un « pouce » et une « paume » [21]. Ces structures enveloppent le site actif, situé à la base de la « paume ». [22]

Il existe d'autres structures particulières, spécifiques de la protéine NS5B du VHC. Tout d'abord, une extension des « doigts » appelée « fingertips », qui permet le repliement des « doigts » et du « pouce » sur la « paume ». [23] Cet agencement va créer un passage à l'intérieur duquel sera dirigé l'ARN viral, au moment de la réplication. [22] Ensuite, une boucle β , localisée dans le « pouce » et orientée vers le site actif, positionne correctement le brin d'ARN matrice et permet ainsi l'initiation de la synthèse. [23] Enfin, en C-terminal, se trouve 40 acides aminés, reliant le « pouce » à une hélice transmembranaire α .

Cette disposition est appelée « connecteur ». Elle joue également un rôle dans la réplication, en favorisant le maintien du « pouce » dans une conformation fermée. [23]

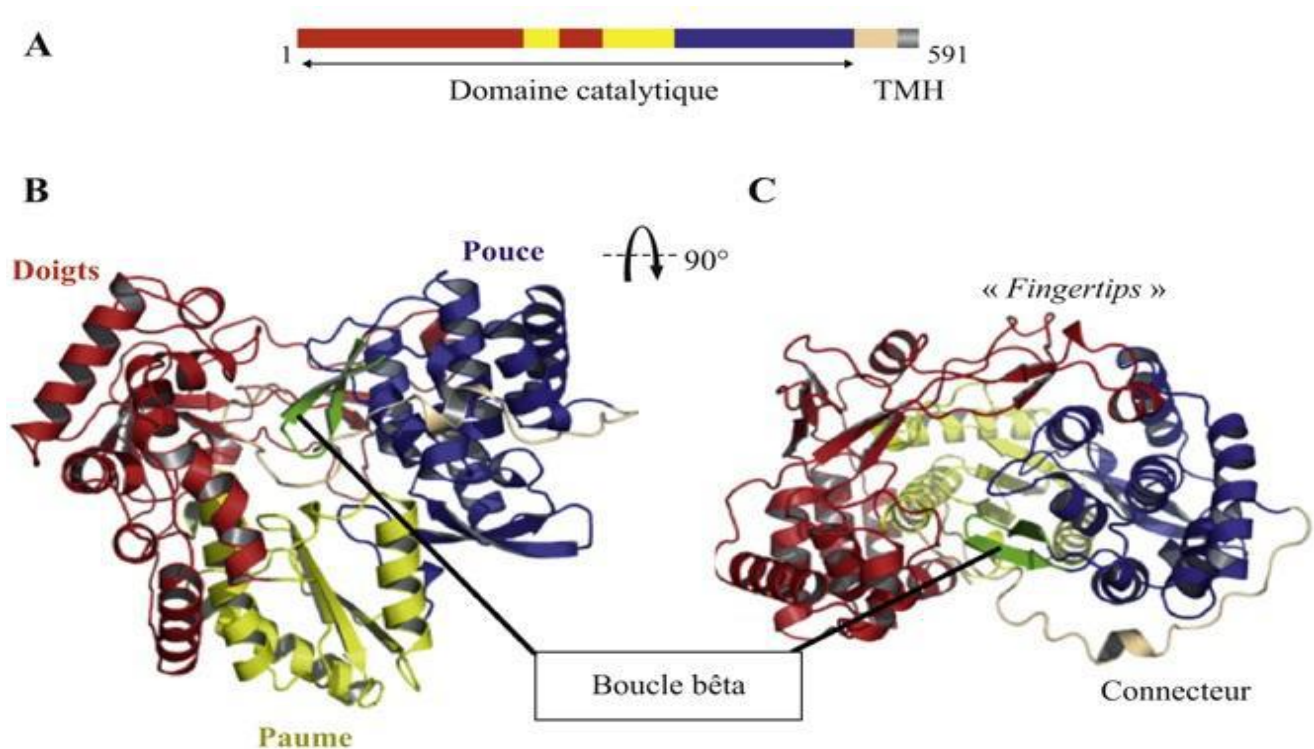


Figure 04 : Structure de la protéine NS5B du VHC. [23]

A = structure primaire B et C = vue en rubans à des orientations séparées par 90°, les couleurs des sous-domaines sont les mêmes que pour la figure A

III.5 Cycle cellulaire et réplication :

Les premières cibles du virus de l'hépatite C sont les hépatocytes. Il pourrait se répliquer aussi dans certaines cellules mononuclées du sang (essentiellement lymphocytes B et monocytes) et dans les cellules dendritiques, mais ceci reste controversé. [25] L'impossibilité de le cultiver *in vitro* a rendu difficile la connaissance de son cycle cellulaire. Celui-ci se déroulerait probablement en six étapes, par analogie au cycle viral des autres *Flaviviridae*. [26] [27]

- Etape 1 : Fixation au récepteur et internalisation dans la cellule cible.
- Etape 2 : Libération des génomes viraux dans le cytoplasme de la cellule cible.
- Etape3 : Synthèse des protéines virales.
- Etape4 : Réplication de l'ARN.
- Etape5 : Formation des particules virales.
- Etape6 : Sécrétion des particules virales.

III.5.1 Rôle de NS5B dans le Réplication de l'ARN viral :

Arrivé à un certain niveau d'expression de gènes viraux, la traduction est ensuite inhibée par un mécanisme encore non déterminé et la réplication du génome viral est initiée, une fois le génome dépourvu de l'ensemble des ribosomes. La réplication a lieu au niveau d'une structure membranaire dérivée du RE, la « membrane web ». L'initiation requiert la fixation d'un complexe de réplication sur l'extrémité 3'UTR de l'ARN, nécessaire comprenant des protéines virales (NS5A et NS5B) associées à certaines protéines cellulaires telles les protéines NFAR qui permet la formation d'un pseudo-nœud et le déclenchement de la réplication. Celles-ci reconnaissent les ARN double brins et interagissent également avec l'extrémité 5'-UTR, permettant ainsi la constitution d'une boucle au niveau de l'ARN, nécessaire à l'initiation de la réplication par les protéines NS5A et NS5B.

La traduction virale tout comme la réplication de l'ARN viral, utilisent comme matrice l'ARN de polarité positive, montrant qu'il existe un processus qui permet de passer d'une étape à l'autre dans le cycle viral. Cependant ce mécanisme n'est toujours pas connu. [28] Après la traduction, les protéines du VHC et certains facteurs cellulaires s'associent au niveau d'un réseau membranaire. Ce dernier est issu d'une accumulation de vésicules membranaires dérivées du RE et de gouttelettes lipidiques. La formation de ce réseau est induite par la protéine non-structurale NS4B en combinaison avec NS5A. Il a été montré que seule une petite fraction des protéines non structurales est associée au réseau membranaire réalisant la réplication. Le reste des protéines pourrait être utilisé pour contrecarrer le système immunitaire ou participer à la formation de virions infectieux. Ainsi, le CR du VHC se forme au niveau du réseau membranaire considéré comme un compartiment. Cette compartimentation permettrait de protéger l'ARN viral contre les défenses cellulaires lors de la réplication. La machinerie de réplication ainsi formée permet de répliquer l'ARN génomique du VHC. La réplication commence par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité négative (ARN (-)) en utilisant le génome viral comme matrice. Ensuite, ce brin négatif sert de matrice pour la synthèse des brins positifs (ARN (+)). Ces deux étapes sont catalysées par l'ARN polymérase ARN dépendante du VHC (NS5B), qui initie la synthèse au niveau du 3'UTR du génome. Les ARN (+) sont transcrits 5 à 10 fois plus que les ARN (-). [29]

D'autres facteurs cellulaires modulent la réplication du VHC. Il y a des protéines du cytosquelette comme l'actine, ACTN1. Un grand nombre de kinases interagissent avec NS5A, telles que PDK-1 ou PI4KIIIa. PI4KIIIa est recrutée au site de réplication via une interaction membranaire avec NS5A et semble contribuer à l'intégrité du CR. Certaines protéines qui se lient directement à NS5A ou NS5B jouent un rôle essentiel dans la réplication. [29]

Les protéines VAP-A et VAP-B localisées dans le RE et au niveau de l'appareil de Golgi en sont deux exemples et seraient impliquées dans la formation du CR fonctionnel. De plus, il a été montré que la cyclophiline A qui interagit directement avec NS5A a un rôle essentiel dans la réplication de l'ARN du VHC. D'autres protéines, comme PTB qui se lie à l'ARN du VHC, participeraient aussi à la réplication virale. Différentes équipes ont aussi rapporté que des protéines impliquées dans l'autophagie telles que Beclin-1 ou ATG5 faciliteraient l'initiation de la réplication de l'ARN du VHC. De plus, ce processus cellulaire pourrait aussi contribuer à l'assemblage des particules virales. [29]

IV Développement de la Thérapie :

IV.1 Historique de traitement :

Depuis la découverte du VHC en **1989**, des progrès considérables ont été réalisés afin d'améliorer l'efficacité du traitement de l'hépatite C, qu'elle soit chronique ou aiguë. Au début des années 90, la thérapie des infections par le VHC reposait sur la monothérapie avec IFN α qui permettait d'obtenir 20% de RVS. En 1998, les travaux de McHutchison et al., et Poynard et al., ont montré que l'utilisation d'une bithérapie associant l'IFN α et la RBV permettait l'augmentation significative du taux de RVS obtenue chez 40% des patients infectés. [30]

En 2001, il a été démontré que l'utilisation de l'IFN α conjugué à du polyéthylène glycol (pegIFN α) était plus efficace que l'IFN α . La bithérapie associant le pegIFN α et la RBV permettait d'avoir une RVS dans 50% des cas. [31] A l'heure actuelle, des nouvelles approches thérapeutiques faisant appel à des AAD ont été développées pour le traitement de l'hépatite C chronique. Ces molécules inhibent certaines des étapes du cycle viral et empêchent la production de particules virales par les hépatocytes infectés.

- Le traitement de l'hépatite C a pour objectif d'éradiquer l'infection virale, de ralentir la fibrose, mais aussi d'empêcher l'installation de la cirrhose et de ses complications comme le CHC. De plus, l'objectif du traitement est d'atteindre la réponse virologique soutenue (RVS) qui est définie par un ARN VHC indétectable 24 semaines après la fin du traitement, dans le cas d'un traitement par peg IFN α -RBV et 12 semaines après la fin du traitement en cas d'utilisation des AAD. [31]

IV.2 Nouvelles molécules anti-VHC :

Bien que la bithérapie par peg IFN α -RBV soit sans aucun doute un progrès important dans le traitement du VHC, les résultats demeurent insatisfaisants, notamment pour les patients infectés par le VHC de génotype 1 peu sensible au traitement. C'est pourquoi la mise à disposition des nouvelles molécules thérapeutiques représente une avancée considérable. Après presque 25 ans d'améliorations

progressives des thérapies à base d'IFN α , d'énormes efforts de recherche et de développement ont produit un grand nombre de nouveaux traitements pour la prise en charge de l'hépatite C, en particulier les traitements à base d'antiviraux à action directe (AAD) qui sont des inhibiteurs spécifiques d'étapes du cycle viral. [32]

IV.2.1 Antiviraux à action directe :

Les AAD déjà sur le marché ou en développement clinique comprennent les inhibiteurs de la maturation de la polyprotéine du VHC (les IP NS3/4A) et les inhibiteurs de la synthèse et de la réplication de l'ARN du VHC (les IN et les INN de la polymérase NS5B et les inhibiteurs de la protéine NS5A). Les deux approches antivirales sont efficacement utilisées pour l'arrêt de la production de virus dans les cellules infectées. L'inhibition de la maturation de la protéine virale inhibe également la réplication car les protéines virales non structurales fonctionnelles ne sont plus produites et ne peuvent donc pas être utilisées pour la formation de complexes de réplication. De même, l'inhibition de la réplication du VHC bloque également la synthèse des protéines virales car la quantité de génomes VHC qui peut être utilisée comme ARN messenger diminue de façon spectaculaire dans les cellules. [33]

IV.2.2 Anti-polymérases :

Concernant la polymérase NS5B, deux types d'inhibiteurs ont été développés présentant différents modes d'action :

- Les IN entrent en compétition avec le substrat naturel pour se lier au site actif de l'ARN polymérase ARN dépendante et ont un effet terminateur de chaîne après incorporation dans l'ARN nouvellement synthétisé.
- Les INN inhibent l'activité enzymatique par fixation à l'un des quatre sites allostériques à la surface de l'enzyme entraînant une altération de la conformation de la polymérase, bloquant sa fonction catalytique et donc la réplication [34]. Les sites de fixation sont situés soit au niveau du « pouce » soit au niveau de la « paume » de la polymérase.
 - Certains inhibiteurs de la polymérase NS5B : Adapté de Pawlotsky, 2014 et de L'Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) l'Avis d'expert n° 6 Juin 2015.

Tableau 01 : Agents antiviraux disponibles ou en cours de développement dans le Traitement de l'hépatite C. [33]

Classe	Génération	Agents
Inhibiteurs nucléosidiques Ou nucléotidiques de la polymérase NS5B	Analogues	Sofosbuvir
	Nucléotidiques	VX-135
	Analogue	Méricitabine
	Nucléosidique	
Inhibiteurs non nucléosidiques de la polymérase NS5B	Inhibiteurs du Domaine du pouce I	BMS-791325
		TMC647055
	Inhibiteurs du Domaine du pouce II	Lomibuvir
		GS-9669
	Inhibiteurs du Domaine de la Paume I	Dasabuvir
		ABT-072

V. Diagnostic de VHC :

L'OMS organise les campagnes de la Journée mondiale contre l'hépatite afin de mieux faire connaître et comprendre l'hépatite virale. À l'occasion de la Journée mondiale contre l'hépatite 2023, l'OMS a mis l'accent sur le thème « Une vie, un foie » pour illustrer l'importance du foie pour une vie saine et la nécessité d'intensifier la prévention, le dépistage et le traitement de l'hépatite virale pour prévenir les maladies du foie et atteindre l'objectif d'élimination de l'hépatite d'ici à 2030.

Nous utilisons les tests susmentionnés pour déterminer si un patient risque de contracter l'hépatite C. [35] Les symptômes de l'infection chronique par le VHC ne reflètent pas l'activité de la maladie, les signes déclarés sont (Fatigue - nausées - anorexie - myalgie - arthralgie - faiblesse - perte de poids). Les symptômes apparaissent généralement une fois que la cirrhose s'est développée.

L'examen physique permet de rechercher des signes de maladie chronique du foie (jaunisse, télangiectasie, gynécomastie, hépatomégalie, splénomégalie, circulation collatérale, ascite ou œdème).

Les Tests biochimiques pour détecter la présence de nécrose hépatique (concentrations de SGOT (Serum glutamic oxaloacetic transaminase) et SGPT (Serum glutamic pyruvic transaminase)) et de cholestase (concentrations de FA, bilirubine, et GGTP (gamma glutamylotranspeptidase)) et évaluer la fonction hépatique (temps de prothrombine, concentrations d'albumine).

Analyse PCR à l'aide de kits commerciaux tels que : [35]

- Quantiplex HCV RNA v 2.0
- Cobas Amplicor HCV Monitor assay.

- LCX ABBOTT point final
- ABI-Prism p-7000 ABBOTT (temps réel)

Si un test est utilisé, il doit être effectué pour surveiller la réponse au traitement.

Références bibliographiques :

- [1] Stéphane Chevaliez, 2019, virus de l'hépatite c (VHC) société française et microbiologique.
- [2] : Feinstone S, Kapikian A, Purcell R et *al.* 1975, Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B, *N Engl J Med.* 292:767-70.).
- [3] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ et *al.* 1989. Isolation of a DNAC clone derivd from a blood-borne non-A, nonBviral hepatitis génome. *Science.* 224;395-362.
- [4] Blach, S., Zeuzem, S., Manns, M., Altraif, I., Duberg, A.-S., Muljono, D.H., Waked, I., Alavian, S.M., Lee, M.-H., Negro, F., et al, 2017, Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2, 161–176.
- [5] Soussan P, 2010, Virus de l'hépatite C. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Biologie clinique ; 90-55.
- [6] Hope, V.D., Eramova, I., Capurro, D., and Donoghoe, M.C. 2014, Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association. *Epidemiol. Infect.* 142, 270–286.
- [7] Papatheodoridis, G.V., Hatzakis, A., Cholongitas, E., Baptista-Leite, R., Baskozos, I., Chhatwal, J., Colombo, M., Cortez-Pinto, H., Craxi, A., Goldberg, D., Hepatitis C: The beginning of the end—key elements for successful European and national strategies to eliminate HCV in Europe. *J. Viral Hepat.* 25, 6–17.
- [8] St Denis, 2007 , INSTITUT NATIONAL DE PREVENTION et D'EDUCATION POUR LA SANTE (INPES). Hépatite C : du dépistage au traitement, questions et réponses à l'usage des patients, p73 .
- [9] : Benbakhti, 2012. 6ème congrès maghrebo-français de médecine interne, 19èmes journées Nationales de médecine interne. Hépatites Virales chroniques B et C. 1-18p.
- [10] Daw, M.A., El-Bouzedi, A.A., Ahmed, M.O., Dau, A.A., Agnan, M.M., and Drah, A.M, 2016, Geographic integration of hepatitis C virus: A global threat. *World J. Virol.* 5, 170–182.
- [11] Apolline Maillard, 2013, Prise en charge actuelle des patients atteints d'hépatite C chronique et perspectives thérapeutiques. *Sciences pharmaceutiques.* Page 25-26.
- [12] Simmonds P, Becher B, Bukh J et al, 2017 ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol*;98(1):2-3.
- [13] Dény p, 2003, virus de l'hepatite c. Elsevier Masson.

- [14] Recommandations HAS. Méthodes d'évaluation de la fibrose hépatique au cours des hépatopathies chroniques [Internet]. 2006. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_476346/methodes-d-evaluation-de-la-fibrose-hepatique-au-cours-des-hepatopathies-chroniques.
- [15] Apolline Maillard, 2013 Prise en charge actuelle des patients atteints d'hépatite C chronique et perspectives thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques.p35 .
- [16] Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al, 2005 Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*; 42(4):962-73.
- [17] Marcellin P, Asselah T, 2008 Hépatites virales. Wolters Kluwer France.
- [18] Gaudy C, Goudeau A.,2005 La diversité du virus de l'hépatite C: méthodes d'étude, implication dans la pathogenèse et la résistance au traitement. *Virologie*. 9:343-355.
- [19] Nadjat Lebsir, 2018 Étude sur l'interaction entre le virus de l'hépatite C et le facteur cellulaire proviral GBF1 Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, Français. NNT : 2018LILUS027 p37.
- [20] J. M. Pawlotsky et D. Dhumeaux,, 2004 « Modèle d'étude du virus de l'hépatite C », dans *Hépatite C*, p. 35-47.
- [21] I. Imbert et al 2004, « Réplication du virus de l'hépatite C : systèmes d'étude, avantages et limites », *Virologie*, vol. 8, no 4, p. 281-295.
- [22] A. Piodi,, 2010 « Caractérisation des déterminants viraux de la stéatose hépatocyttaire induite par le virus de l'hépatite », Paris-Est.
- [23] S. Bressanelli et J. Lescar, 2013 « Les enzymes de réplication/transcription des Flaviviridae », *Virologie*, vol. 17, no 1, p. 17-30.
- [24] Walic M, 2013,« Rôle des lipoprotéines associées au virus de l'hépatite C et des microtubules dans l'entrée du virus dans la cellule et l'établissement de l'infection », Pierre et Marie Curie - Paris VI.
- [25] E. Schvoerer, 2003 « Le virus de l'hépatite C et les cellules du système immunitaire », *Virologie*, vol. 7, no 5, p. 339-351.
- [26] L. Zona, 2013 « L'internalisation du virus de l'hépatite C », *Virologie*, vol. 17, no 6, p. 401-413.
- [27] L. Feneant, 2016, « Nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes d'entrée du virus de l'hépatite C », Lille.

- [28] Suzuki T, Aizaki H, Murakami K et al. 2007. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 42:411-23.
- [29] Bartenschlager R, Frese M et Peitschmann T, 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res.* 63:71-180.
- [30] Mc Hutchison J, Gordon S, Schiff E, Shiffman M, Lee W, Rustgi V et al, 1998 Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*, 339: 1485-1492.
- [31] Lindsay KL, Trépo C, Heintges, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC et al, 2001 A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2a to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*, 34: 395-403.
- [32] Jameleddine Aissa Larousse, 2015 Etude de la variabilité génétique des régions NS3, NS5A et NS5B du virus de l'hépatite C chez des patients Tunisiens non traités. *Immunologie.* Université de Bordeaux; Université de Carthage (Tunisie).
- [33] Troke PJ, Lewis M, Simpson P, Gore K, Hammound J, Craik C et al, 2012 Characterization of resistance to the non-nucleoside NS5B inhibitor Flibuvir in hepatitis C virus infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 56: 1331-1341.
- [34] Pawlotsky JM, 2014, New Hepatitis C therapies: The toolbox, strategies and challenges. *Gastroenterology*, 46: 1176-1192.
- [35] Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F, 2013, The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol*, 11: 482-496.

Chapitre II

Méthodes de criblage virtuelle *in silico*

I. Introduction :

De nos jours, l'industrie pharmaceutique fait appel à des technologies *in silico* pour la recherche en amont, afin d'accélérer le développement et la découverte de molécules thérapeutiques candidat-médicament. Grâce à ces méthodes *in silico*, on peut même prédire la toxicité et l'efficacité de la molécule avant de passer aux essais expérimentaux *in vivo*, donc elles nous permettent d'éliminer en amont des molécules à toxicité élevée, contribuant ainsi à la diminution du nombre d'animaux utilisés et à l'économie du temps. [1]

La modélisation moléculaire est devenue une nouvelle technique de compréhension des phénomènes chimiques et un outil de travail à part entière dans le domaine de la chimie structurale, dans les calculs des surfaces d'énergie potentiel des molécules organique. [2] Elles s'imposent souvent lorsque l'expérience réelle est trop difficile, trop dangereuse, trop coûteuse, trop longue ou trop rapide, éthiquement inacceptable, ou même impossible à réaliser. Elles permettent, actuellement, non seulement d'élaborer les mécanismes de complexations et les profils énergétiques mais également de justifier et prédire les conformations les plus stables ainsi que les interactions existantes entre une enzyme et un ligand. [2]

II. Docking moléculaire :

II.1 Définition et Principe :

Le docking moléculaire est une technique *in silico* utilisée pour prédire la meilleure correspondance entre deux molécules lorsqu'elles sont liées l'une à l'autre afin de générer un complexe stable. L'optimisation de la forme et de l'orientation relative du ligand et de la protéine permet de réduire l'énergie libre totale du système, où une orientation favorite peut être utilisée pour la prédiction de l'affinité de la liaison entre deux molécules à l'aide de fonctions de scoring. [3] [4] Dans ce processus, le ligand est intégré ou docké dans une cible protéique et une fonction de scoring sera appliquée pour estimer la probabilité qu'un ligand se lie à une cible protéique avec une affinité élevée. Les ligands à forte affinité sont appelés "hits".[5] Un docking moléculaire précise doit pouvoir distinguer les sites de liaison et de non-liaison et leurs interactions moléculaires. Les structures cristallographiques à rayons X à haute résolution, les structures RMN ou les structures modélisées par homologie sont nécessaires pour la bonne réalisation du processus de docking. La banque de données des protéines (PDB) contient des milliers de structures de protéines en 3D qui ont été identifiées expérimentalement. [6] Les outils de docking tels qu'Auto-Dock, AutoDock Vina, GOLD, Glide, MOE, ICM et FlexX sont largement utilisés. Cependant, il n'existe pas de logiciel idéal pour tous les systèmes. Les utilisateurs doivent choisir leur logiciel préféré en fonction de la disponibilité,

des besoins et 17 de la capacité de l'ordinateur, et peuvent utiliser plusieurs logiciels pour améliorer la qualité de leur travail. [7]

II.2 Domaines d'application de docking moléculaire :

Les nouveaux candidats médicaments sont souvent dockés contre des cibles protéiques afin d'anticiper l'orientation de leur liaison et de prédire ainsi leur affinité et leur activité. Ainsi, dans le processus de conception et de découverte de nouveaux médicaments, l'amarrage est essentiel. Les interactions résultant de docking moléculaire peuvent conduire à l'activation ou à l'inhibition de la protéine, tandis que la liaison du ligand peut avoir un effet agoniste ou antagoniste. Généralement le docking moléculaire est très utile au criblage virtuel, optimisation des substances actives, aussi pour étudier les interactions protéine- protéine/acide nucléique, les mécanismes des réactions enzymatiques, et le génie protéique...ets. [8]

II.3 Type de docking :

Il existe deux types de classification du docking moléculaire. Le docking peut avoir lieu entre : protéine-protéine, ligand-protéine et protéine-nucléotide. Le docking peut être classé également en docking rigide, flexible et semi-flexible. [9]

– Docking rigide :

Dans le cas des méthodes de docking rigide, la recherche de la pose optimale se limite au positionnement. Cette opération consiste en la recherche exhaustive dans l'espace discrétisé des 6 degrés de liberté. Certains programmes, s'ils n'appartiennent pas à la famille des techniques de docking rigide, utilisent plusieurs étapes successives d'optimisation dont les premières peuvent s'apparenter à du docking rigide. Par exemple, le programme Glide, utilise initialement, dans son approche multi étape, une recherche systématique pour positionner le ligand de façon approchée au sein du site actif de la protéine. [10]

– Docking flexible

Lorsque les méthodes de docking prennent en compte la flexibilité du ligand, deux étapes sont effectuées successivement pendant toute la durée du docking. La première étape correspond à une exploration de l'espace conformationnel de manière à retrouver, parmi les conformations proposées, la conformation bioactive. Pendant la deuxième étape une fonction de score évalue ces conformations. Il existe plusieurs types d'algorithmes pour le traitement de la flexibilité du ligand : les méthodes systématiques (fragmentation/reconstruction), les méthodes aléatoires, et les méthodes de simulation (dynamique moléculaire). [11]

– Docking semi-flexible

Lorsque l'espace conformationnel des ligands est exploré, le nombre de degrés de liberté de l'espace de recherche peut être conséquent dans le cas de molécules très flexibles. Dans un tel contexte, l'emploi de méthodes de recherche exhaustives apparaît souvent inapproprié car nécessitant des simplifications importantes au niveau de l'échantillonnage. D'autres algorithmes, dits de fragmentation, sont employés pour construire de façon incrémentielle le ligand au sein du site actif de la protéine. L'espace des conformations du ligand est alors restreint au voisinage d'un ensemble initial d'états simplifiés. Cette stratégie de recherche par construction, qui se présente sous diverses variantes, est notamment adoptée par les programmes DOCK, FlexX, et Hammer Head. [10]

II.4 Les étapes de docking :

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes complémentaires qui sont respectivement le Docking et le Scoring :

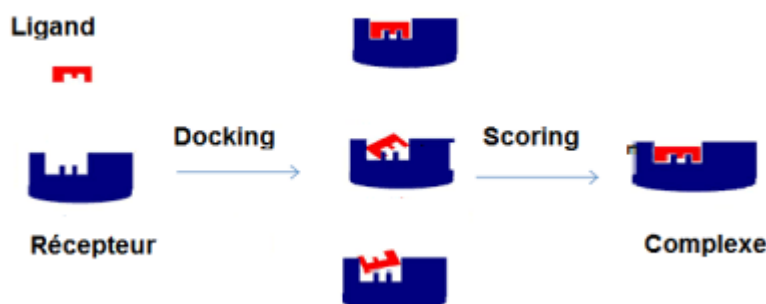


Figure 05 : les étapes de Docking moléculaire. [12]

II.4.1 Le docking :

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

II.4.1.1 Ligand :


Pour déterminer la structure des ligands qui seront utilisées lors de la simulation. Il existe deux grandes bases de données pour cela. La première est constituée de structures générées par des programmes de modélisation moléculaire qui utilisent les lois de la chimie quantique pour optimiser la géométrie des molécules. La seconde est constituée de bases de données publiques

telles que le Pub Chem Project ou la Protein Data Bank (PDB), où les structures sont disponibles sous différents formats tels que le SDF. [13]

II.4.1.2 Site actif :

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif. Schématiquement, il a la forme d'une cavité ou d'un sillon dans lequel vont se fixer les substrats grâce à plusieurs liaisons chimiques. Une fois fixés, les substrats vont réagir et se transformer en produit. Le site actif est subdivisé en deux parties : [14]

- Le site de liaison : qui reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique à l'enzyme.
- Le site catalytique : qui est responsable de la fixation de l'enzyme sur le substrat. Le placement des fragments (atomes) dans le site actif est basé sur le principe de complémentarité stérique et électronique entre ligand et récepteur.

 Le téléchargement des structures chimiques des cibles à traiter, telles que des enzymes, à partir de la banque de données PDB (Protein Data Bank) en utilisant un logiciel approprié. Si la structure n'est pas encore déposée dans la banque de données, la modélisation par homologie peut être utilisée pour construire la structure 3D de la cible souhaitée. Ensuite, il est important de visualiser la structure de la cible et d'identifier les ligands co-cristallisés avec l'enzyme, tels que des molécules d'eau, des ions ou des ligands, en utilisant un logiciel de visualisation. Pour localiser le site actif de l'enzyme, la méthode de détection de cavité, telle que la méthode "knob & Hole", peut être utilisée. [15]

II.4.2 Le scoring :

Le Scoring est une méthode mathématique, utilisée pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison entre deux molécules après avoir été passées par l'étape de docking. [16]

Il est également appliqué pour comparer et classer différentes structures chimiques (appelé enrichissement ou focalisation de la base de données). La fonction de Scoring correspond à l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. Le principe thermodynamique est le suivant : [17]

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéine}}.$$

II.5 Validation de docking moléculaire :

La méthode de docking doit être validée, comme toute autre approche. Le protocole de docking est validé par le re-docking de ligands de référence avec des cibles. [18] ce processus commence après la préparation de la structure tridimensionnelle de la cible moléculaire et avant toutes simulations de

docking moléculaire. Cette opération a pour but de tester si l'algorithme de docking produit une pose correcte et si la fonction de scoring peut l'identifier comme une meilleure pose. [18]

Le RMSD qui compare les coordonnées de la conformation prédite par rapport à la conformation initiale de tous les atomes lourds des deux conformations, est une mesure de validation standard ou commune utilisée par les chercheurs. En général, les valeurs RMSD doivent être inférieures à 2,0 Å. Un écart important indique que le programme de docking n'est pas adapté pour prédire la pose de docking. [19]

II.6 Interactions ligand-protéine :

Les médicaments produisent leur effet en interagissant (de manière covalente ou non covalente) avec leur cible biologique dans le corps. [20] La majorité des médicaments approuvés sont des petites molécules organiques (ligands) qui modifient les processus biochimiques en interagissant avec les protéines. L'élucidation du mécanisme derrière la liaison de petits composés organiques aux protéines est donc très pertinente à la fois pour la découverte de médicaments et pour la compréhension de nombreux processus biochimiques qui dépendent de la liaison d'un ligand à une protéine. [20] Les interactions non covalentes diffèrent des liaisons covalentes en ce qu'aucun électrons n'est partagé entre les atomes participants. Les interactions non covalentes sont donc généralement plus faibles que les liaisons covalentes. Ils sont néanmoins spécifiques, attractifs et surtout réversibles et peuvent être formés et rompus sans être associés à un coût énergétique important. [20] Les interactions non covalentes jouent un rôle clé dans les systèmes biologiques en ayant un impact sur la structure, la dynamique et la fonction des biomolécules. En outre, elles influencent également les propriétés physico-chimiques et les paramètres pharmacocinétiques de molécules telles que la solubilité, la distribution et la perméabilité, qui sont fortement des paramètres importants dans le développement de médicaments. Dans un complexe protéine-ligand, des interactions non covalentes peuvent être formées à la fois par voie intramoléculaire entre les acides aminés de la protéine et par voie intermoléculaire entre la protéine et le ligand.

- **Liaison Hydrogène :**

Les liaisons hydrogène sont une classe largement étudiée d'interactions non covalentes qui est très importante dans les protéines et les complexes protéine-ligand. La liaison hydrogène est une interaction intéressante entre un hydrogène lié à un atome plus électronégatif que H (donneur) et un second atome électronégatif (accepteur). Les liaisons hydrogène ont des préférences géométriques claires (c'est-à-dire qu'elles sont directionnelles), où la force de l'interaction est affectée à la fois par l'angle et la distance entre le donneur et l'accepteur. De plus, les liaisons hydrogène se renforcent souvent mutuellement de manière coopérative positive. Les forces qui contribuent à l'énergie

d'interaction dans une liaison hydrogène comprennent l'électrostatique, l'induction et la dispersion. [20] Les liaisons hydrogène peuvent être classées comme « classiques » ou « non classiques » selon les groupes donneurs et accepteurs participants.

- **Les interactions électrostatiques :**

Certains acides aminés peuvent porter une charge positive ou négative, engendrant ainsi des interactions électrostatiques. Ces interactions électrostatiques opèrent à des distances relativement longues, (environ 10 Å) entre des groupes d'atomes porteurs de charges électriques. [21]

- **Les interactions de Van Der Waals :**

Les interactions de Van Der Waals sont des interactions faibles entre atomes ou molécules, qui résultent de l'interaction entre les charges électriques fluctuantes autour des noyaux atomiques. Ces interactions sont de courte portée et ne concernent que les atomes de surface. Elles sont nombreuses et jouent un rôle important dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice lors du docking moléculaire.

Les interactions hydrophobes : Les interactions hydrophobes résultent de l'aversion des acides aminés hydrophobes et apolaires pour les molécules d'eau, qui ont tendance à s'associer entre elles. Dans la structure des protéines, ces acides aminés se regroupent pour former des zones hydrophobes où les molécules d'eau ne peuvent pas établir de liaisons hydrogène avec les radicaux d'acides aminés. Ces interactions sont importantes pour la stabilité et la conformation des protéines, ainsi que pour la reconnaissance entre les protéines et les ligands. [21]

II.7 Limites de docking moléculaire :

La littérature sur le docking montre un développement mature, mais des défis importants subsistent. Les programmes d'amarrage progressent, mais la flexibilité et la réussite de la scoring ne sont pas parfaites. Le choix du meilleur programme pour des besoins et des résultats spécifiques est un défi. Contrairement à la flexibilité des ligands, la flexibilité des protéines en est à ses débuts et doit être améliorée. De nombreuses études ont montré que les programmes de docking existants, qui ont été développés pour les protéines, se heurtent à des difficultés lorsqu'ils sont utilisés directement pour les acides nucléiques en raison de différences biochimiques et physiques majeures au niveau des charges, des cavités de fixation et de la solvation. [22]

III. Les paramètres de Drug likeness :

Les règles drug likeness ce sont des critères de filtrage, la plupart du temps basés sur des propriétés physico-chimiques. Dans les années 1990, l'échec des candidats médicaments lors des phases cliniques était principalement imputable à de mauvaises performances pharmacocinétiques et de

biodisponibilité. [23] Il est alors apparu nécessaire de prendre en compte ces critères dès les phases précoces de R&D (Research and Development) pour tenter de diminuer le taux d'échec des candidats-médicaments. Nous avons utilisé ces règles pour tester et voir si les molécules conçues possèdent des caractères susceptibles de faire d'elles des médicaments « Drug-likeness ». [23]

III.1 Règle de LIPINSKI (règle des 5) :

Une molécule candidat-médicament doit pouvoir survivre dans l'organisme humain suffisamment longtemps pour pouvoir exercer cette activité biologique. Les propriétés d'ADME de ces molécules se vérifient lors de la première phase clinique, c'est-à-dire chez le sujet sain. [24]

- le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da),
- le logarithme décimal du coefficient de partage eau / 1-octanol, noté logP, doit être inférieur à 5.
- le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 5.
- le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 10.

Les composés dont les propriétés physico-chimiques ne respectent pas au moins 2 règles sont les plus susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméation.

III.2 La règle de Veber :

La règle de Veber est une règle empirique qui vise à prédire la biodisponibilité orale d'un médicament. Selon cette règle, un composé doit avoir moins de 10 liaisons rotatives et moins de 10 liaisons doubles aromatiques pour être considéré comme ayant une bonne biodisponibilité. Cette règle a été proposée à la suite d'une étude statistique portant sur les données de biodisponibilité de plus de 9000 composés pharmaceutiques. Les composés qui respectent cette règle ont tendance à être plus biodisponibles que ceux qui ne la respectent pas. [25]

IV. ADME :

Les paramètres ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) associés à la pharmacocinétique sont les paramètres clés à optimiser afin d'augmenter la possibilité pour une molécule de devenir un médicament approuvé. Un bon candidat médicament doit être rapidement et complètement absorbé par voie gastro-intestinale, distribué spécifiquement vers son site d'action dans le corps, métabolisé d'une manière à ne pas altérer les fonctions de l'organisme, et éliminé de manière appropriée sans causer des dommages. [26]

C'est pourquoi il nous a été extrêmement important d'inclure le profil ADME de chaque pharmacophore pour pouvoir décrire le comportement des molécules au sein du corps humain.

- L'absorption implique le déplacement du médicament du lieu d'administration vers la circulation sanguine générale pour exercer ses effets thérapeutiques. [27] Les paramètres qui influent sur cette absorption sont principalement liés aux caractéristiques physico-chimiques de la molécule, notamment sa taille, sa solubilité dans les lipides, son degré d'ionisation, sa formulation, sa composition chimique, son effet pharmacologique, sa dose et sa concentration, le débit sanguin, le site d'absorption et la voie d'administration. [28]
- La distribution de médicaments dans le corps fait référence à la façon dont les médicaments se déplacent à travers le système circulatoire et atteignent les tissus cibles où il exerce son effet thérapeutique. Ce processus est influencé par divers facteurs tels que la solubilité du médicament, l'affinité du médicament pour les tissus, la liaison aux protéines et le flux sanguin (perfusion). [29]
- Le métabolisme des substrats se déroule principalement dans le foie, puis dans les reins, les poumons, la peau et le tractus gastro-intestinal. Ce processus implique des enzymes qui altèrent le substrat au niveau cellulaire. [29]
- L'élimination d'un substrat du corps se fait de deux manières : soit par l'excrétion du médicament non métabolisé sous sa forme intacte, soit par une biotransformation métabolique suivie d'excrétion. Les reins jouent un rôle principal dans l'excrétion, tandis que le foie est le principal site de biotransformation. [30]

Références bibliographiques :

- [1] Us preventive services task force, 2004 Screening for hepatitis C virus infection in adults: recommendation statement. *AnnIntern Med* ; 140: 462.
- [2] Ittel, Steven D., Lynda K. Johnson, and Maurice Brookhart. 2000, "Late-metal catalysts for ethylene homo-and copolymerization." *Chemical Reviews* 100.4: 1169-1204.
- [3] D. Kumar, D. Purohit, and P. Pandey, 2019, "MOLECULAR DOCKING AND ITS APPLICATION TOWARDS MODERN DRUG DISCOVERY," *WORLD J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 6, pp. 691–696.
- [4] K. Raval and T. Ganatra, 2022, "Basics, types and applications of molecular docking: A review," *31 IP Int. J. Compr. Adv. Pharmacol.*, vol. 7, no. 1, pp. 12–16.
- [5] M. Aminpour, C. Montemagno, and J. A. Tuszynski, 2019, "An overview of molecular modeling for drug discovery with specific illustrative examples of applications," *Molecules*, vol. 24, no. 9, p. 1693.
- [6] T. I. Adelusi et al., 2022, "Molecular modeling in drug discovery," *Informatics Med. Unlocked*, vol. 29, p. 100880.
- [7] M. T. Muhammed and E. Aki-Yalcin, 2024, "Molecular Docking: Principles, Advances, and its Applications in Drug Discovery," *Lett. Drug Des. Discov.*, vol. 21, no. 3, pp. 480–495.
- [8] K. K. Chaudhary and N. Mishra, 2016, "A review on molecular docking: novel tool for drug discovery," *Databases*, vol. 3, no. 4, p. 1029.
- [9] Ccgi, M, 2016, Molecular operating environment (MOE), 2013.08. Chemical Computing Group Inc., Montreal, 354.
- [10] Merzoug, Amina, and Abdelouahab Chikhi, 2018 "Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition du peptide déformylase. " *Diss. Université Frères Mentouri-Constantine* 1.
- [11] Oussoire, Kada., 2022 "Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs pour le traitement de tuberculose. " *Diss. Université ibn khaldoun-tiaret*.
- [12] Zerdaoui S., Bounasla S, 2020, Docking moléculaire de deux flavones naturels contre l'acétylcholinestérase et le butylcholinestérase. *Mémoire de master d'université : Chimie. M'sila: Université Mohamed Boudiaf. Algérie*, p42.
- [13] Thomsen R, Christensen MH, 2006, MolDock. A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J Med Chem*.

- [14] Mme Laouar Iman, 2014-2015, Etude des interactions enzyme-ligand, cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.
- [15] 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.
- [16] Louacheni C., Planck, L., & Israel M, 2007, Les loisirs devant écran des jeunes. Usages et mésusages d'internet, des consoles vidéo et de la télévision. *Psychotropes*, 13(3), 153.
- [17] Kollman P. A., Massova I., Reyes C., KUHN B.&CHEATHAM E. T,2000, Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of chemical research*, 33(12), 889-897).
- [18] M. T. Muhammed and E. Aki-Yalcin, 2024, "Molecular Docking: Principles, Advances, and its Applications in Drug Discovery," *Lett. Drug Des. Discov.*, vol. 21, no. 3, pp. 480–495.
- [19] F. D. Prieto-Martínez, M. Arciniega, and J. L. Medina-Franco, 2018 "Molecular docking: current advances and challenges," *TIP. Rev. Espec. en ciencias químico-biológicas*, vol. 21.
- [20] Berg, L, 2017, Thèse « Exploring non-covalent interactions between drug-like molecules and the protein acetylcholinesterase », Université of Sweden.
- [21] Salpin, F, 2008, Laine et colorants: fixation, quantification et vieillissement: étude par spectrométrie Raman Doctoral dissertation, Paris 6.
- [22] R. Madan, K. Pandit, H. Kumar, N. Kumari, and S. Singh, 2020, "Principles and aspects of molecular docking: A bird's eye view," *Hans Shodh Sudha*, vol. 1, no. 1, pp. 110–121.
- [23] Zarghi, A.; Arfaei, S. J,2011 , *Pharmaceutical Research. Iranian.*, 10, 655-683.
- [24] Lipinski C , Lambardo A.F , Domoni B. W, Feney P. J.1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and devoloppement settings. *Advenced Drug Delivery Reviews*; 23: 3-25.
- [25] Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D, 2002, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*.

- [26] Mangeolle, M, 2018 Thèse « Intérêt des anti-inflammatoires naturels dans les douleurs inflammatoires liées à la pratique sportive, conseils à l'officine », Université Grenoble Alpes.
- [27] Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J, 2007, Rang and Dale's pharmacology (th ed). Churchill Livingstone.
- [28] Gm, C, 2018, Pharmacology, Part 1: Introduction to Pharmacology and Pharmacodynamics. Journal of Nuclear Medicine Technology, 46(2). <https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199588>.
- [29] David E. Golan, et al, 2012, Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy, 3e | Medical Education | Health Library. <https://meded.lwwhealthlibrary.com/book.aspx?bookid=817>
- [30] Garza, A. Z., Park, S. B., &Kocz, R, 2023,Drug Elimination. In StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547662>.



Partie pratique

Chapitre III

Application, résultats et discussions

I. Introduction :

De nos jours, les chimistes médicaux trouvent de plus en plus de facilité dans le développement de nouveaux médicaments. Ils utilisent une modélisation moléculaire qui combine différentes techniques de calcul théorique utilisées dans différents domaines comme la chimie, la biologie, la pharmacie et la médecine. [1] Il permet de visualiser graphiquement la géométrie et la configuration atomique d'une molécule, ainsi que d'évaluer ses propriétés physiques et chimiques. [2]

De plus, la recherche de nouveaux médicaments capables d'activer ou d'inhiber l'activité biologique des protéines nécessite une prédiction précise de leurs affinités respectives. À cette fin, diverses techniques de modélisation moléculaire ont été développées, comprenant notamment le docking moléculaire et l'évaluation des propriétés ADME. [2]

Le docking moléculaire cherche à anticiper la formation de complexes moléculaires à partir de molécules individuelles. Cette approche est à la fois plus pratique, économique et rapide que l'utilisation de méthodes expérimentales *in vitro*. Ainsi, elle offre la possibilité d'influer sur le mécanisme auquel la protéine étudiée participe. [3]

- Ce travail consiste à étudier les interactions entre une série de 72 composés avec le Site actif de 3SKA par le docking moléculaire en utilisant le logiciel MOE. Ensuite, les meilleurs ligands obtenus par cette méthode (docking moléculaire) sont soumis à l'étude par les règles de drug likeness et les propriétés ADME.
- Au niveau de ce chapitre, on va présenter la discussion des résultats obtenus au cours de cette étude, en basant sur deux paramètres : l'énergie (Score) et les distances des interactions existantes entre certains groupements de la chaîne latérale de l'enzyme (résidus de site actif) et les ligands étudiés.

II. Matériels utilisés :

II.1 Microordinateur :

On a utilisé un ordinateur portable puissant (Toshiba DESKTOP-VNG8HOJ) exécutant le Windows 10 Professional, qui intègre un processeur Intel(R) Core (TM) i3-5005U CPU @ 2.00GHz 2.00 GHz avec une mémoire (RAM) de 12, 0 Go. Tous les logiciels utilisés sont installés sous le Système d'exploitation 64 bits, processeur x64.

II.2 Logiciels :

Un logiciel est un ensemble de programmes qui permet à un ordinateur ou à un système informatique d'assurer une tâche ou une fonction en particulier, procédés et règles, et éventuellement de la documentation, relatifs au fonctionnement d'un ensemble de traitement des données (Par opposition au matériel). Un programme de docking moléculaire a pour but de prédire correctement le mode d'interaction entre deux entités chimiques, et de reconnaître parmi ceux –ci lequel est le meilleur. [4]

Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée. [5]

✚ Dans le domaine de Docking moléculaire, plusieurs logiciels ont été utilisés pour étudier les différentes interactions et les conformations les plus favorables du ligand au sein de son récepteur. [6] Actuellement, un grand nombre de logiciels de Docking moléculaire sont disponibles tels que : GOLD, AUTODOCK, AUTODOCK VINA, FLEXX, SURFLEX, MOLEGRO VIRTUAL DOCKER, UCSF CHIMERA.

✚ Les docking effectués dans cette étude ont été assistés par le logiciel MOE. Mon choix a porté sur ce logiciel pour les nombreux avantages qu'il présente :

- Interface simplifiée pour la conception de ligand
- Détection et analyse de sites actifs
- Visualisation des interactions
- Conception interactive de ligand dans la poche
- Diagrammes d'interaction protéine-ligand
- Préparation automatisée des structures protéine et ligand et calcul de l'énergie libre. [7]

II.2.1 MOE 2014 :

Molecular Operating Environment (MOE) : il est utilisé Pour les études d'amarrage moléculaire (Docking moléculaire), il a été utilisé par les biologistes et les chimistes dans les domaines de la recherche en pharmacologie et en biotechnologie. MOE est une plate-forme qui comprend plusieurs applications, visualisation, modélisation et simulation, et développement de méthodes, le tout dans un seul package. Donc c'est un package c'est-à-dire un ensemble de plusieurs logiciels destinés à la découverte et à la conception assistée par ordinateur de molécules biologiquement actives. Celui-ci permet d'effectuer plusieurs tâches pendant un temps très réduit. Il permet de dessiner les molécules, et les minimiser pour avoir les meilleures conformations de ces molécules. Il permet également de docker plusieurs ligands rassemblés dans une base de données dans le site actif d'une protéine de manière successive.

MOE présente une forme de docking flexible dans lequel le récepteur et le ligand change de conformation et s'adaptent à l'environnement. Il est également possible de représenter l'enzyme et son ligand co-cristallisateur. [8]

II.2.2 ChemDraw Ultra 20.0:

ChemDraw Ultra est un logiciel développé en 2003 par Cambridge Soft, Cambridge. Ce logiciel permet à l'utilisateur de créer des modèles tridimensionnels, de visualiser, d'analyser et déterminer les propriétés des molécules. C'est un logiciel exhaustif qui offre à l'utilisateur un outil exceptionnel de modélisation et une interface intuitive et facile à utiliser.

Il est destiné aux chimistes et biologistes, intégrant toute une gamme d'outils intelligents permettant de faciliter les travaux des chercheurs au quotidien. En plus des fonctionnalités de ChemDraw Prime, il inclut de nombreux outils innovants tels que la prévision RMN ou la fonction nom=structure. [9]

II.2.3 Hyperchem :

HyperChem Est un environnement de modélisation moléculaire sophistiqué reconnu pour sa qualité, sa flexibilité et sa facilité d'utilisation. Alliant visualisation et animation 3D aux calculs chimiques quantiques, à la mécanique moléculaire la dynamique, HyperChem met plus d'outils de modélisation moléculaire à portée de main que tout autre programme Windows. [10]

II.3 La banque de données protéiques (PDB) :

La Protein Data Bank (PDB) est une base de données qui stocke des informations structurales tridimensionnelles pour les grandes molécules biologiques notamment les protéines et les acides nucléiques. Les données, qui sont souvent produites par cristallographie aux rayons X ou la résonance magnétique nucléaire RMN et fournies par les biologistes et les biochimistes de partout dans le monde, elle est disponible gratuitement sur le Web (<http://www.pdb.org/>). PDB est vue par une organisation appelée "Worldwide Protein Data Bank. [11] Chaque entrée PDB contient diverses informations relatives à la protéine en question (nom du récepteur, Auteur, méthode expérimentale, etc.) On y trouve également des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes (ligands, métaux, résidus modifiés, etc.), la structure secondaire, et les coordonnées spatiales atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée. [12]

II.4 Swissadme :

Ce serveur nous a aidé à calculer les propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques de nos molécules ainsi que de prédire les paramètres ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion), la nature médicamenteuse et la convivialité de la chimie médicinale d'une ou plusieurs petites molécules pour soutenir la découverte de médicaments. [13]

II.5 BIOVIA Discovery Studio Visualizer :

Est une suite logicielle complète pour l'analyse et la modélisation de structures moléculaires, de séquences et d'autres données pertinentes pour les chercheurs en sciences de la vie. Le produit comprend des fonctionnalités d'affichage et de modification des données ainsi que des outils permettant d'effectuer une analyse de base des données. Ce programme était utile dans la modélisation des interactions générées entre l'enzyme et les inhibiteurs prédits. [14]

III.Méthodologie de travail :**III.1 La démarche de Docking :**

L'étude portera sur l'interaction entre le site actif de l'enzyme ADN polymérase NS5B et les ligands pour former un complexe stable cette étude est réalisée à l'aide du logiciel « MOE ». Alors on a schématisé un protocole général de Docking moléculaire :

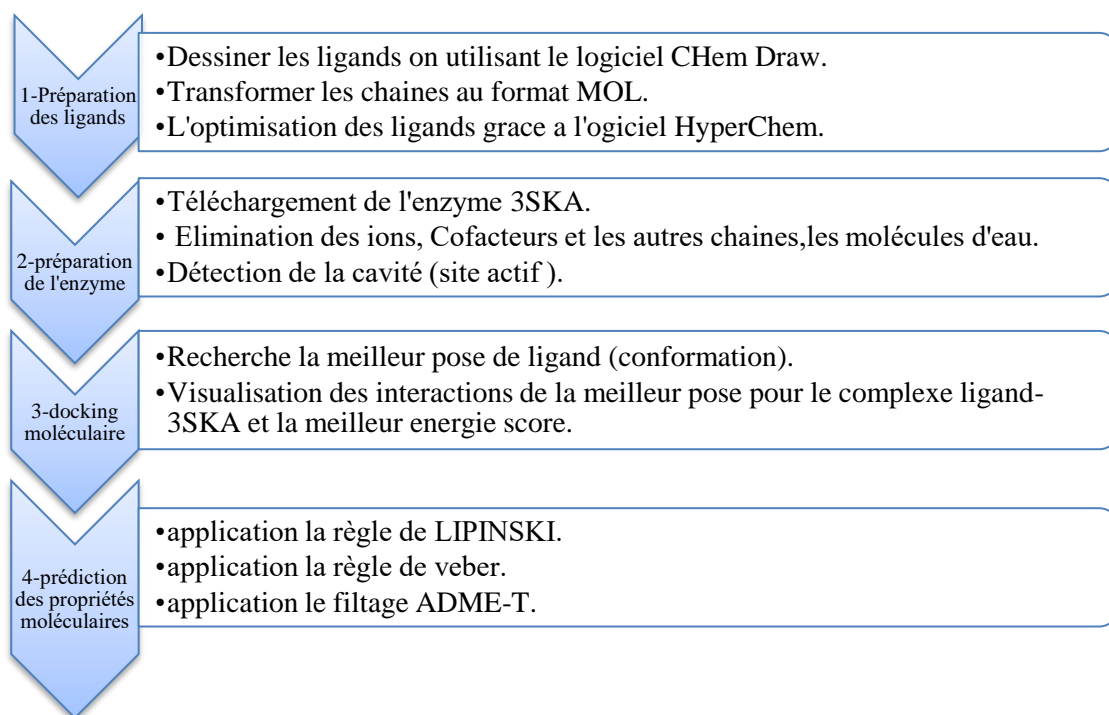


Figure 06 : le protocole général de Docking moléculaire.

III.1.1 Préparation de l'enzyme :

Les données de la co-cristallisation de l'enzyme sont résumées dans le **tableau 02**.

Tableau 02 : Données cristallographiques de 3SKA.

Enzyme	Inhibiteur de co-cristallisation (053)	Classification	Polymère	Chaine	Résolution
3SKA					

La **PDB** contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayon X), soit par RMN.

- ❖ La structure tridimensionnelle (3D) de la protéine a été obtenue par diffraction aux rayons X à une résolution (1.73 Å) le récepteur de l'3SKA est co cristallisé avec l'inhibiteur **1-[(2-aminopyridin-4-yl) methyl] -3-(2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl) -5-(trifluoromethyl) -1H-indole-2-carboxylic acid** de formule brute $C_{21} H_{15} F_3 N_4 O_3$.
- ❖ Lors de la préparation de l'enzyme, On a éliminé la chaîne A et les molécules d'eau, les cofacteurs pour obtenir un modèle simple de l'enzyme en utilisant la fonction " SEQ " qui fournit par MOE. et puis on a optimisé le récepteur à l'aide de MOE et minimisé son énergie de manière à avoir la meilleure conformation.

La structure 3D de l'enzyme 3SKA préparé est donnée dans la figure suivante (**Figure 07**) :

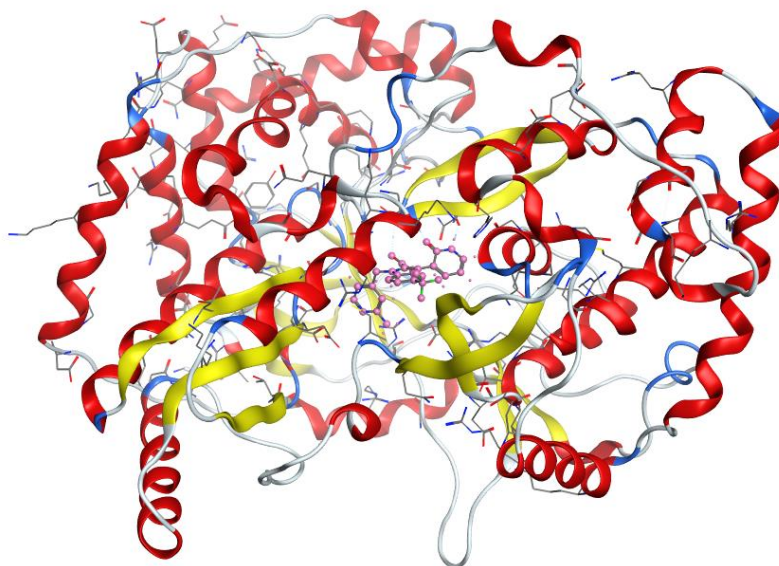


Figure 07 : La structure 3D de l'enzyme 3SKA préparé.

III.1.2 Détection de cavité :

Se trouve une région particulière dans l'enzyme appelée site actif. Il s'agit d'une région bien déterminée qui joue un rôle direct dans l'activité enzymatique. Le site actif est constitué d'un petit nombre d'acides aminés qui le plus souvent ne se suivent pas dans la séquence polypeptidique. Cependant, le repliement de la protéine rapproche les chaînes latérales de ces acides aminés pour former une cavité qui renferme d'une part, le site de reconnaissance du substrat et d'autre part, le site catalytique où le substrat est transformé en produit(s) par réaction chimique. La spécificité de

reconnaissance entre l'enzyme et le substrat et la réaction enzymatique sont basées sur des interactions entre les groupements chimiques des deux partenaires. Il s'établit principalement des liaisons non covalentes de types hydrogènes, électrostatiques ou hydrophobes, mais parfois aussi des liaisons covalentes. Le site actif est constitué de deux parties :

- Site de reconnaissance (ou site de liaison au substrat), permettant de fixer le substrat grâce à certains acides aminés.
- Site catalytique (ou a lieu la transformation du substrat), permettant de transformer le substrat grâce à des acides aminés qui interagissent avec le substrat.

Dans notre étude **25 cavités** ont été détectées dans l'enzyme 3SKA par le logiciel MOE. On a choisi la cavité **01** pour faire notre calcul de Docking car elle présente le plus grand volume et contient le ligand qui co-cristallisé le 3SKA et possède des caractéristiques intéressantes et pertinence pour notre objectif de recherche.

La cavité sélectionnée N°**01** pour notre étude est illustrée dans le tableau est obtenus en utilisant la fonction « site Finder » qui est formé par MOE.

Tableau 03 : Différentes propriétés de cavité 01 détectée par MOE de 3SKA.

Cavité	Taille ^a	PLB ^b	HyD ^c	Side	Résidus
1	525	4.81	120	246	1TYR4 ALA39 ARG48 LYS51 VAL52 PRO93 HIS95 SER96 ALA97 ALA140 LYS141 SER142 GLU143 VAL144 PHE145 LYS155 PRO156 ARG158 LEU159 ILE160 PHE162 ARG168 GLU171 LYS172 PHE193 PRO197 ARG200 GLY216 PHE217 SER218 TYR219 ASP220 THR221 ARG222 CYS223 PHE224 ASP225 SER226 CYS279 ARG280 SER282 GLY283 VAL284 LEU285 THR287 SER288 ASN291 ASN316 GLY317 ASP318 ASP319 LEU320 VAL321 PRO350 GLY351 ASP352 PRO353 PRO354 GLN355 GLU357 LEU362 ILE363 THR364 SER365 CYS366 SER367 SER368 LEU384 ARG386 THR390 ARG394 TRP397 GLU398 THR403 PRO404 ILE405 ASN406 SER407 GLY410 ASN411 MET414 TYR415 CYS445 GLN446 ILE447

					TYR448 GLY449 ALA450 CYS451 TYR555 SER556 GLY557 GLY558 ASP559 ILE560
--	--	--	--	--	--

- Dans la figure suivante on a représenté la cavité sélectionnée pour l'étude de 3SKA :

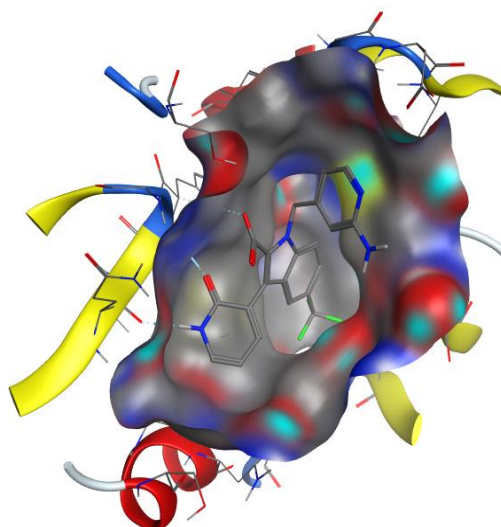
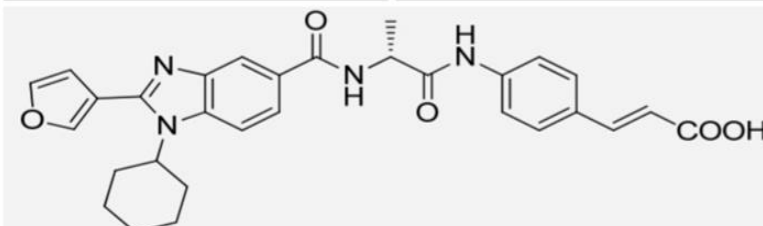
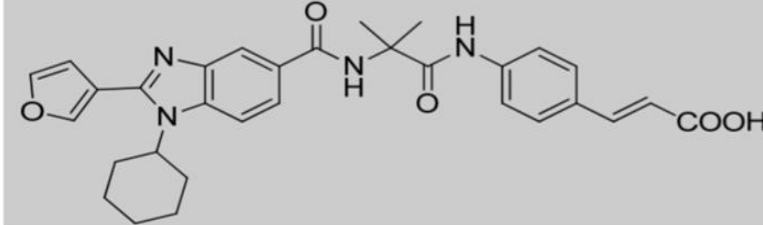
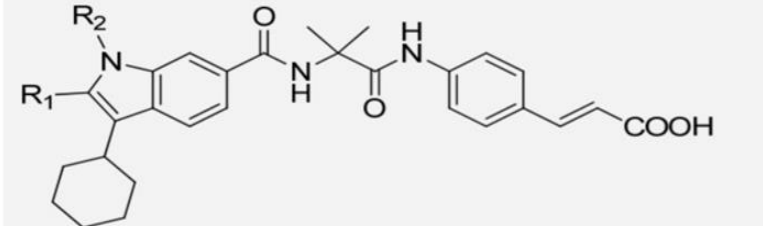
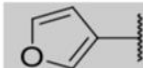
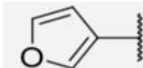

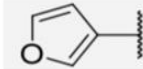
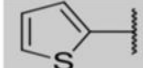
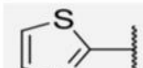
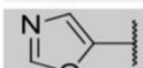
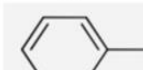

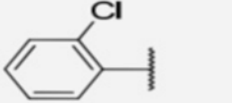
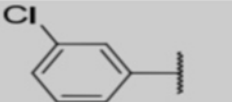
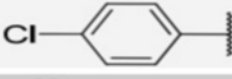

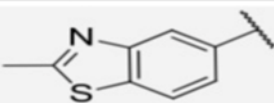
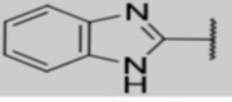
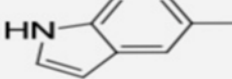
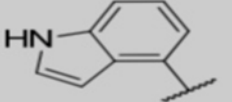
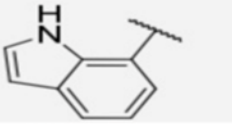
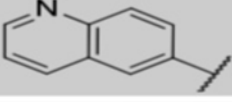
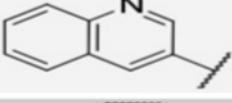
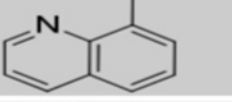
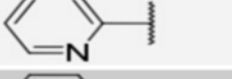





Figure 08 : La cavité choisie de 3SKA.

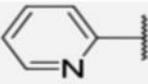
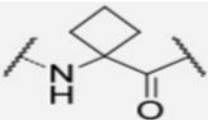
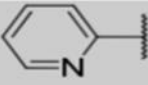
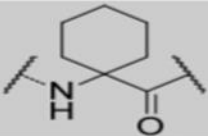
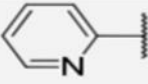
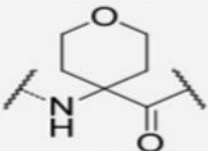
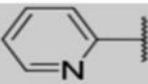
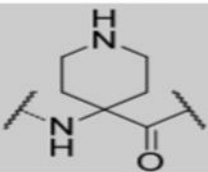
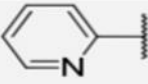
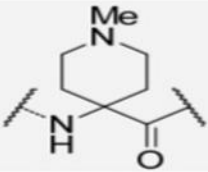
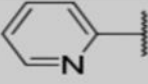
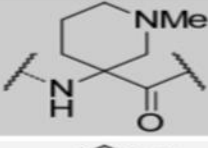
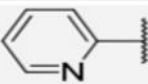
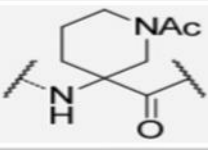
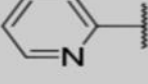
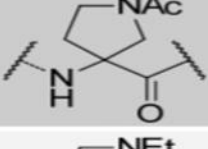
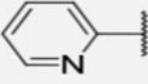
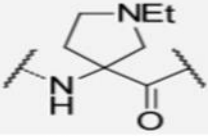
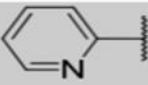
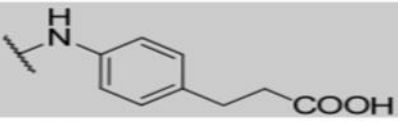
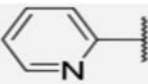
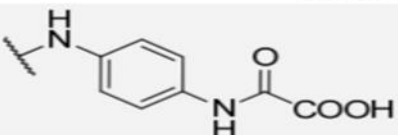
III.1.3 Préparations des ligands :

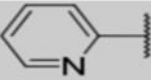
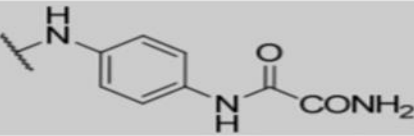
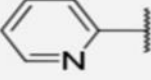
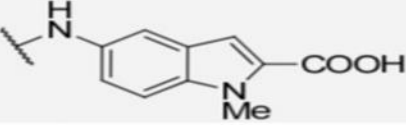
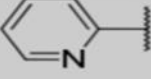
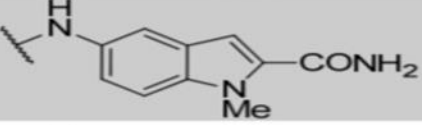
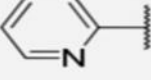
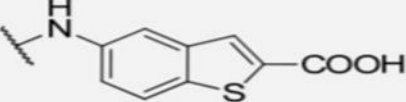
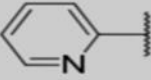
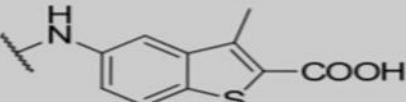
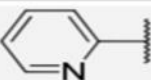
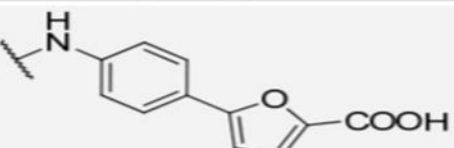
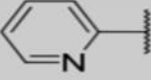
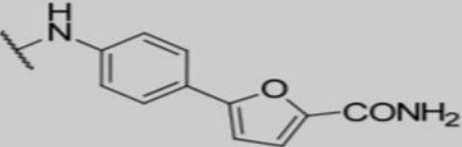
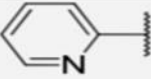
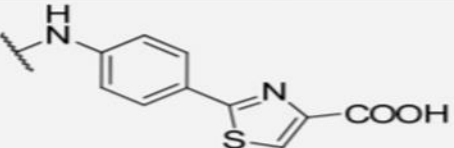
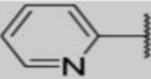
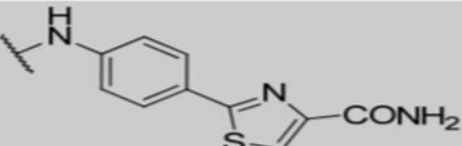
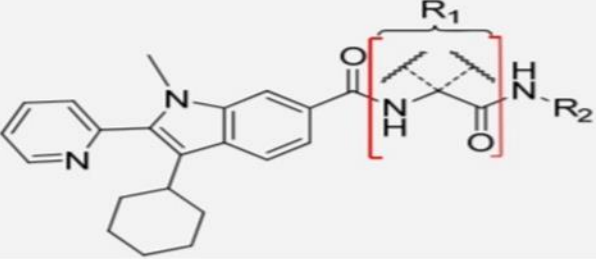
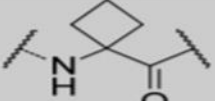
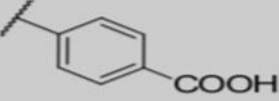
- Les inhibiteurs utilisés dans notre travail sont des dérivés de l'indole 6 carboxamide, qui sont obtenus à partir d'un article publié en 2016.
- Toutes les structures utilisées ont été dessinées par ChemDraw puis optimisées à l'aide du logiciel HyperChem 7.0 en utilisant la mécanique moléculaire avec le champ de force (MM+) puis par la méthode semi empirique PM3. Ils sont enregistrés au format MOL. Les structures 2D des 72 molécules dérivées de l'indole 6 carboxamide sont représentées dans le **tableau 04**. **Tableau 04 :** structures 2D des 72 molécules dérivées de l'indole 6 carboxamide.

No.	R ₁	R ₂
1		
2		
		
3		H
4		Me
5		Et
6		<i>i</i> Bu
7		Me
8		Me
9 ^a		Me
10		Me
11		Me

No.	R ₁	R ₂
12		Me
13 ^a		Me
14		Me
15		Me
16		Me
17		Me
18		Me
19 ^a		Me
20		Me
21		Me
22		Me
23		Me
24		Me
25 ^a		Me
26		Me
27		Me

No.	R ₁	R ₂
28		Me
29		Me
30		Me
31		Me
32		Me
33		Me
34		Me
35 ^b		Me
36 ^a		Me
37		Me
38		Me
39		Me
40		Me
41		Me
42		Me

No.	R ₁	R ₂
43 ^a		
44		
45		
46		
47		
48		
49 ^d		
50		
51		
52		
53		

No.	R ₁	R ₂
54		
55 ^a		
56		
57		
58		
59		
60		
61		
62 ^a		
		
63		

No.	R ₁	R ₂
64		
65		
66		
67		
68		
69		
70 ^a		
71		
72		

III.2 Simulation de docking moléculaire :

Afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'inhibition, le docking est basé sur une méthode semi-flexible et est couramment utilisé pour le docking protéine ligand, où la chaîne principale de la protéine est rigide et le ligand est flexible.

L'étude de l'interaction entre le site actif de la protéine 3SKA et les dérivés de L'indole 6 carboxamide pour former des complexes stables est réalisée à l'aide du logiciel MOE,

Une fois que le complexe ligand-récepteur est formé, celui-ci va adapter la conformation la plus stable, c'est à dire le niveau énergétique le plus faible.

III.3 Prédiction des propriétés moléculaires des ligands :

Les descripteurs moléculaires et les propriétés de probabilité médicamenteuse des composés basés sur la règle de LIPINSKI et VEBER ont été analysés à l'aide de l'outil serveur Swissadme. on suive les étapes suivantes pour chaque complexe :

- on copie le Smile de chaque ligand de translator Smile.
- on colle le Smile dans l'outil Swissadme et on calcule les propriétés de complexe.

III.4 Prédiction des propriétés ADME :

Lors de la conception de médicaments, prédire les propriétés d'Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, (ADME) des molécules à visée thérapeutique permet d'éliminer celles qui ne seraient pas de bons candidats-médicaments Pour prédire *in silico* les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques ADME ainsi que la toxicité par l'estimation de la sécurité pharmacologique d'une molécule, prenant en compte les paramètres comme la mutagénicité, la toxicité hépatique, et la toxicité potentielle pour le système cardiovasculaire , on a eu recours au site web Swissadme. [15]

IV. Résultats et discussions :

IV.1 Validation du protocole de criblage virtuel :

La validation du protocole de docking, étape critique qui permet de déterminer l'exactitude des résultats obtenus, est réalisée par la méthode :

– Re-docking :

Le re-docking du ligand de référence dans une cavité protéique adaptée permet la validation de la technique. Le ligand qui se trouve dans la structure cristalline a été retiré et réinséré au niveau de la cavité de fixation initiale du ligand sur le récepteur afin d'évaluer les résultats du re-docking. [16] L'évaluation de la stabilité de la structure est faite grâce au calcul de la déviation quadratique moyenne (RMSD) qui permet de mesurer la déviation géométrique (en Å) d'une pose obtenue en comparaison avec une pose de référence. La meilleure compatibilité géométrique tend à favoriser un RMSD plus faible. Le protocole est validé lorsque la valeur du RMSD est inférieure à 2 Å. [17]

- Après avoir sélectionné la meilleure pose, on a obtenu une valeur de RMSD égale à **1.3173** Å, avec un score de **-7.8709** Kcal/mol
- La figure ci-dessous représente la superposition entre le ligand de référence co-cristallisé « 053 » (en jaune) avec la meilleure pose générée (en verte) visualisée par BIOVIA Discovery Studio 4.0.

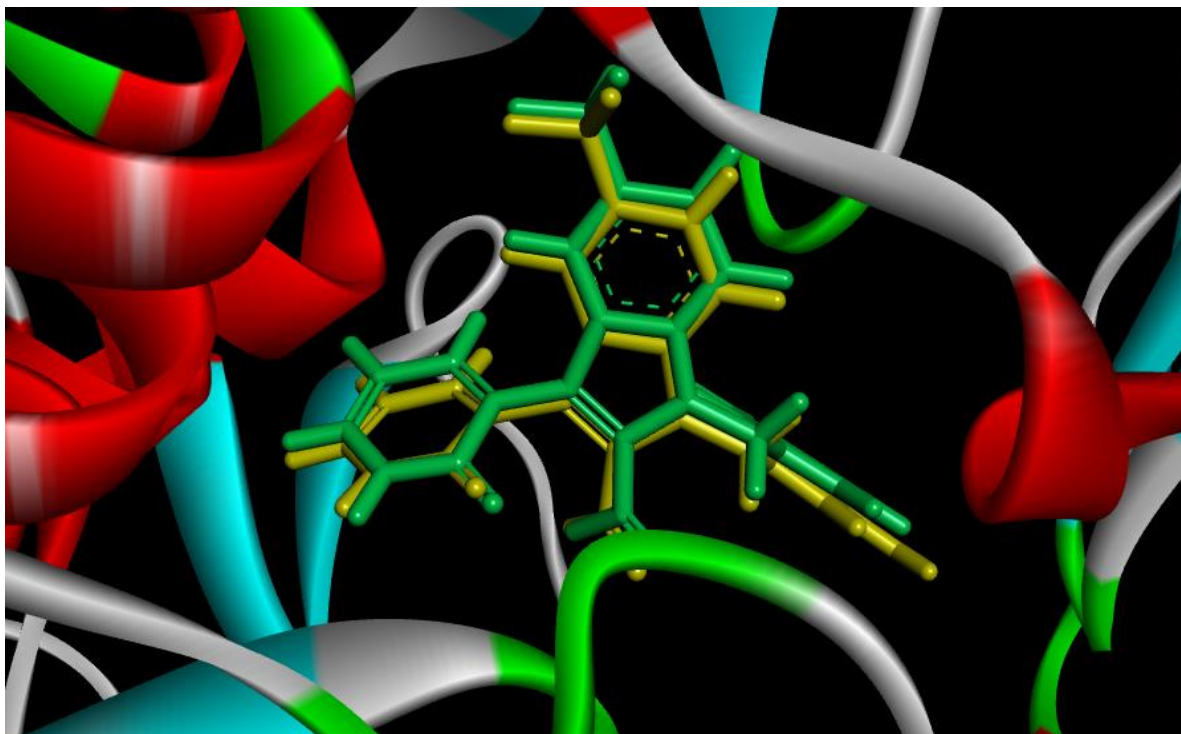


Figure 09 : Superposition de l'053 avec sa meilleure pose obtenue par re-docking et visualisé par BIOVIA Discovery Studio 4.0.

L'analyse montre qu'il n'existe pas une différence significative entre la pose du ligand générée après le docking moléculaire (colorée en vert) et celle de référence déterminée expérimentalement (colorée en jaune) sur les deux ligands étudiés (Fig.9). Cela témoigne davantage de la fiabilité du programme MOE pour l'étude in-silico de l'inhibition de la polymérase NS5B. Ce test confirme la conclusion tirée suite au test de fiabilité par RMSD et confirme la performance du logiciel choisi.

IV.2 Résultat de Docking moléculaire :

Les résultats de scores (kcal/mol) et du RMSD de meilleure pose pour chaque ligand obtenu par logiciel MOE (**Tableau 05**) :

Tableau 05 : les valeurs de l'énergie de score et RMSD de l'enzyme 3SKA avec les ligands étudiés.

Ligand	Score (kcal /mol)	RMSD	Ligand	Score (kcal /mol)	RMSD
L_{réf}	-7.8709	1.3173	L37	-7.6995	1.6489
L1	-5.7271	1.2662	L38	-6.6344	1.4287
L2	-5.9134	1.6792	L39	-6.4467	1.7627
L3	-6.0316	1.3690	L40	-7.3476	1.7425
L4	-7.6959	1.4647	L41	-7.9458	1.5988
L5	-6.1888	1.1131	L42	-7.2041	1.8863
L6	-6.2976	1.2321	L43	-7.1891	1.5673
L7	-7.7067	1.6734	L44	-8.6404	1.7247
L8	-6.3131	1.9150	L45	-7.4568	1.7384
L9	-6.0870	1.6387	L46	-7.0416	1.9841
L10	-6.5531	1.8466	L47	-6.4530	1.4379
L11	-5.7766	1.8789	L48	-6.8784	1.9749
L12	-7.7586	1.8671	L49	-8.3830	1.7604
L13	-7.4079	1.8004	L50	-7.9685	1.4136
L14	-7.9840	1.8061	L51	-7.5376	1.8011
L15	-5.6562	1.8530	L52	-1.7241	1.6856
L16	-7.7716	1.2710	L53	-4.8892	1.8975
L17	-6.2527	1.1436	L54	-6.4685	1.3382
L18	-6.4518	1.5816	L55	-7.5198	1.3863
L19	-6.7256	1.3262	L56	-7.1183	1.3087

L20	-6.3843	1.6652	L57	-3.6015	1.1495
L21	-6.8022	1.6984	L58	-6.0156	1.4832
L22	-6.5525	1.9642	L59	-8.0369	1.4779
L23	-4.7172	1.4497	L60	-3.5429	1.4880
L24	-7.9378	1.4327	L61	-6.3481	1.0745
L25	-6.0843	1.6457	L62	-1.3922	1.8757
L26	-6.0949	0.9990	L63	-7.3981	1.2327
L27	-6.1219	1.1647	L64	-7.1049	1.5152
L28	-6.0821	1.6433	L65	-7.4386	1.9435
L29	-5.6353	1.8733	L66	-5.8789	1.9607
L30	-7.1695	1.8940	L67	-7.9719	1.6102
L31	-6.3793	1.9709	L68	-9.8409	1.6569
L32	-7.2974	1.9150	L69	-7.8746	1.7392
L33	-6.7548	1.6470	L70	-7.0045	1.8368
L34	-6.5241	1.8292	L71	-6.3510	1.9986
L35	-5.9778	1.2734	L72	-6.2456	1.9681
L36	-5.3172	1.5397			

D'après le **Tableau 05** et Selon les résultats obtenus : les énergies de score pour tous les composés sont comprises entre [- 1.3922 et -9.8409] Kcal/mol. Ils ont des valeurs de RMSD acceptables car ils sont tous $< 2\text{\AA}$

On note que les complexes formés par les ligands sélectionnés en gras (**L14, L24, L41, L44, L49, L50 L59, L67, L68**) et le site actif du 3SKA possèdent les plus petites énergies du score par rapport aux autres ligands, et aussi par rapport au complexe de ligand co-cristalliser $L_{\text{réf}}$ (**< -7.8709**), ceci montre que ces ligands peuvent former des complexes stables. Qui sont classés par l'ordre suivant : **$L68 < L44 < L49 < L59 < L14 < L67 < L50 < L41 < L24 < L_{\text{réf}}$** .

IV.3 Les interactions protéine-ligand :

Ces neuf ligands représentent les meilleurs ligands qu'on va étudier leurs interactions voire **tableau 06**.

Tableau 06 : les interactions entre le ligand de référence et Les meilleurs ligands.

	Liaison entre les atomes de ligands et les résidus de site actif					
	Atome de ligand	Atome impliqué dans AA	Résidus	Catégories	Type de liaison	Distances (Å°)
L ref	F26	H	TYR 415	Hydrogene bond, halogen	Conventioal hydrogen bond, halogen	2.96
	O30	H	TYR 448	Hydrogen bond	Conventioal hydrogen bond	1.71
	H5	O	GLN 446	Hydrogen bond	Conventioal hydrogen bond	1.87
	O30	HA	ILE 447	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.60
	O23	HA	TYR 448	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.24
	H11	O	ASN 316	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.66
	F29	O	MET 414	Halogen	Halogen	3.11
	6-ring	SG	CYS 366	Other	Pi-sulfur	3.64
	6-ring	6-ring	TYR 415	Hydrophobic	Pi-pi stacked	5.96
	6-ring	5-ring	TYR 448	Hydrophobic	Pi-pi shaped	4.90
	C25	CG	LEU 384	Hydrophobic	Alkyl	4.53
	C25	6-ring	TYR 415	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.48
	6-ring	CG	MET 414	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.04
	6-ring					5.13
	5-ring					5.30
	6-ring	SG	CYS 366	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.78
	5-ring					5.18
L14	O	HN	THR 221	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.31
	O	H 12	ARG 386	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	3.01
	O	HA	ASP 319	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.57
	H	O	CYS 366	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.35
	H	OH	TYR 415	Hydrogen bond	Carbon Hydrogen bond	2.95
	Cl	/	MET 414	Hydrophobic	Alkyl	5.22
	CL	6-ring	PHE 145	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.11
	/	6-ring	CYS 366	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.04

L24	N	HZ 2	LYS 141	Hydrogene bond	Conventional hydrogen bond	2.97
	N	HH 11	ARG 158	Hydrogene bond	Conventional hydrogen bond	2.53
	N	HH 22	ARG 158	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.62
	O	HD 2	ARG 200	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.68
	6-ring	HZ 1	LYS 141	Hydrogen bond, electrostatic	Pi-cation, pi-donor hydrogen bond	2.65
	5-ring	NH2	ARG 158	Electrostatic	Pi-cation	4.23
	6-ring	/	MET 414	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.27
L41	N	HH 11	ARG 158	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.65
	O	HE 22	GLN 446	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.62
	O	HD2	ARG 200	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.83
	H	OD2	ASP 318	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.86
	6-ring	NZ	LYS 141	Electrostatic	Pi-cation	3.90
	5-ring	NH2	ARG 158	Hydrogen bond, electrostatic	Pi-cation, pi-donor hydrogen bond	3.89
	6-ring	OD 1	ASP 318	Electrostatic	Pi-anion	4.02
L44	N	HH 11	ARG 158	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.87
	O	HE 22	GLN 446	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.52
	H	OH	TYR 448	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.63
	O	HD 2	ARG 200	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.81
	H	OD2	ASP 318	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.85
	6-ring	NZ	LYS 141	Electrostatic	Pi-cation	3.96
	6-ring	NH1	ARG 158	Hydrogen bond, electrostatic	Pi-cation, pi-donor hydrogen bond	3.76
	5-ring					3.98
	6-ring	OD1	ASP 318	Electrostatic	Pi-anion	3.99
	6-ring	/	MET 414	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.37
L49	O	H	LEU 159	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.65
	O	HD 21	ASN 291	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.59
	O	H	ASP318	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.08
	H	O	MET 414	Hydrogen bond	Carbon Hydrogen bond	2.74

	H	O	ASN 316	Hydrogen bond	Carbon Hydrogen bond	2.57
	H	OD1	ASP 318	Hydrogen bond	Carbon Hydrogen bond	2.31
	6-ring	NH1	ARG 158	Electrostatic	Pi-cation	3.22
	6-ring	HE 2	MET 414	Hydrophobic	Pi- sigma	2.91
	C	5-ring	CYS 366	Hydrophobic	Alkyl	3.45
	5-ring	/	MET 414	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.16
	6-ring	5-ring	PRO 197	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.76
	6-ring	CG	LEU 384	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.27
	6-ring	6-ring	TYR 448	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.98
L50	O	HH 11	ARG 158	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.14
	O	H	CYS 223	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.44
	O	HD 21	ASN 291	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.40
	O	HG	SER 556	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.32
	H	OD 1	ASP 318	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.61
	H	OD 1	ASP 220	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.10
	H	OD1	ASN 411	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.44
	6-ring	NH1	ARG 386	Electrostatic	Pi-cation	3.41
	6-ring	OD2	ASP 318	Electrostatic	Pi-anion	3.39
L59	N	HH 12	ARG 158	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.13
	H	OD2	ASP 318	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.74
		OD1				3.06
	5-ring	OD1	ASP 318	Electrostatic	Pi-anion	3.72
	6-ring	OD1				4.06
	6-ring	OD2				3.75
	6-ring	N	ASN 316	Hydrophobic	Amide- pi stacked	5.40
	6-ring	CB-SG	CYS 366	Hydrophobic	Pi-alkyl	3.72
	5-ring	CB-SG				5.12
	5-ring	/	MET 414	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.14
L67	O	HH 12	ARG 368	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.51
	H	OH	TYR 448	Hydrogen bond	Conventional hydrogen bond	2.19
	O	HA	PRO 167	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.81
	O	HD3	ARG 200	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	3.04
	5-ring	NH1	ARG158	Electrostatic	Pi-cation	4.89
	6-ring	HD2	ARG 158	Hydrophobic	Pi-sigma	2.91
	C	CB-SG	CYS 366	Hydrophobic	Alkyl	3.72

L68	C	6-ring	PHE 145	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.32
	C	6-ring	TYR 448	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.02
	6-ring	CB-CG	ARG 158	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.42
	6-ring	CB-SG	CYS 366	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.02
	5-ring					5.04
	5-ring	/	MET 414	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.89
	O	HA	TYR 448	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.71
	H	O	ASN 316	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.78
	H	OD1	ASP 318	Hydrogen bond	Carbon hydrogen bond	2.56
	S	6-ring	TYR 448	OTHER	Pi-sulfur	5.65
	6-ring	6-ring	TYR 448	Hydrophobic	Pi-pi T shaped	4.88
	C	/	MET 414	Hydrophobic	Alkyl	3.98
	C	6-ring	TYR 415	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.28
	6-ring	CB-SG	CYS366	Hydrophobic	Pi-alkyl	3.82
	5-ring					4.97
	5-ring	/	MET 414	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.00

- L'évaluation des résultats obtenus dans cette étude se basant sur les critères suivants :
- La valeur de S-score et le RMSD,
 - Les interactions (nombre, le type et la distance) pour déterminer les meilleurs ligands qui ont une affinité élevée au site actif de 3SKA.
 - L'étude menée par **Imberty et al**, les interactions dont la distance est comprise entre : (2,5 Å et 3,1 Å) sont classées comme étant fortes. Les interactions dont la distance se situe entre (3,1 Å et 3,55 Å) sont considérées comme moyennes. Les interactions dont la distance est supérieure à 3,55 Å sont considérées comme faibles. [18]

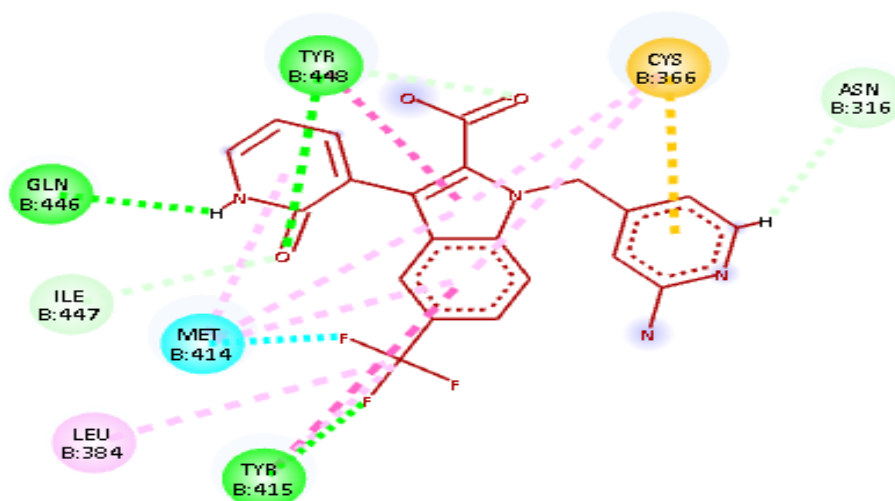
❖ L'étude de l'interaction de 3SKA-053 :

Dans le but de proposer de nouveaux inhibiteurs de la 3SKA, en premier lieu, on va étudier le mécanisme d'inhibition mis en place par le meilleur composé réellement actif sorti du criblage total. Il s'agit du ligand de référence 053 dont l'énergie de score égal a “**-7.8709 kcal/mol**”. La visualisation des interactions de ce composé au sein du site actif de la 3SKA a été réalisée à l'aide du **BIOVIA Discovery Studio Visualiser**.

Cette étude est importante pour faire la comparaison avec les autres ligands, On observe que Le ligand de référence 053 établit 17 liaisons spécifiques qui comprennent :

- Six liaisons hydrogènes :

- ✓ Deux liaisons fortes établissent entre l'oxygène (O30, O23) du ligand et les résidus ILE 447, TYR 448 avec les distances respectivement : 2.60 Å, 2.24 Å, ces liaisons sont de type carbon hydrogen bond, et une liaison entre O30 et le résidu TYR 448 avec une distance de 1.71 Å de type conventional hydrogen bond.
- ✓ Une liaison forte entre le fluor 26 et le résidu TYR 415 avec une distance de 2.96 de type halogen.
- ✓ Deux autres liaisons fortes de type conventional hydrogen bond et carbon hydrogen bond formé respectivement entre l'hydrogène et le résidu GLN446 et ASN 316 avec des distances 1.87 Å et 2.66 Å.
 - Dix liaisons hydrophobes :
- ✓ Six liaisons entre 6-ring et les résidus CYS 366, TYR 415, TYR 448, MET 414, CYS 366 de type pi-sulfur, Pi-pi stacked, pi shaped, pi-alkyl avec les distances 3.64, 5.96, 4.90, 4.04, 5.13, 4.78 Å
- ✓ Deux liaisons faibles entre le carbone C25 et les résidus LEU384 et TYR 415 de type alkyl et pi-alkyl avec les distances 4.53 et 4.48 Å.
- ✓ Deux liaisons faibles entre 5-ring et MET 414 et CYS 366 de site actif avec des distances 5.30 et 5.38 Å
- Une liaison moyenne formé par le fluor 29 et le résidu MET 414 de site actif de type halogen avec une distance de 3.11 Å.



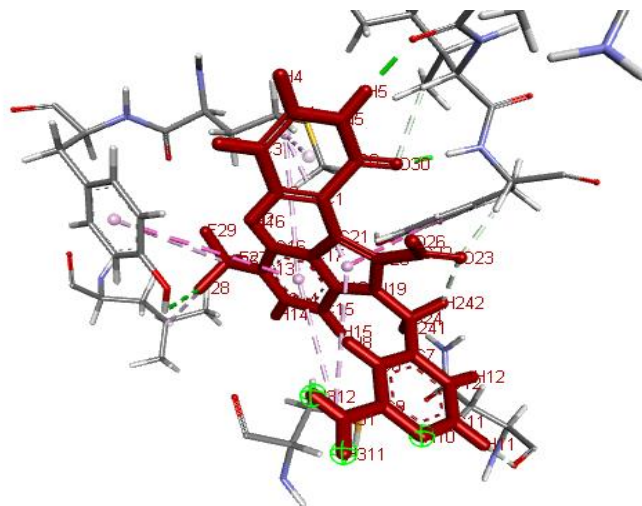


Figure 10 : Interactions entre le ligand de référence et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

❖ Etude des interactions enzyme-composé sélectionnés :

Cette étude est effectuée sur les neuf meilleurs ligands en exploitant les informations structurales fournies par le docking moléculaire pour identifier les meilleurs candidats, on utilisant la **BIOVIA Discovery Studio Visualiser**.

Les résultats de distances et des interactions entre ces ligands et l'enzyme 3SKA sont présentés dans le **Tableau 06**. À la lumière de résultats obtenus on remarque que les distances mesurées varient entre 1.71 Å jusqu'à 5.75 Å pour tous les complexes étudiés.

✚ Le complexe formé par le ligand **14** a un score qui est légèrement supérieur à celle de $L_{réf}$ et qui s'évalue à **-7.98 kcal /mol**, L'analyse montre que le ligand 14 inhibe 3SKA en formant **huit** interactions :

- ✓ **Cinq liaisons hydrogènes** fortes entre l'oxygène et les résidus : THR 221, ARG 386 de type Conventional hydrogen bond avec des distances respectivement 2.31 et 3.01 Å et une liaison entre O et ASP319 (2.57 Å) de type carbon hydrogen bond et deux liaisons entre l'hydrogène et les résidus CYS 366 et TYR 415 avec des distances 2.35, 2.95 Å.
- ✓ **Trois liaisons hydrophobes** faibles de type alkyl et pi-alkyl avec des distances supérieurs à 5 Å.

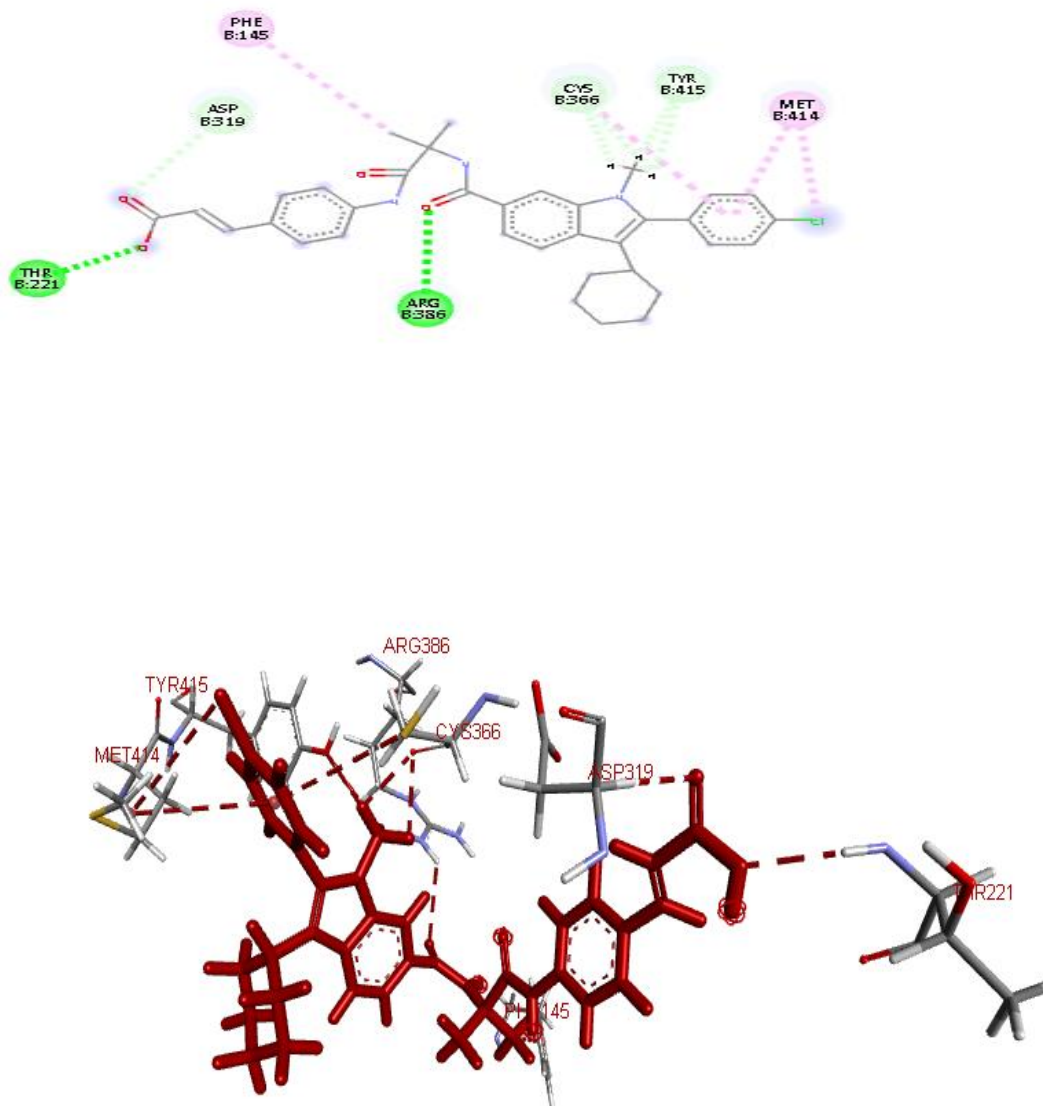


Figure 11 : Interactions entre le ligand 14 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

Le complexe formé par le ligand **24** a une énergie de score (**-7.93 Kcal/mol**) forme **sept** interactions :

- ✓ Cinq liaisons hydrogènes fortes : quatre parmi les sont de type Conventional hydrogen bond, deux entre l'azote et les résidus ARG 158 avec deux distances différentes (2.53 et 2.62 Å) et l'autre entre l'azote et LYS 141 avec une distance de 2.97 Å, aussi entre l'oxygène et le résidus ARG 200 (2.68 Å) la dernière de type pi-cation, pi donor hydrogen bond entre 6-ring et LYS 141 (2.65 Å).
- ✓ Une liaison électrostatique de type pi-cation établit entre 5-ring et le résidus ARG 158 avec une distance de 4.23 Å.

- ✓ Une liaison hydrophobique faible de type pi-alkyl entre 6-ring et MET 414 (5.27 Å).

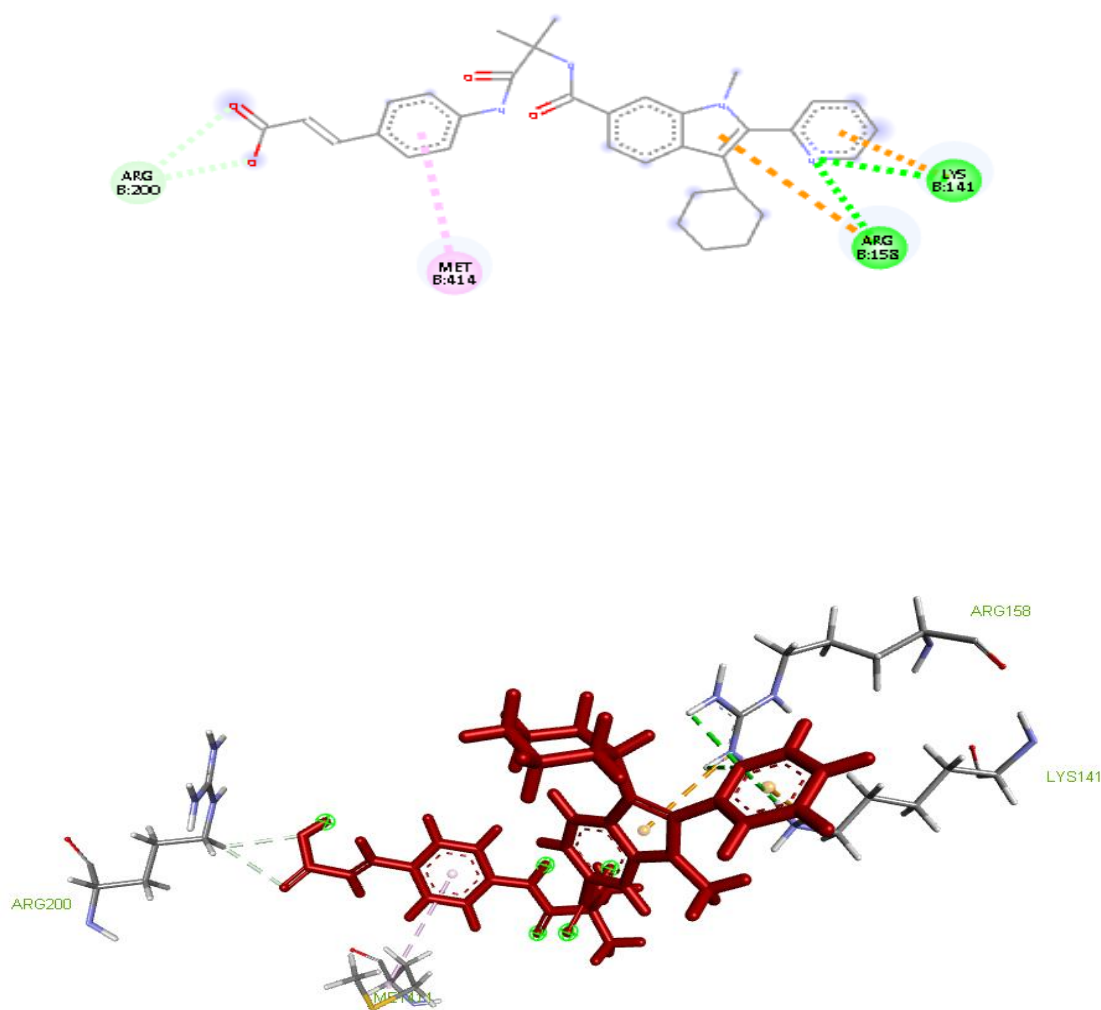


Figure 12 : Interactions entre le ligand 24 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

- ✚ **L41** présente un score aussi qui est légèrement supérieur à celle de $L_{\text{réf}}$ et qui est égal à **-7.94** kcal/mol. il forme **sept interactions** avec le site actif :

- ✓ Quatre liaisons hydrogènes fortes entre l'azote et l'oxygène avec ARG 158 et GLN 446, les distances sont de 2.65 et 2.62 Å de type conventional hydrogen bond, et deux autres liaisons de type carbon hydrogen bond entre l'oxygène et l'hydrogène de ligand

et les résidus de site actif ARG 200 et ASP 318 avec des distances respectivement 2.83 et 2.86 Å.

- ✓ Une liaison hydrogen et électrostatique entre 5-ring et ARG 158 avec une distance 3.89 Å de type pi-cation, pi donor hydrogen bond.
- ✓ Deux liaisons électrostatiques entre 6-ring et les résidus LYS141 et ASP 318 respectivement de type pi-cation pi anion et avec des distances (3.90 et 4.02 Å).

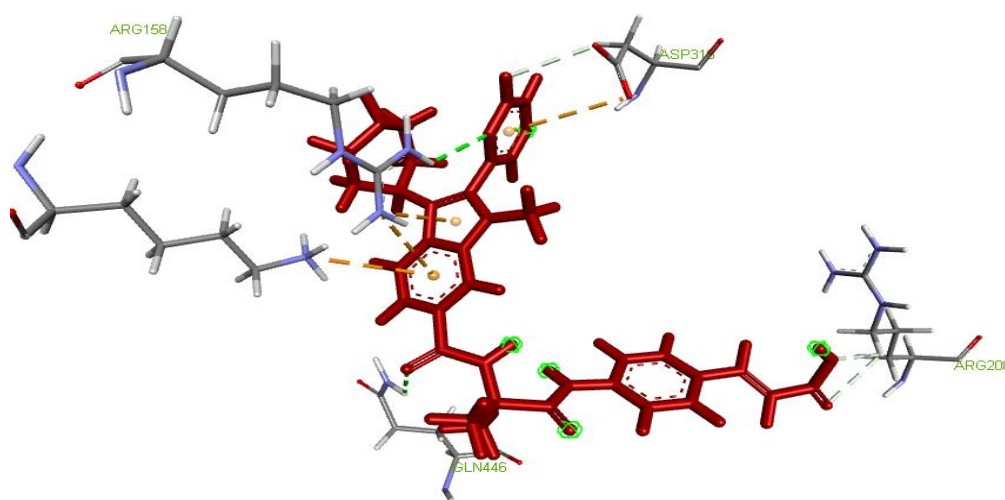
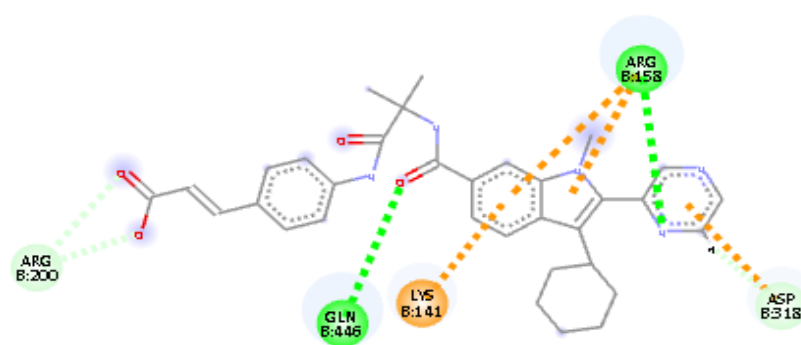


Figure 13 : Interactions entre le ligand 41 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

✚ Tandis que le ligand **L44** qui a une petite valeur de score : **-8.6404 kcal /mol** meilleur que le ligand de référence forme **dix interactions** :

- ✓ Cinq liaisons hydrogènes fortes entre : l'azote, l'oxygène, l'hydrogène de ligand et les résidus ARG 158, GLN 446, TYR448 de site actif de type conventional hydrogen bond avec les distances : 2.87, 2.52, 2.63 Å, les deux autres liaisons sont de type carbon hydrogen bond établissent entre l'oxygène et l'hydrogène de ligand et les résidus TYR 488, ARG 200 de site active avec les distances 2.81 et 2.85 Å.
- ✓ Deux liaisons hydrogène /électrostatique formé par 6-ring et 5-ring et le même résidus ARG 158 avec deux distances (3.76 et 3.98 Å) de type pi-cation et pi-donor hydrogen.
- ✓ Deux liaisons électrostatiques entre 6-ring et les résidus LYS 141 et ASP 318 de type pi-cation et pi-anion.
- ✓ Une liaison hydrophobique de pi-alkyl entre 6-ring et MET 414.

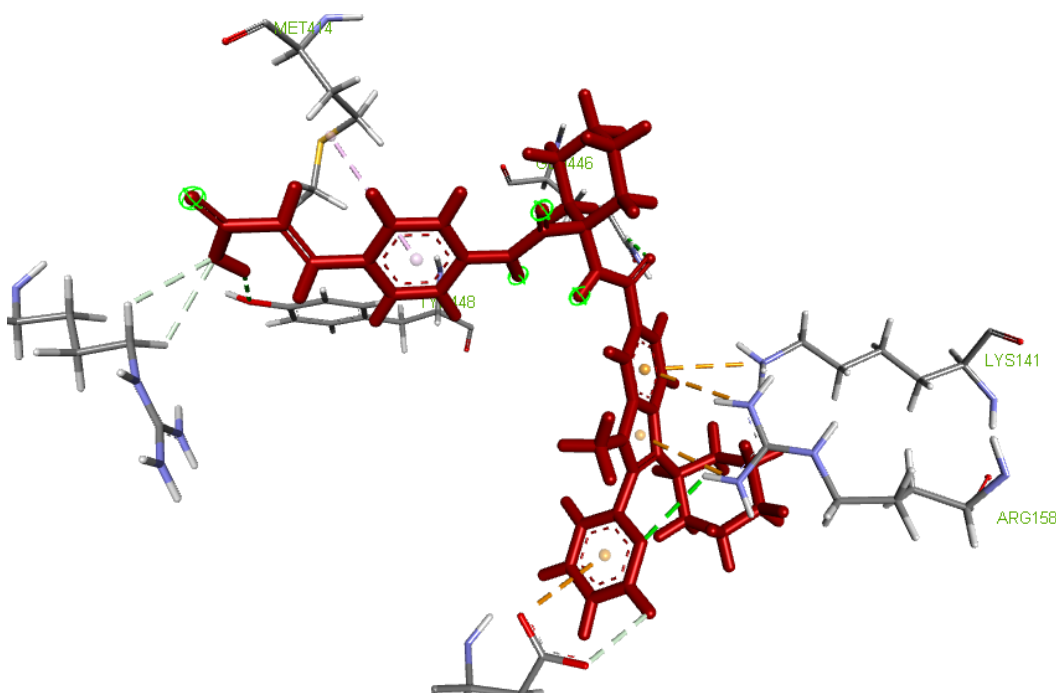


Figure 14 : Interactions entre le ligand 44 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

✚ On observe aussi que le complexe formé par le ligand **49** a une faible énergie de score (-**8.3830 Kcal/mol**) forme **treize** interactions illustrés comme suite :

- ✓ Six liaisons hydrogènes fortes : trois sont de type conventional hydrogen bond formé par l'oxygène et les résidus LEU 159, ASN 291, ASP 318 avec des distances égales aux 2.65, 2.59, 2.08 Å. Et les autre trois liaisons entre l'hydrogène et MET414, ASN 316, ASP 318 de type carbon hydrogen bond.
- ✓ Une liaison électrostatique moyenne de type pi-cation entre 6-ring et le résidus ARG 158 (3.22 Å).
- ✓ Six liaisons hydrophobiques avec les résidus : MET 414 (2.91 Å), CYS 366 (3.45 Å), PRO 197 (4.76 Å), TYR 448(4.98 Å), LEU 384 (5.27 Å), MET 414(5.16 Å).

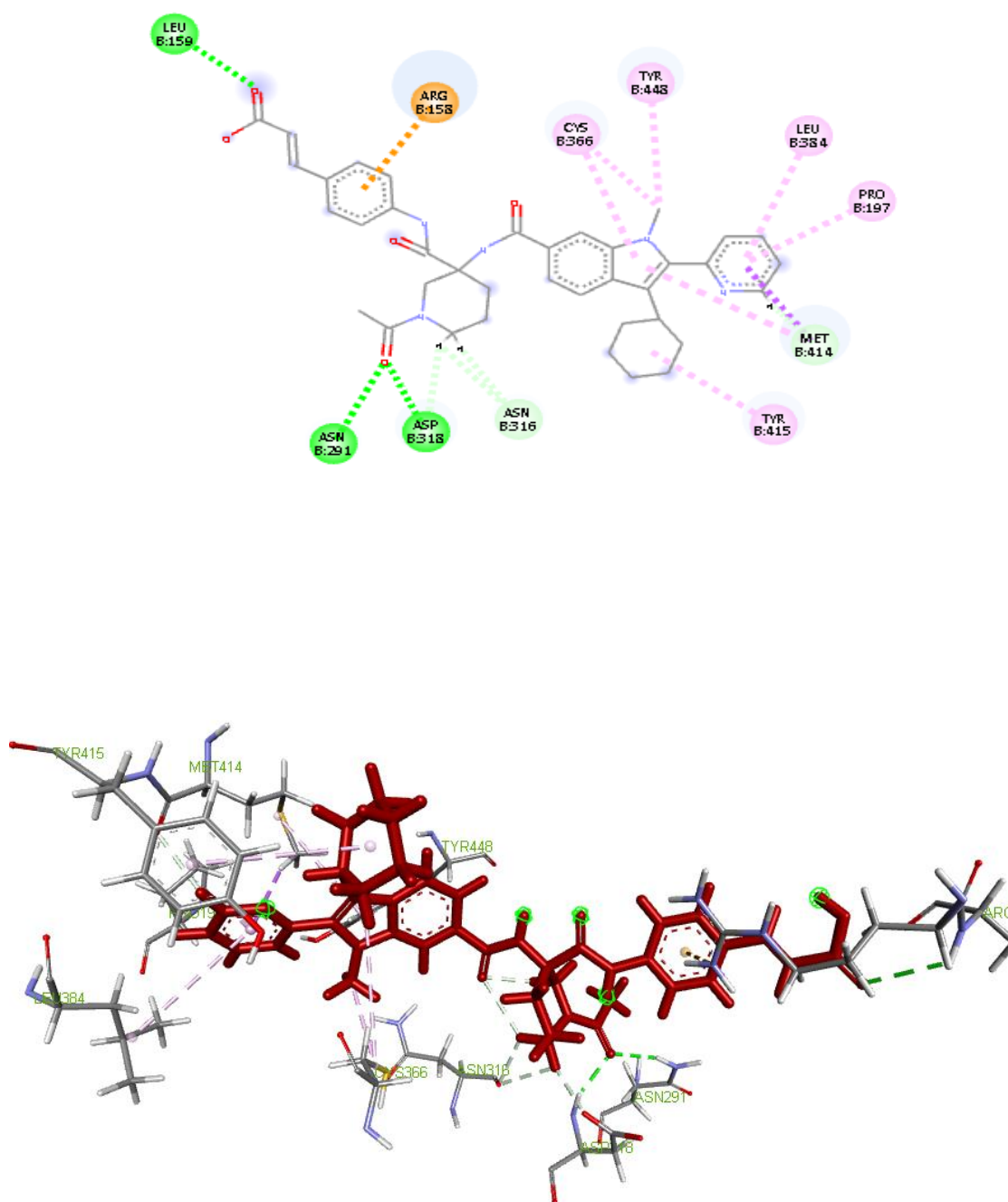


Figure 15 : Interactions entre le ligand 49 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

- ✚ Le ligand **50** est impliqué dans la formation d'un complexe avec un score légèrement supérieur au score de $L_{réf}$ (**-7.9685 kcal /mol**), il forme **neuf** interactions :

- ✓ Sept liaisons hydrogènes fortes : de type conventional hydrogène bond formé entre l'oxygène et les résidus ARG 158(2.14 Å), CYS 223 (2.44 Å), ASN 291 (2.40 Å), SER556 (2.32 Å) et entre l'hydrogène et les résidus ASP318(2.61 Å), ASP 220(2.10 Å) et une autre liaison de type carbon hydrogen bond entre l'hydrogène et ASN 411(2.44 Å).
- ✓ Deux liaisons électrostatiques moyennes : entre 6-ring et les résidus de site actif ARG 386 et ASP318 (3.41 Å), (3.39 Å).

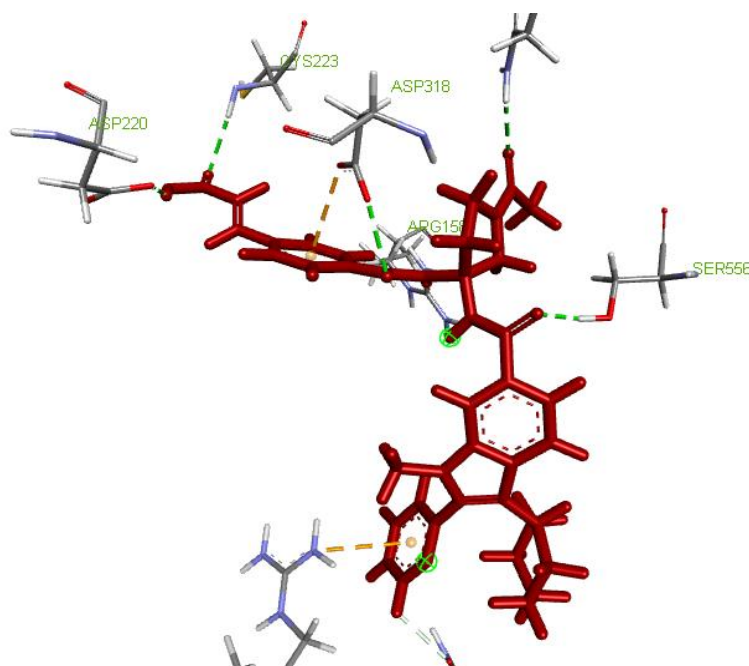
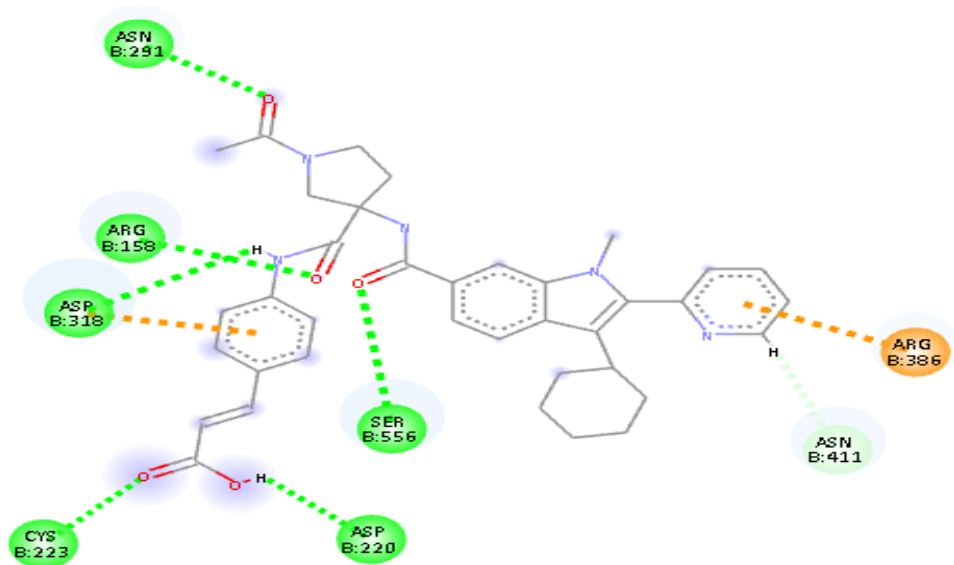


Figure 16 : Interactions entre le ligand 50 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

✚ En plus, on constate que le complexe formé par le ligand **59** a une faible énergie de Score (--**8.036** Kcal/mol). Ce ligand forme **dix** interactions dont :

- ✓ Trois liaisons hydrogènes fortes : entre l'azote et le résidu ARG 158 (2.13 Å) de type conventional hydrogen bond et entre l'hydrogene et le résidu ASP 318 avec deux distances déférentes 2.74 Å et 3.06 Å.
- ✓ Trois liaisons électrostatiques impliquent le résidu ASP 318 (3.72 Å, 4.06 Å, 3.75 Å).
- ✓ Quatre liaisons hydrophobiques formé avec les résidus ASN 316, CYS 366, MET 414 de types : amide- pi stacked et pi-alkyl.

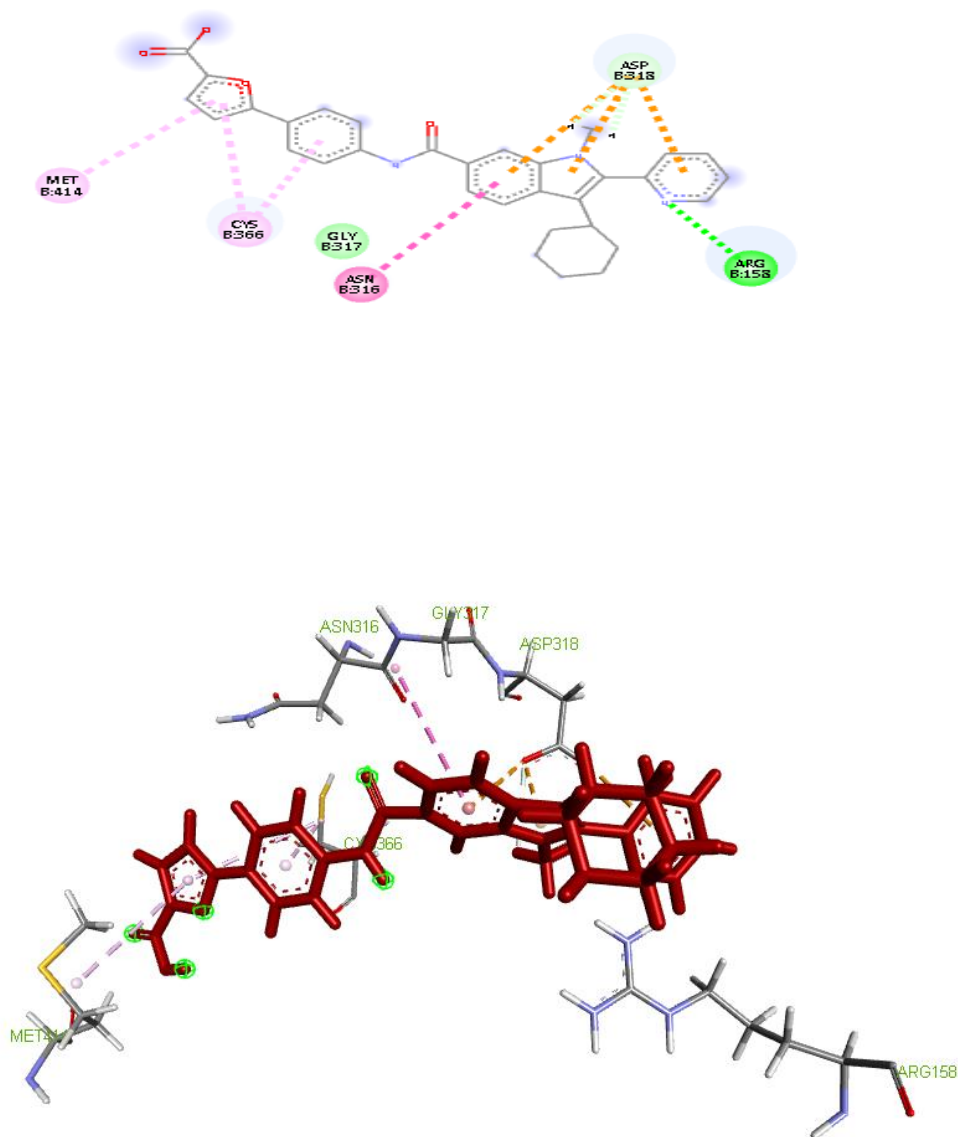


Figure 17 : : Interactions entre le ligand 59 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

✚ Le ligand **67** est considéré comme l'un des meilleurs inhibiteurs issus de notre criblage virtuel avec un score de **-7.97 kcal/mol** et forme **treize** interactions avec des catégories déférentes :

- ✓ Quatre liaisons hydrogènes formé avec les résidus ARG368 (2.51 Å) et TYR 448 (2.19 Å) de type conventional hydrogen bond, et deux liaisons de type carbon hydrogen bond avec les résidus PRO 167(2.81 Å) et ARG 200 (3.04 Å).
- ✓ Une liaison électrostatique entre 5-ring et le résidu ARG 158 de type pi-cation.
- ✓ Huit liaisons hydrophobiques impliquant le résidu ARG 158 trois fois avec des distances déférentes (2.91,4.89,5.42 Å) et le résidu CYS 366 trois fois (3.75 et 5.02, 5.04 Å) et avec PHE 145, MET 414 voire tableau 06.

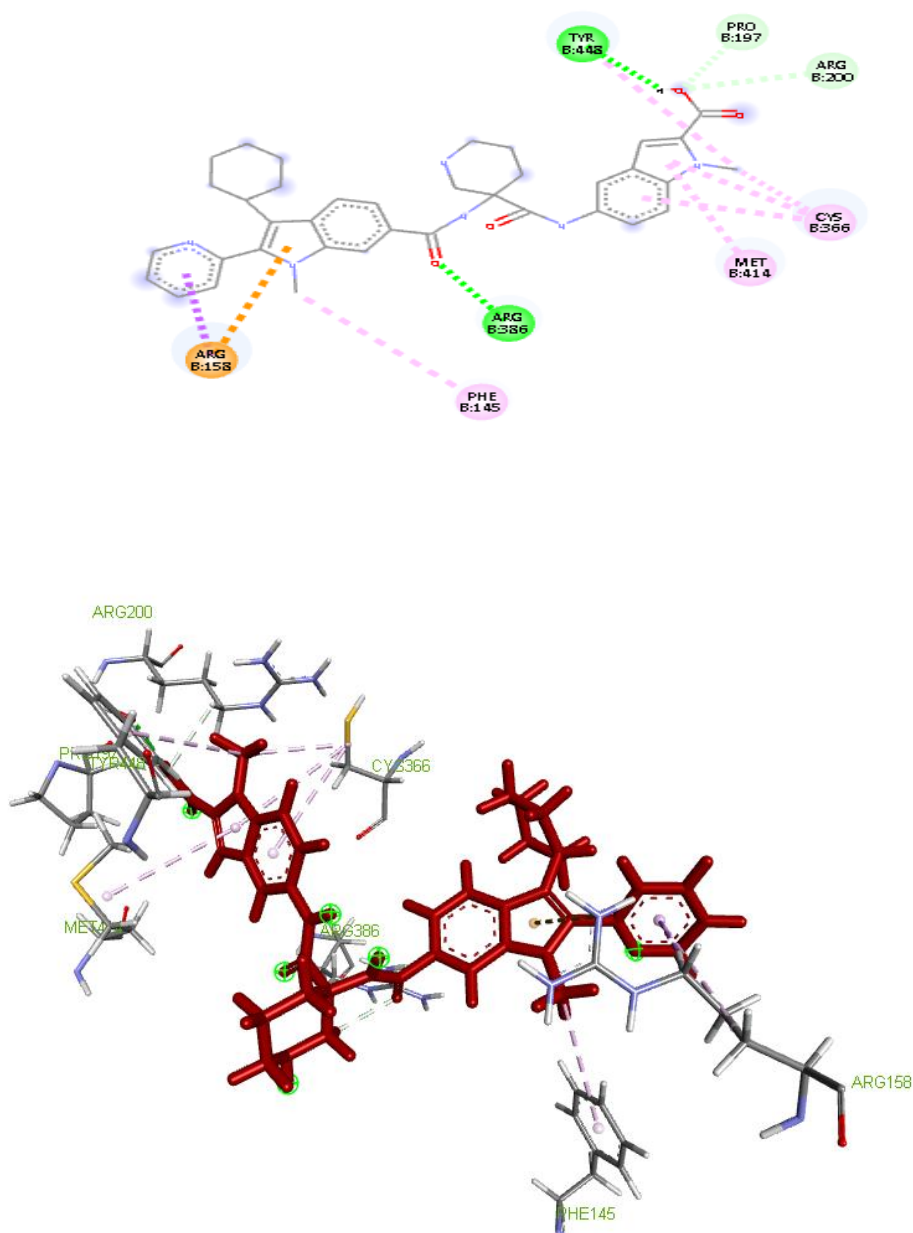


Figure 18 : Interactions entre le ligand 67 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

✚ Le complexe formé par le ligand **68** a une énergie de Score le plus petite (**-9.8409Kcal/mol**). Ce composé forme **dix** interactions dont :

- ✓ Trois liaisons hydrogènes formés par les résidus TYR 448, ASN 316, ASP318 avec des distances respectivement 2.71 Å, 2.78 Å, 2.56 Å. selon le type carbon hydrogen bond.
- ✓ Sept liaisons hydrophobiques impliquant les résidus TYR 448(4.88 et 5.65 Å), MET 414(3.98 et 5.00 Å) TYR 415(4.28 Å) CYS 366(3.82 et 4.97 Å).

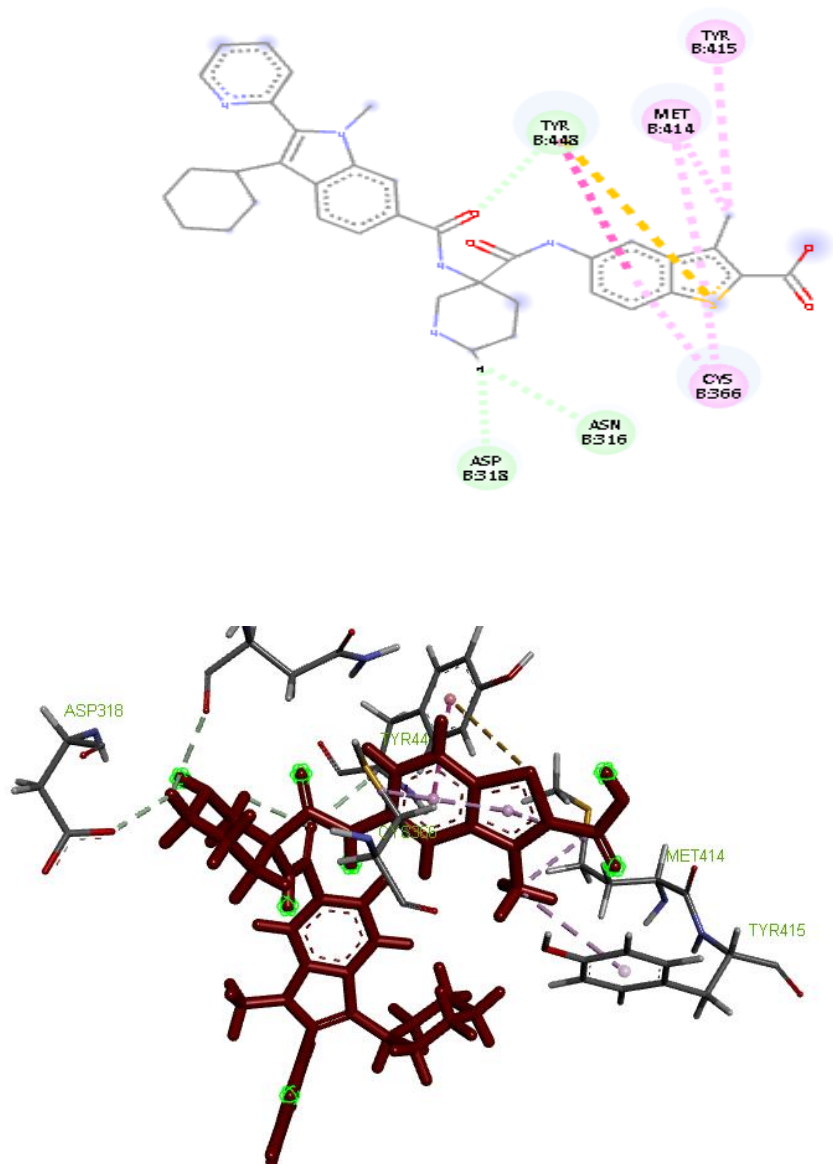


Figure 19 : Interactions entre le ligand 68 et les résidus de site actif de la protéine (ID : 3SKA).

Les ligands **68,59,49,67** possèdent les plus petites énergies de score par rapport aux autres ligands et une valeur de RMSD < 2 Å et formé plus d'interactions avec les résidus de site actif du récepteur ceci qui signifie qu'ils sont des complexes les plus stables et qu'ils ont une tendance pour inhiber l'enzyme 3SKA.

VI.4 Application des règles de drug likeness :

Selon l'étude précédente, on a récupéré neuf composés comme les meilleurs inhibiteurs (score < -7.87). Pour une étude plus approfondie, on évalue les propriétés moléculaires de ces composés selon La règle de cinq (règle de Lipinski) et de Veber.

Tableau 07 : Propriétés physicochimiques des ligands sélectionnés.

Composé	Règle de Lipinski				Règle de Veber	
	N HBA<10	N HBD<5	Log P<5	MW (g/mol)	N ROTE<10	TPSA Å ² <140
L_{réf}	7	3	4.90	428.36	5	114.00
L14	4	3	7.55	598.13	10	100.43
L24	5	3	6.23	564.67	10	113.32
L41	6	3	4.82	565.66	10	126.21
L44	5	3	6.90	604.74	10	113.32
L49	6	3	5.14	647.76	11	133.63
L50	6	3	4.78	633.74	11	133.63
L59	5	2	6.58	519.59	7	97.36
L67	6	4	2.92	632.75	9	130.28
L68	6	4	4.22	649.80	9	153.59

HBA: H-bond acceptors.

Log P: Log Po/w (WLOGP3);

MW: molecular weight.

NROT: Number of rotatable bonds.

HBD: H-bond donors.

TPSA: Topological polar surface area.

- D'après le **Tableau 07**, on peut observer que tous les ligands ont un nombre accepteur d'hydrogène inférieur à 10 et un nombre donneur d'hydrogène inférieur à 5 ce qui conduit à une meilleure perméabilité.
- Les valeurs de log p (le coefficient de partage) est une manière de mesurer la tendance d'une molécule à se dissoudre dans les membranes, qui est corrélée à sa tendance à se dissoudre dans un solvant organique.

- Les valeurs de log P des composés L41, L49, L67, L68 et de $L_{réf}$ sont inférieures à 5 avec une valeur positive ça indique que ces composés sont trop lipophiles, donc ils ont : une bonne perméabilité à travers la membrane biologique, une meilleure liaison aux protéines plasmatiques, une bonne élimination par le métabolisme, mais une faible solubilité et une mauvaise tolérance gastrique.
- Tous les composés ont un poids moléculaire supérieur à 500 Da, ce qui rend leur pénétration à travers les membranes cellulaires plus difficile. En raison de leur taille et de leur poids, ce qui constitue une infraction à la règle de Lipinski mais qui est acceptée : on tolère au plus une infraction à cette règle.
- Tous les composés étudiés ont des valeurs inférieures à 140 Å ce qui montre la bonne prédiction de la biodisponibilité orale et le transport à travers les membranes biologiques. Alors que le ligand L68 possède un TPSA supérieure à 140 donc mauvaise transport à traverser les membranes.
- Pour les N ROTE : tous les composés sauf (L49, L50) ont des valeurs de liaisons rotatives inférieures à 10, Un faible nombre des liaisons rotatives donne une flexibilité réduite pour un composés ce qui indique que ces ligands ne changent que légèrement leur conformation lors de la liaison à une protéine.

Donc :

- Les composés L41, L50, L67, L68 présentent une seule violation de Lipinski (poids moléculaire supérieurs à 500 Da) les autres composés L14, L24, L44, L49, L59 ont deux violations de Lipinski (des poids moléculaires supérieurs à 500 Da et des valeurs de log p supérieurs à 5).
- Tous les composés sont en accord avec la règle de Veber sauf (L49, L50, L68) ce qui leur permet de très bien se corréler avec l'absorption intestinale humaine.
- On a donc maintenu les 2 meilleures molécules répondant à la règle de Lipinski et Veber qui sont les molécules : L41, L67 pour l'étude des propriétés pharmacocinétiques.

IV.5 Analyse des propriétés ADME :

ADME est l'étude qui permet l'évaluation des propriétés pharmacocinétiques pour sélectionner les ligands respectant les différents critères qui leur permettent d'exercer un effet thérapeutique, le résultat de l'étude du profil ADME pour les neuf composés est résumé dans le tableau suivantes :

Tableau 08 : propriétés pharmacocinétiques des composés sélectionnés.

N°	GI-absorption	BBB	Log KP	Cyp1A2	CYP2C19	CYP2D6	CYP2C9	CYP3A4	P-gp
L _{réf}	Faible	Non	-7.27	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non
L14	Faible	Non	-4.59	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non
L24	Faible	Non	-5.56	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
L41	Faible	Non	-6.33	Non	Oui	Non	Oui	Non	Non
L44	Faible	Non	-5.09	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
L49	Faible	Non	-6.60	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non
L50	Faible	Non	-6.77	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non
L59	Faible	Non	-4.80	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non
L67	Faible	Non	-8.09	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui
L68	Faible	Non	-7.27	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non

Oui : inhibiteur de CYP.

Non : non inhibiteur de CYP.

Les cytochromes P450 (CYP450) sont des hémoprotéines qui interviennent dans les réactions d'oxydoréduction responsables d'environ 95 % du métabolisme des médicaments. Les isoformes du CYP450 sont le CYP1A2, le CYP2C9, le CYP2C19, le CYP2D6 et le CYP3A4.

Il est important d'évaluer si un composé est un agoniste ou antagoniste de ces enzymes Car Le CYP450 peut considérablement modifier l'ADMET des composés.

- Pour le ligand de référence, il inhibe CYP 1A2 et CYP3A4 par contre, il n'est pas considéré comme inhibiteur pour les isoenzymes CYP2C19 et CYP2D6 et CYPC9.
- Même chose remarqué pour les autres ligands ils jouent le rôle d'antagoniste pour certaines enzymes et d'agoniste pour les autres donc ces composés peuvent provoquer des interactions

médicamenteuses lorsqu'ils sont pris avec des médicaments ou des pro médicaments qui sont métabolisés par les isoenzymes.

- Mais le composé **67** présente qu'une seule inhibition d'une seule isoenzyme qui est le CYP2C19. Ce résultat est considéré comme un point positif dans ce composé, car si un composé chimique proposé comme médicament inhibe toutes les enzymes cytochromes, cela pourrait avoir des conséquences néfastes sur le métabolisme et la santé humaine.
- L'analyse des résultats de calcul des propriétés ADME m'a permis de noter que tous les composés ont des valeurs de log k_p négatives, ce qui suggère une mauvaise pénétration cutanée. De plus, les capacités d'absorption gastro intestinale (GI) de tous les composés sont faibles.
- On observe aussi que toutes les substances étudiées ne sont pas capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB) et donc ne pénètrent pas dans le cerveau. Par conséquent ce système est protégé contre tout effet néfaste que pourraient provoquer par ces composés car ils ont une cible qui se situe en dehors du système nerveux.
- La P-glycoprotéine (P-gp) est un transporteur membranaire impliqué dans la cinétique de nombreux xénobiotiques. Cette protéine permettant l'élimination des xénobiotiques qui sont présente au sein des différents organes. D'après l'analyse, les composés qui sont considérés comme un substrat de la glycoprotéine p sont : **L_{ref}** et **67**. Alors on peut conclure que la possibilité qu'un composé soit un substrat de la P-gp est importante dans la phase précoce de la découverte de médicaments. [19]

IV.6 Radar de biodisponibilité :

Le radar de biodisponibilité permet d'avoir une idée précoce sur le « drug-likeness » des structures étudiées en prenant en compte six propriétés physicochimiques respectivement : LIPO (lipophilie), SIZE (taille qui est le poids moléculaire), POLAR (polarité), INSOLU (insolubilité), INSATU (insaturation) et FLEX (flexibilité) qui sont comprises entre les valeurs suivantes : [20]

- LIPO : $-7 < \text{XLOGP3} < +5$.
- SIZE : $150 \text{ g/mol} < \text{Poids moléculaire} < 500 \text{ g/mol}$;
- POLAR: $20 \text{ \AA} < \text{TPSA} < 130 \text{ \AA}$.
- INSOLU: $0 < \text{Log S} < 6$.

- INSATU : $0.25 < \text{Fraction Csp3} < 1$.
- FLEX : $0 < \text{nombre de liaisons rotatoires} < 9$.

Cette schématisation de « drug-likeness » entoure une zone colorée représentative du profil physico-chimique optimal et précise graphiquement les propriétés qui se placent en dehors de cette zone. [21]

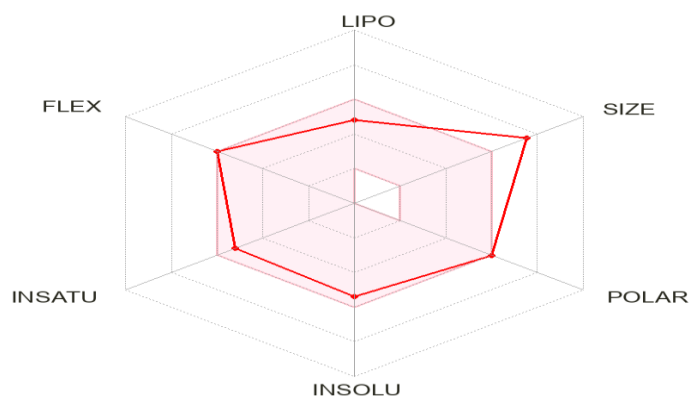


Figure 20 : Radar de biodisponibilité pour le composé 67.

- D'après les résultats obtenus au niveau du radar de biodisponibilité, on a constaté pour le composé 67 une légère déviation de la ligne rouge en dehors de la zone rose pour le SIZE qui est expliqué par le fait qu'il possède un poids moléculaire légèrement supérieur aux normes (500 g/mol).
- Tandis que toutes les autres lignes correspondantes aux (FLEX, INSATU, INSOLU, POLAR, LIPO) sont inclus dans la zone rose.

Références bibliographiques :

- [1] Nicola, A. M., Albuquerque, P., Paes, H. C., Fernandes, L., Costa, F. F., Kioshima, E. S. & Felipe, M. S. 2019, Antifungal drugs: New insights in research, & Pharmacology & therapeutics, 195, 21-38.
- [2] Cohen, N. C. (Ed.). 1996. Guidebook on molecular modeling in drug design. Gulf Professional Publishing
- [3] Fontana, E. 2005. Les inhibiteurs "suicides" des Cytochromes P450 : Etablissement d'une banque de données, mise au point d'un test de screening et études structures-activité concernant des substrats furaniques du CYP 3A4 (Doctoral dissertation, Université René Descartes-Paris V)
- [4] 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.
- [5] El hadj said kenza, 2016, Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire ; univ Tlemcen.
- [6] Corbeil, C. R. and N. Moitessier 2009. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 3. Impact of input ligand conformation, protein flexibility, and water molecules on the accuracy of docking programs. Journal of chemical information and modeling 49(4): 997-1009.
- [7] <https://www.chemcomp.com/Products.htm>.
- [8] SOUFI Wassila. 2017, Contribution à la modélisation des interactions dans les biomolécules. Diss. Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid.
- [9] <https://chemweb.ir/downloads/sybyl-x-suite/> (cité 29 mars 2023).
- [10] Boulhissa, I.; Chikhi, A. 2021, Conception de nouveaux inhibiteurs de la N acétylglucosamine-3-oenolpyruvyltransferase par criblage virtuel et applications sur certaines bactéries pathogènes. Thesis, Université Frères Mentouri - Constantine 1.
- [11] Chikhi, Soumia Teniou, et al. 2013, "Highlighting of a New Flavonol Derivatives as a Potent Antihypertensive Compound using Molecular Docking.
- [12] MOKRANI E. H. 2012, Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la deptydyl - peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine 1. Algérie. 32-33p.
- [13] Delano, Warren L. 2002, "Pymol: An open-source molecular graphics tool." CCP4 Newel. Protein Crystallography 40.1: 82-92.
- [14] BIOVIA. Discovery Studio Visualization. San Diego: Dassault Systèmes, 2021. <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modelingsimulation/discovery-studio-visualization>.

- [15] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J, 2009, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- [16] Zheng L, Meng J, Jiang K, Lan H, Wang Z, Lin M, et al, 14 mars 2022, Improving protein–ligand docking and screening accuracies by incorporating a scoring function correction term. *Brief Bioinform.*; bbac051.
- [17] Majumder R, Mandal M, 22 janv 2022, Screening of plant-based natural compounds as a potential COVID-19 main protease inhibitor: an *in silico* docking and molecular dynamics simulation approach. *J Biomol Struct Dyn.*;40(2):696-711.
- [18] Imberty, A., Hardman, K. D., Carver, J. P., & Perez, S, 1991, Molecular modeling of protein–carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. *Glycobiology*.
- [19] Zhivkova ZD, Mandova T, Doytchinova I, 2015, Quantitative structure – pharmacokinetics relationships analysis of basic drugs: volume of distribution. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 18(3): 515–527.
- [20] Silfi Ambarwati NS, Azminah A, Ahmad I, 4 mai 2022, Molecular Docking, Physicochemical and Drug-likeness Properties of Isolated Compounds from *Garcinia latissima* Miq. on Elastase Enzyme: InSilico Analysis. *Pharmacogn J.*;14(2):282-8.
- [21] Ferreira LLG, Andricopulo AD, Mai 2019, ADMET modeling approaches in drug discovery. *Drug Discov Today*;24 (5):1157-65.



Conclusion

Conclusion :

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.

De sorte que le virus puisse se répliquer et se propager *in vivo*. En tant que cible thérapeutique plusieurs protéines sont apparues comme cibles privilégiées mais c'est l'ARN polymérase NS5B qui semble intéresser beaucoup plus les scientifiques

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 MOE

Dans cette étude, le docking moléculaire est utilisé pour évaluer les interactions moléculaires existantes entre une série des molécules de dérivés de l'indole 5-carboxamide et l'enzyme 3SKA, et de prédire leur affinité et leur capacité à inhiber l'activité de l'enzyme. Le docking moléculaire a été réalisé sur une série de 72 composés.

Les résultats obtenus se fonde sur trois critères : le score d'énergie, la valeur du RMSD, le type et la distance des interactions entre les molécules testées et les résidus du site actif.

Alors, par comparaison avec le score de L ref ($S = -7.87$ kcal/mol), neuf composés (14, 24, 41, 44, 49, 50, 59, 67, 68) étaient filtrés et caractérisés comme des meilleurs inhibiteurs car ils possèdent des valeurs de scores plus petits de (-7.93 à -9.84 kcal/mol) Ces résultats ont été confirmés par l'analyse des schémas d'interaction qui montrent la présence des interactions variable avec les ligands : L68, L49, L59, L67 et cela qualifie ces composés d'être plus stables et avoir une affinité plus élevée à se lier avec l'enzyme de 3SKA.

Ensuite, on a appliqué une autre étude en évaluant d'autre concept de filtrage, les propriétés de DRUG-LIKENESS (la règle de LIPINSKI et VEBER). D'après les résultats, Les ligands L41, L67 ont été identifiés comme respectant la règle de Lipinski et Veber, ce qui suggère qu'ils sont potentiellement adaptés à une administration par voie orale en raison de leur "Drug-likeness" favorable. Pour approfondir la recherche, on a évalué les propriétés ADME, et les résultats de l'évaluation indiquent que tous les composés avaient une absence totale de risque à traverser la barrière hémato-encéphalique. Mais Le composé 67 semble être celui qui attire le plus l'attention car avait des bonnes propriétés ADME que les autres composés sauf qu'il présente une faible capacité d'absorption à travers les membranes biologiques (l'intestin), ce qui peut limiter leur biodisponibilité

Conclusion

orale. Et donc nécessiter des stratégies spécifiques pour améliorer leur absorption, telles que l'utilisation de formulations galénique appropriées lors sa préparation en médicament,

Cependant, mon étude reste seulement une étude théorique préliminaire, qui nécessite une étude empirique *in vitro* pour s'assurer que ses résultats sont corrects et les mieux développés.



تصريح شرفي

خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية لإنجاز بحث
(ملحق القرار 1082 المؤرخ في 2021/12/27)



أنا الممضي أسفله،

السيد(ة): حسين الله حسياء
الصفة: طالب سنة ثانية ماستر كيمياء
تخصص: كيمياء حيوية لانس

الحامل(ة) لبطاقة التعريف الوطنية رقم: 202022126 الصادرة بتاريخ: 23.09.2019

المسجل بكلية: العلوم الدقيقة قسم: علوم الحياة والمكلف

بانجاز أعمال بحث : منكرة ماستر في الكيمياء

عنوانها: Docking moléculaire d'une série
bioactive à intérêt thérapeutique

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعات المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات المهنية والنزاهة الأكاديمية المطلوبة في إنجاز البحث المذكور أعلاه وفق ما ينص عليه القرار رقم 1082 المؤرخ في 2021/12/27 المحدد للقواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.

التاريخ: 2021.01.27

إمضاء المعني بالمر