

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تـلجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI, LAGHOUAT

كلية العلوم

FACULE DE SCIENCES

قسم البيولوجيا

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master

**Filière** : Sciences Biologiques

**Option** : Microbiologie Appliquée

THEME

---

**Etude *in silico* de l'inhibition de la protéase principale (M<sup>pro</sup>) du  
Sars-Cov-2 par l'amphotéricine B et ses dérivés**

---

**Présenter par :**

M<sup>lle</sup>. NEGHEM Amina

M<sup>lle</sup>. BOUHAMIDA Karima

M<sup>me</sup>. DAHMANE Zohra

**Devant le jury composé de:**

**Président** : M. BENACEUR Farouk, MCA, Université de Laghouat

**Examineur** : M. ZERROUKI Houcine Mohammed, MAA, Université de Laghouat

**Rapporteur** : M. GOUZI Hicham, Prof, Université de Laghouat

**Co-rapporteuse** : M<sup>me</sup>. Messahli Ilham, Doctorante, Université de Laghouat

## *Dédicace*

*En premier lieu et avant tout, je prie notre Dieu Allah de m'avoir donné la volonté et le courage d'achever mes études.*

*J'ai l'honneur de dédie ce travail :*

*A mes très chers parents qui m'ont soutenus et encouragés durant toute période de mes études et a qui je souhaite une longue heureuse vie, que Dieu les protège et me donne la force pour que je puisse leurs rendre un petit peu de leurs bien faits malgré que je ne peux jamais arriver à faire ça.*

*A mes sœurs Amel et Soundous, A mes frères, Ibrahim et Youcef et aussi mes chères amies Alia, Imen, Chahrazed, Selma.*

*A mes chères binôme Zohra et Amina.*

*Karima*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes chers parents et à la raison de mon bonheur et de mon succès*

*À mes frères et à mes sœurs*

*À toute la famille,*

*À tous mes amis,*

*À mes chères binômes Zohra et Karima, À tous qui m'ont aidé de près*

*ou de loin*

*Neghem Amina*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes parents, qui m'ont donné la vie, symbole de tendresse, de bonheur  
et de réussite.*

*À mes frères et sœurs*

*À mon mari et mes enfants*

*Et pour tous les membres de la famille*

*À mes frères et sœurs*

*Et mes amis,*

*À mes chères binôme Karima et Amina.*

*Zohra*

## **Remerciements**

*Avant tout, on remercie ALLAH qui nous a aidé à réaliser ce travail.*

*Nous remercions notre encadreur Monsieur **Hicham Gouzi**, professeur à l'université de Laghouat, et Co - encadreur Monsieur **Messahli Ilham**, doctorante à l'université de Laghouat pour nous avoir proposé un sujet de mémoire, et pour avoir dirigé et suivi ce travail.*

*Nous adressons toute nos reconnaissances à Monsieur Benaceur Farouk, Maitres de conférences à l'université de Laghouat, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Nous tenons également à exprimer nos gratitude à Monsieur Zerrouki Houcine Mohammed, Maitre*

*Assistant à l'Université de Laghouat d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions également tous nos collègues et nos amis pour leur soutien, leur présence, et leur encouragement.*

*Nous tiendrons à remercier tous ceux qui nous en aidé de près ou de loin.*

# *Sommaire*

---

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| <b>Dédicaces.....</b>              | <b>I</b>   |
| <b>Remerciement .....</b>          | <b>II</b>  |
| <b>Liste des figures .....</b>     | <b>III</b> |
| <b>Liste des tableaux .....</b>    | <b>IV</b>  |
| <b>Liste des abréviations.....</b> | <b>V</b>   |
| <b>Introduction.....</b>           | <b>1</b>   |

## *Synthèse bibliographique*

|  |          |
|--|----------|
| <b>Chapitre I. Généralités sur l'amphotéricine B et ses dérivés.....</b>   | <b>3</b> |
| 1-Définition.....  | 3        |
| 2- caractéristique physico-chimiques de l'amphotéricine B.....   | 3        |
| 3- Les dérivés de l'amphotéricine B.....   | 3        |
| 4-Mécanismes d'actions d'amphotéricine B.....  | 4        |
| 5-Activités biologiques et ses dérivés d'amphotéricine B.....  | 5        |
| 6- Toxicité associée à l'amphotéricine B.....  | 5        |
| <b>Chapitre 2. Généralités sur SARS- CoV-2.....</b>  | <b>6</b> |
| 1-Structure et génome du SARS-CoV-2.....   | 6        |
| 1-1 Génome.....  | 6        |
| 1-2 Structure du virus.....  | 7        |
| 2 Epidémiologie.....   | 7        |
| 2-1 Durée d'incubation.....  | 7        |
| 2-2 Fréquence des formes asymptomatiques.....  | 7        |
| 2-3 Caractéristiques de la population infectée .....   | 8        |
| 2-4 Caractéristiques de la population infectée par le SARS-CoV-2 nécessitant une prise en charge en soins intensifs..... | 8        |
| 2-5 L'évolution du corona virus dans le monde et dans l'Algérie.....   | 8        |

# *Sommaire*

---

|  |   |
|--|---|
| 3 Dissémination.....   | 8 |
| 4 Contamination, infection cellulaire et cycle de réplication..... | 8 |
| 5 Pénétration du virus dans la cellule hôte.....                   | 8 |
| 6 Traitement .....   | 9 |

## *Matériels et Méthodes*

|  |    |
|--|----|
| 1-Matériels .....  | 10 |
| 2- Méthodes .....  | 12 |
| 2-1Préparation des ligands et des protéines.....                                     | 12 |
| 2-2Docking moléculaire.....  | 12 |
| 2.3 Evaluation de la vraisemblance du médicament, ADME / propriétés de toxicité..... | 12 |

## *Résultatset discussion*

|  |    |
|--|----|
| <i>Conclusion</i> .....                  | 17 |
| <i>Références bibliographiques</i> ..... | 18 |

## *Liste des figures*

---

| <b>N°</b> | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|-----------|--|-------------|
| 1         | Structure de l'amphotéricine B.....  | 3           |
| 2         | Le mécanisme d'action de l' l'amphotéricine B.....   | 4           |
| 3         | Structure virale de SARS Cov-2.....  | 7           |
| 4         | Représentation de l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte.....   | 10          |
| 5         | Les mécanismes d'action de quelques médicaments utilisés dans le traitement du COVID-19.....   | 11          |
| 6         | Structure cristalline des protéines cibles, protéase principale (6lu7 ou 3CLPro, PDB code : 6LU7) et la protéine Spike (PDB ID: 6LZG).....                         | 12          |
| 7         | Structure du complexe protéine principale et l'amphotéricine B et ses dérivés : (6LU7-Amphotericine B ; 6LU7-Amphotericine B Méthyl ester ; 6LU7-Chloroquine)..... | 15          |

---

---

| <b>N°</b>  | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|------------|---|-------------|
| Tableau 01 | Comorbidités associées à l'infection à SARS-CoV-2 symptomatique.....  | 8           |
| Tableau 02 | Structures chimiques de l'amphotéricine B et ses dérivé.....  | 10          |
| Tableau 03 | Résultats du docking moléculaire de l'interaction de l'amphotéricine B et l'amphotéricine B méthyl ester et la protéase principale (6LU7.)..... | 16          |

---

**SIDA** : Syndrome d'Immuno Déficience Acquise

**VIH** : Le virus de l'immunodéficience humaine

**TNF**: Tumor Necrosis Factor

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**SARS COV-2** : syndrome respiratoire aigu sévère

**ACE2** : l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2

**IQR** : interquartile range

**IFN** : Les interférons

**CCL2** : Le chemokine ligand 2

**NSP3** : non-structural protéine 3

**TMPRSS2** : La protéase transmembranaire à sérine 2

**SDRA** : syndrome de détresse respiratoire aiguë

**SARS** : syndrome respiratoire aigu sévère

**OMS** : Organisation mondiale de la Santé

**PDB**: Protéine Data Bank

# *Introduction*

La propagation rapide du syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2 (SARS-CoV-2) a conduit à une pandémie de coronavirus 2019 (COVID-19) à travers le monde. Il est considéré comme une source majeure de catastrophe au 21<sup>e</sup> siècle, créant une crise de santé publique et affectant la population mondiale via un manque de thérapies et de directives de traitement établies. Avec sa transmission rapide, même l'utilisation hors autorisation de mise sur le marché des thérapies disponibles a été entravée par une disponibilité limitée (**Moutaouakkil et al. 2020 ; OMS, 2020**).

Il n'y a toujours pas de preuves de haute qualité suffisantes pour établir l'innocuité et l'efficacité d'un médicament expérimental pour le traitement de COVID-19. (**Moutaouakkil et al. 2020**).

Il est important de prévenir la propagation de COVID-19 car il est très contagieux et dangereux pour certaines personnes comme celles dont le système immunitaire est défaillant, les conditions sous-jacentes et les personnes âgées.

Plusieurs études ont été menées sur la découverte de médicaments à effet antiviral sur le Covid-19.

L'amphotéricine B (AmB), qui appartient au groupe des polyènes, présente un large spectre d'activité antimicrobienne contre les champignons et les parasites. Elle détruit les champignons et les protozoaires unicellulaires en se liant préférentiellement à l'ergostérol en raison de son affinité élevée. Un autre mécanisme est par la production de radicaux libres à l'intérieur des champignons ce qui provoque l'épuisement de l'oxygène.

Vue ses effets immunomodulateurs, elle est capable d'induire la production des médiateurs pro-inflammatoires. L'AmB a la capacité de stimuler les réponses immunitaires innées telles que le récepteur (TLR2) et CD14 ainsi que TLR4 amB produit une transcription de cytokines inflammatoires comme l'interleukine-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ), l'IL-1 $\beta$ , en plus des chimiokines (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ), l'oxyde nitrique, les prostaglandines et la molécule d'adhérence intercellulaire-1 à partir de cellules immunitaires murines et innées humaines in vitro, Il a de puissantes propriétés immunomodulatrices sur les cellules hôtes in vitro et in vivo améliorant la réponse immunitaire de l'hôte. Cet effet de l'AmB n'est pas seulement en présence de l'agent pathogène, mais aussi lorsque l'agent causal est absent en stimulant la production de multiples médiateurs du système immunitaire. Cependant, les mécanismes par lesquels AmB active le système immunitaire ne sont toujours pas entièrement compris.

L'AmB et ses dérivés peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires en interférant avec l'état d'activation des macrophages. Elle augmente la production de TNF- $\alpha$  qui mène à la synthèse de super oxyde dismutase, qui produit le substrat de peroxyde d'hydrogène de catalase-like. Les effets défensifs au cours de l'infection ont été corrélés avec ses propriétés immun modulatrices et son activité pro-inflammatoire ce qui améliore l'activité antifongique au niveau des poumons (AL-Khikani, 2020).

L'AmB possède également une activité antivirale contre certain virus enveloppés et non enveloppés. L'utilisation d'une préparation liposomale d'AmB encapsulée pour l'inhibition in vitro du VIH a été évaluée (AL-Khikani, 2020).

Actuellement, l'amphotéricine B est utilisée en association avec les agents antiviraux du Covid-19 pour protéger les malades contre d'éventuelles invasions fongiques causées principalement par *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* (AL-Khikani et al. 2020 ; Song et al. 2020). Plusieurs travaux ont montré l'effet antiviral de l'amphotéricine B et ses dérivés contre certains virus (VIH, virus des encéphalopathies japonaises et virus de la rubéole) (George et al. 1977).

D'après nos connaissances, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet de l'amphotéricine B sur le Covid-19. Pour cela, l'objectif principal de notre travail est de mettre en évidence in Silico de l'effet inhibiteur de l'amphotéricine B et son dérivé, l'amphotéricine B méthyl ester sur la protéase principale (M<sup>Pro</sup> ou 3CL<sup>Pro</sup>, 6lu7) qui représente une des principales cibles thérapeutiques.

Ce manuscrit comporte trois parties. La première partie est consacrée a des généralités sur le Covid-19 et l'amphotéricine B. Le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail sont représentés dans la deuxième partie. Les résultats trouvés seront discutés dans la troisième partie.

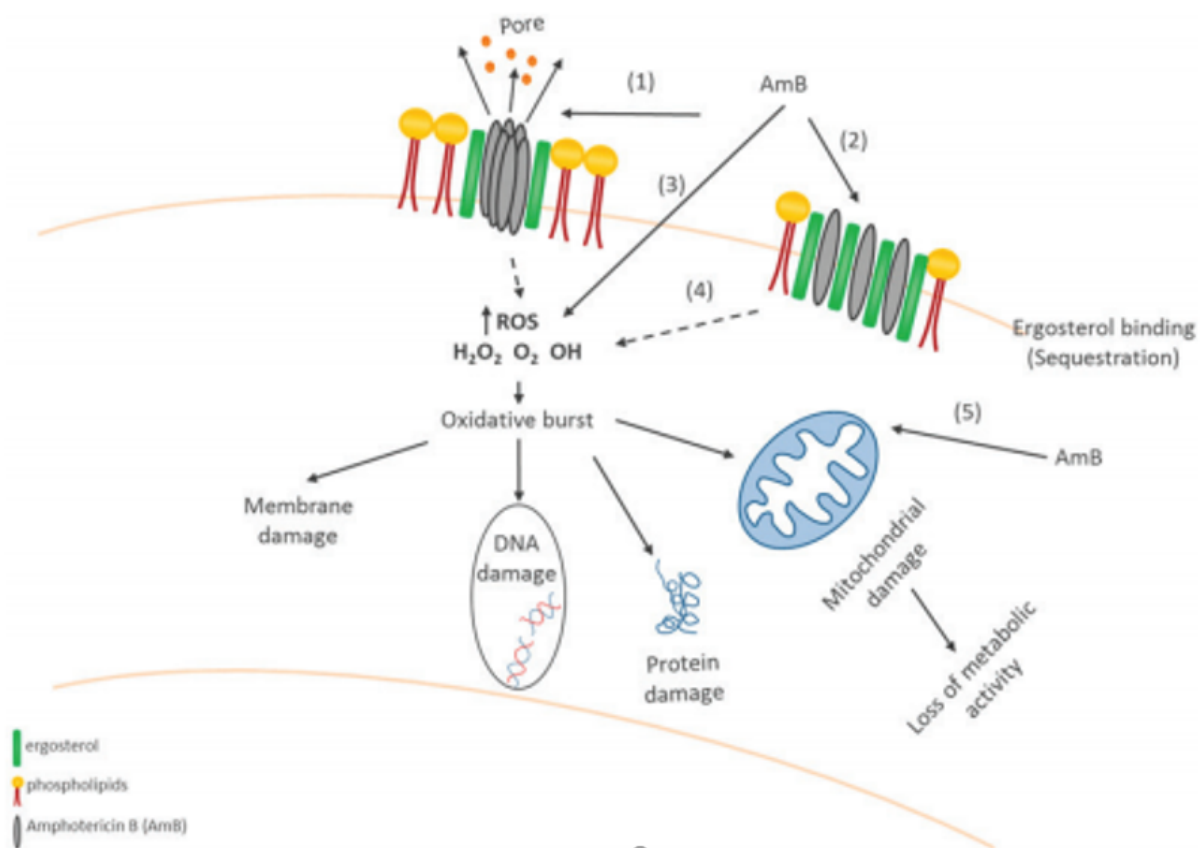
# *Synthèse bibliographique*



Il existe trois formules lipidiques de l'amphotéricine B : l'amphotéricine B liposomale, la dispersion colloïdale d'Amphotéricine B et le complexe lipidique d'Amphotéricine B (AL **Khikani, 2019 ; 2020a, b**).

#### 4. Mécanisme d'action d'amphotéricine B

L'AmB a une action préférentielle sur les champignons en se fixant sur les stérols de leurs membranes, l'ergostérol plutôt qu'au cholestérol membranaire humain, provoquant leurs dysfonctionnements en formant des canaux ioniques poreux. Ce phénomène induit alors une fuite des composants intracellulaires (potassium et magnésium) et inhibition de la glycolyse fongique ce qui augmente l'acidité suivie de la mort des cellules fongiques par la lyse membranaire (AL-**Khikani, 2019 ; 2020a, b**) (Figure 2).



**Figure 2 :** Le mécanisme d'action de l'AmB (AL-**Khikani, 2019 ; 2020a, b**).

L'AmB commence à fonctionner, par l'attachement de la vésicule liposomale aux cellules fongiques dans le site d'infection, donc l'AmB est libérée la vésicule pour adhérer à l'ergostérol de la membrane cellulaire fongique et l'endommager.

D'autre mécanisme, l'amphotéricine B être implique dans la production des radicaux libres à l'intérieur des champignons, et par conséquent à former un appauvrissement en oxygène et un super oxyde anion, et tous cela conduit a affecté les voies cellulaires des champignons.

### **5. Activités biologiques et ses dérivés d'Amphotéricine B**

Les dérivés de l'amphotéricine B sont utilisée comme inhibiteurs de protéases, pour l'obtention de médicaments et destinés en particulier au traitement de l'infection par le VIH. L'amphotéricine B et ses dérivés interagissent avec le cholestérol des membranes cellulaires, ce qui provoque une fluidification de ce derniers, ce mécanisme était responsable de leur activité antivirale, soit par destruction du virus, soit par prévention de sa pénétration dans les cellules cibles (**Hansen et al. 1990**)

L'Amphotéricine B est capable aussi d'inhiber de l'activité transcriptase inverse de certains virus des études ont montré que l'AME exerce un effet antiviral sur le virus de stomatite vésiculaire, sans toxicité (**GEORGE W et al 1978**).

L'Amphotéricine B et son ester méthylique potentialisent l'effet antiviral de certains composés antiviraux suite à l'augmentation de la production de l'interféron.

L'AmB a été utilisé également dans le traitement de l'encéphalite virale japonaise en agissant sur sa réplication (**kim.H et al.2004**).

L'AmB c'est avérée plus efficace dans le traitement de différentes infections fongiques comme les mycoses profondes viscérales ou systémiques causées par les espèces l'*Eishmania*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* (**Zu.Y et al 2014**) touchant majoritairement les personnes immunodépressives sévères et pour prévenir les infections nosocomiales lors d'interventions chirurgicales lourdes telles que les transplantations d'organes (**NCCN**).

### **6. Toxicité associée à l'amphotéricine B**

L'administration de l'amphotéricine B peut être responsable des effets toxiques qui se manifestent par une fièvre, frissons, arthralgies, nausées, vomissements et maux de tête (**Richard J. et al 2013**).

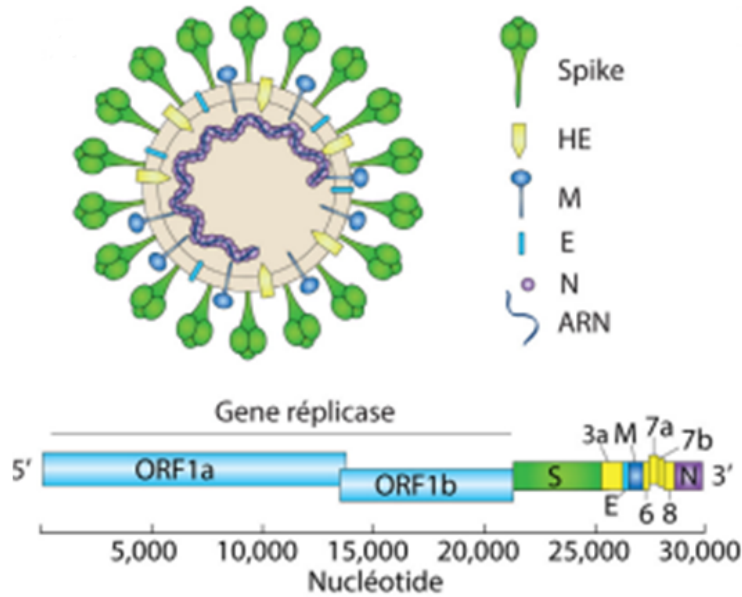
## **Chapitre 2. Généralités sur SARS COV-2**

En décembre 2019, un nouveau coronavirus était identifié dans la ville de Wuhan. En février 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**) attribua le nom de COVID-19 pour désigner la maladie causée par ce virus, initialement appelé nCoV-2019, puis SARS-CoV-2 par le comité international de taxonomie des virus. Selon l'OMS, cette maladie virale est responsable d'un taux de mortalité de 3-4% (**Alsuliman et al., 2020**) et qui touche le plus souvent les personnes âgées plus de 60 ans, les fumeurs et les patients qui souffrent de maladies chroniques telles que le diabète sucré, l'hypertension, les pneumopathies et l'immunodéficience (**Alsuliman et al., 2020**). La rapidité et l'étendue de la propagation virale à travers le monde ont conduit à de nombreuses publications concernant les données cliniques, biologiques et radiologiques.

### **1. Structure et génome du SARS-CoV-2**

#### **1.1 Génome**

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé à ARN monocaténaire avec une polarité positive de 29,9 kb (71) (Figure 3). Les coronavirus ont le plus grand génome parmi les virus d'ARN (~ 30.000 nucléotides). La molécule d'ARN varie de 26 -32 ko et contient au moins six cadres de lecture ouverts (ORR). Le premier ORF (ORF1a/b) comprend environ deux tiers de génome et encode une protéine répliquase qui sera traduit en deux poly protéines, par la suite clivées en seize protéines non structurales indispensables à la réplication virale. Le tiers restant du génome code essentiellement pour les protéines de structures du virus dont quatre glycoprotéines membranaires - la protéine Spike (S), l'Hémagglutinine-Estérase (HE) et les protéines de membrane (M) et d'enveloppe (E) – ainsi que la protéine de capsid (N) (**Bonny et al. 2020**).



**Figure 3** : Structure virale de SARS COVID-2(Bonny et al. 2020).

## 1.2 Structure du virus

La nucléocapside, hélicoïdale, formée de la protéine de capsid (N) complexée à l'ARN viral, est protégée par une enveloppe phospholipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines de surface (S, HE, M et E). La protéine S est la protéine qui lie le répéteur cellulaire du SARS-CoV-2 (ACE2) et permet l'entrée dans la cellule. Elle est formée de deux sous-unités : S1 qui contient le domaine de liaison au récepteur cellulaire, et S2 qui est essentiel pour la fusion du virus à la membrane cellulaire (Bonny et al. 2020).

## 2 Epidémiologie

### 2.1 Durée d'incubation

La durée médiane d'incubation était estimée à 4 jours (Bonny et al. 2020).

### 2.2 Fréquence des formes asymptomatiques

Selon l'étude de 24 patients infectés lors de contacts intrafamiliaux et hospitalisés, 29,2 % de patients ne présentait ni symptômes, ni anomalies scénographiques (Bonny et al. 2020). Les formes asymptomatiques semblent plus fréquente chez l'enfant : estimées à environ 30 % des cas (cf. infra) (Bonny et al. 2020).

### 2.3 Caractéristiques de la population infectée

D'après le Tableau (1), les principales comorbidités retrouvées dans la population hospitalisée étaient l'hypertension artérielle (HTA) (15 à 30 %), le diabète (7,4–19 %) et les pathologies vasculaires (2,5–8 %). Les fumeurs représentaient 6 à 12, 6 % des patients hospitalisés. Cette maladie virale touche plus les hommes que les femmes (**Plaçais et Richier, 2020**).

**Tableau 1** : Comorbidités associées à l'infection à SARS-CoV-2 symptomatique (**Plaçais et Richier, 2020**).

| Comorbidités                      | Guan (n=1099) | Wu (n = 201) | Zhou (n = 191) |
|-----------------------------------|---------------|--------------|----------------|
| Âge (médiane) et IQR <sup>a</sup> | 47 [35–58]    | 51 [43–60]   | 56 [46–67]     |
| Sex-ratio (H/F)                   | 1,4           | 1,8          | 1,7            |
| Exposition préalable <sup>b</sup> | 43,9 %        | 43,9 %       | 38 %           |
| Comorbidité ≥ 1 <sup>b</sup> %    | 23,7          | 38,2 %       | 48 %           |
| Tabagisme actif                   | 12,6 %        | ND           | 6 %            |
| HTA <sup>a</sup>                  | 15,00 %       | 19,4 %       | 30 %           |
| Diabète <sup>a</sup>              | 7,4 %         | 10,9 %       | 19 %           |
| Coronaropathie <sup>b</sup>       | 2.5 %         | < 4 %        | 8 %            |
| BPCO <sup>b</sup>                 | 1.1 %         | < 2,5 %      | 3 %            |
| Cancer                            | 0.9 %         | 0.5 %        | 1 %            |
| IRC                               | 0.7 %         | 1 %          | 1 %            |

IQR : intervalle inter quartile ; H/F : hommes/femmes ; HTA : hypertension artérielle ; BPCO : broncho-pneumopathie obstructive ; IRC : insuffisance rénale chronique ; SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë.

a Associé à la survenue d'un SDRA

b Associé à la mortalité

c Exposition au marché à poissons de Wuhan.

### 2.4 Caractéristiques de la population infectée par le SARS-CoV-2 nécessitant une prise en charge en soins intensifs

Selon cette étude rétrospective de 1591 cas consécutifs hospitalisés en réanimation en Lombardie (Italie), 82 % des patients étaient de sexe masculin, 49 % des patients avaient une

hypertension artérielle chronique, 21 % étaient suivis pour une maladie cardiovasculaire, 17 % pour un diabète, et seuls 8 % pour un néoplasie, 4 % pour une broncho-pneumopathie chronique obstructive, 3 % pour une insuffisance rénale chronique (Plaçais et Richier.2020).

### **2.5 L'évolution du corona virus dans le monde et dans l'Algérie**

Presque 32 millions de personnes ont été contaminées par le coronavirus dans le monde, avec 977181 cas de décès (site de politologue). En Algérie, le nombre de cas contaminés par le Covid-19 est augmenté de façon croissante pour atteindre 50000 le 23 septembre 2020(Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière).

### **3 Dissémination**

Les réservoirs naturels des virus sont les chauves-souris. Les chauves-souris et les oiseaux sont considérés comme les principaux hôtes de l'évolution et de la propagation de coronavirus. Dans le cas du SRAS, les vecteurs animaux étaient les civettes, et dans le cas du SRAS-CoV2- possiblement des serpents et le pangolin (Alsuliman et al. 2020).

### **4 Contamination, infection cellulaire et cycle de réplication**

La transmission interhumaine a entraîné la propagation du virus vers la Thaïlande puis vers d'autres pays, causant une pandémie aujourd'hui (Bonny et al. 2020).

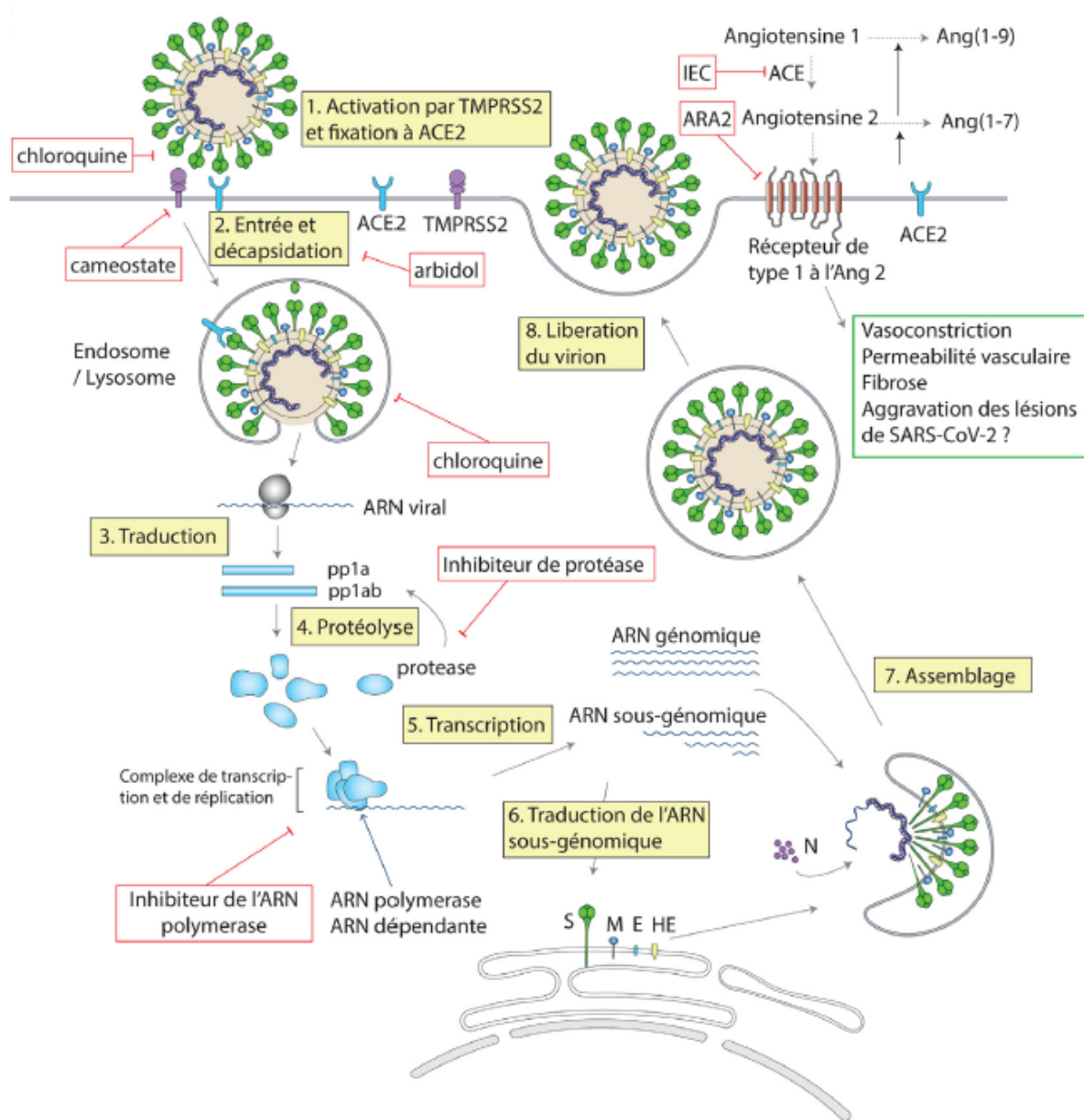
La transmission de SARS-CoV-2 se fait par l'émission de gouttelettes respiratoires. Ces gouttelettes chargées de particules virales pourraient infecter un sujet susceptible soit par contacte directe Les muqueuse (transmission directe) ou bien par le contacte directe des surface infecté par muqueuse nasale, buccale, ou conjonctivales (transmission indirecte).Le virus puisse survivre au moins trois heures après aérosolisation expérimentale ,survivre plusieurs jours sur des surfaces inertes (Bonny et al., 2020 ; Plaçais et Richier, 2020).L'ARN viral a été détecté dans le sang des patients infectés ,et les selles. Le SARS-CoV-2 est capable d'infecter les anthérocytes humain, aujourd'hui n'existe pas de preuve définitive d'une transmission féco-orale significative. De même, malgré l'existence possible d'une virémie, la transmission intra-utérine du virus reste à démontrer à ce jour, bien que quelques cas suspects aient été rapportés (Plaçais et Richier, 2020).

### **5 Pénétration du virus dans la cellule hôte**

La connaissance du cycle viral permet de déterminer les cibles thérapeutiques inhibant sa réplication (Bonny et al .2020).

L'interaction entre la protéine S du SARS-CoV-2 et le récepteur ACE2,après fixation a ACE2, la spicule virale S et coupé en 02 partie S1/S2 par protéase membranaire TMPRSS2 , parmi ces protéase permet la fusion du virus avec membrane plasmique de cellule hôte pour exposer S2 qui s'insère dans la membrane cellulaire et permettant l'endocytose puis la fusion

membranaire. Dans le cas du SARS-CoV2, l'ajout d'un site de clivage furine permet un clivage des sous unités S1/S2 dès la biosynthèse virale et pourrait majorer le potentiel infectant du virus (Figure 4) (Bonny et al., 2020).



**Figure 4** : Représentation de l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte (Bonny et al. 2020)

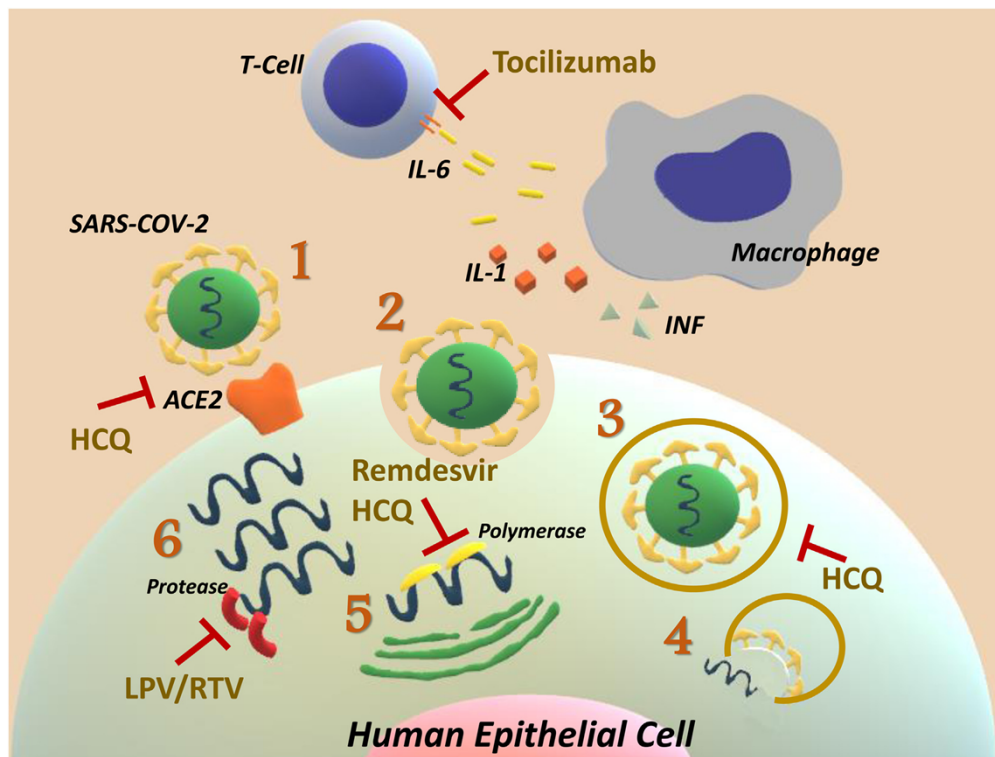
Le cycle de réplication des coronavirus a été largement étudié. Après pénétration par endocytose, la nucléocapside dans le cytosol de la cellule hôte, la machinerie cellulaire traduit l'ARN viral en deux poly protéines (pp1a et pp1ab) sont produite, ils sont clivées par protéase virale en nombreuses protéines indispensables au cycle viral s'assemblant en un large complexe de transcription /réplication.

L'ARN génomique à polarité positive (+) est alors transcrit en ARN viral complémentaire à polarité négative (-), qui sert de matrice à la synthèse d'ARN génomique et sous-génomiques, traduits en protéines structurales.

Finalement les brins d'ARN synthétisés sont combinés avec la protéine N pour former la nucléocapside et l'assemblage avec les glycoprotéines d'enveloppe permet le bourgeonnement de nouvelles particules virales (Bonny et al. 2020).

## 6 Traitement

Plusieurs traitements ont été proposé pour les malades atteints de Covid-19 (Alsuliman et al. 2020). A ce jours, aucun médicament n'a était approuvé pour le traitement de Covid-19. Dans quelques continents, comme les états unies, l'Europe et l'Afrique du sud ont autorisé l'utilisation de la chloroquine et l'hydrox chloroquine pour le traitement de certains cas. En Chine, le lopinavir, le ritonavir et Ribavirin+/- IFN ( $\alpha$ -2  $\beta$ ) ont été utilisé également. Le protocole du traitement du Covid-19 dépend du stade clinique après l'infection virale. Les stratégies thérapeutiques reposent sur l'inhibition des protéases (3CLPro ou MPro, ACE2) et de l'ACE2 indispensables respectivement à la réplication et à la pénétration du virus.

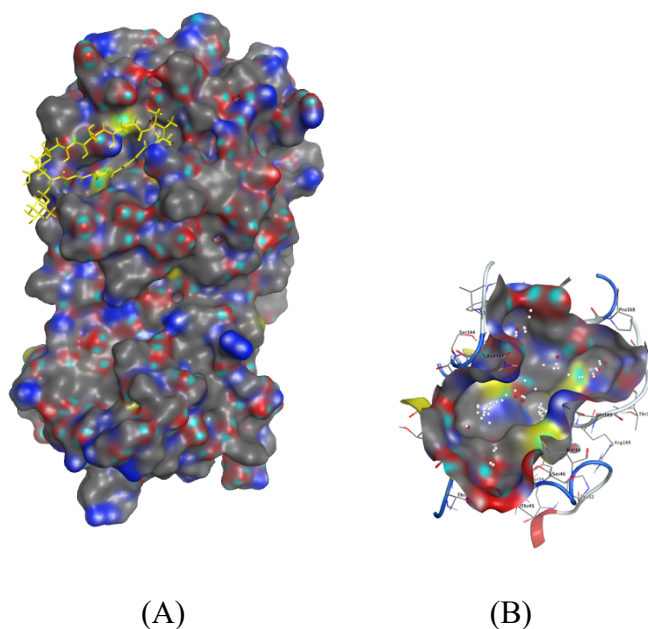


**Figure 5** : Les mécanismes d'action de quelques médicaments utilisés dans le traitement du Covid-19 (Alsuliman et al. 2020).

# *Matériels et méthodes*

## 1. Matériels

Le téléchargement de la protéine cible, protéase principale (6lu7 ou 3CL<sup>Pro</sup>, PDB code : 6LU7) a été fait à partir de la base de données Bookhaven Protéine Data Bank ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)) (Figure 1).



**Figure 6 :** Structure cristalline de la protéines cible, protéase principale (3CL<sup>Pro</sup>, PDB code : 6LU7) liée avec son ligand (N-[(5-METHYLISOXAZOL-3-YL)CARBONYL]ALANYL-L-VALYL-N~1~-((1R,2Z)-4-(BENZYLOXY)-4-OXO-1-{[(3R)-2-OXOPYRROLIDIN-3-YL]METHYL}BUT-2-ENYL)-L-LEUCINAMIDE) (A) et (B) le site d'interaction.

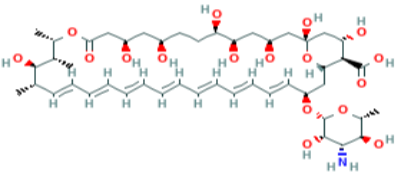
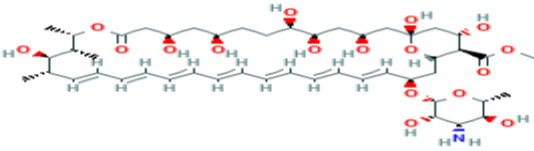
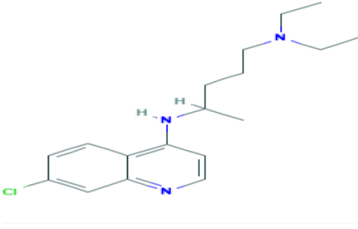
Les structures de l'amphotéricine B et ses dérivés seront téléchargés à partir des bases de données suivantes (Tableau 2) :

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<https://zinc.docking.org/>

La minimisation de l'énergie globale des ligands et l'addition des atomes d'hydrogène à l'aide du programme Avogadro Version 1.1.1.

**Tableau 2 :** Structure chimiques de l'amphotéricine B et ses dérivés.

| Nom                           | Code                   | Structure   |
|-------------------------------|------------------------|---|
| Amphotéricine B               | PubChem CID : 5280965  |   |
| Amphotéricine B, methyl ester | PubChem CID : 11968030 |   |
| Chloroquine                   | PubChem CID : 2719     |  |

## 2. Méthodes

### 2.1 Préparation des ligands et des protéines

La préparation de la protéine cible, la protéine principale du SARS-Cov2 (6lu7) utilisée dans cette étude a été réalisé à l'aide du programme BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020. En utilisant ce programme, les molécules d'eau seront éliminées à partir de la structure cristalline de la protéine principale (6LU7) lié avec son ligand.

La deuxième étape de préparation, consiste à l'addition des atomes d'hydrogène et la charges Kollman ceci à l'aide du programme MOE 2015 (Molecular Operating Environment) et par la suite les ligands seront enregistrés en format PDBQT. Pendant la préparation l'énergie des ligands est minimisée par l'algorithme Gasteiger.

### 2.2 Amarrage moléculaire

L'analyse de l'amarrage moléculaire est réalisée par l'outil MOE 2015 pour déterminer l'énergie d'interaction entre les ligands et les protéines cibles.

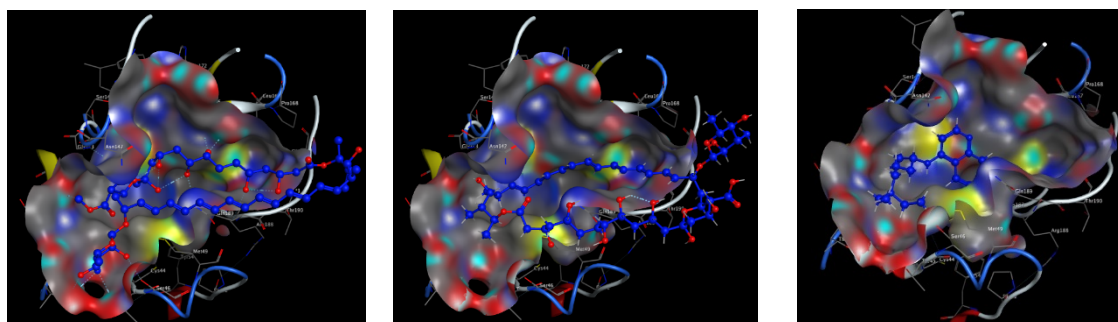
Le même programme est utilisé aussi pour obtenir le grid box en 3D pour la simulation du docking dans lequel le box d'une taille de 40x40x40, et 0,742 Å est créé et centré à ( $x = 13.544$ ,  $y = 12.198$ ,  $z = 67.681$ ) autour des résidus du site actif de la protéine cible 6lu7. De plus, le grid box de la protéine spike est centré à ( $x=-36.921$ ,  $y = 30.66$ ,  $z = 2.967$ ) avec un espacement de 0.503 Å de dimensions de 40 x 84 x 40, pour couvrir le site actif avec les résidus essentiels du site d'interaction.

Les sites d'interaction entre les ligands et la protéine virale 6LU7 seront déterminés par le programme MOE 2015.

## *Résultats et discussion*

## Résultat et discussion

Le screening virtuel a été réalisé, afin d'identifier le potentiel inhibiteur de l'amphotéricine B et l'amphotéricine B méthyl ester comme traitement du COVID-19. D'après la Figure (1), on remarque que les ligands testés se lient parfaitement avec le site actif de la protéase principale (6LU7).



(A)

(B)

(C)

**Figure 07** : Structure du complexe protéine principale et l'amphotéricine B et ses dérivés : (6LU7-Amphotéricine B ; 6LU7-Amphotéricine B Méthyl ester ; 6LU7-Chloroquine).

Les résultats du docking moléculaire ainsi trouvés sont indiqués dans le Tableau (1). Selon Wang et al. (2020), une énergie d'interaction faible indique une forte affinité de fixation entre le ligand et la protéine.

D'après les résultats indiqués dans le Tableau (1), on remarque que l'amphotéricine et son dérivé, l'amphotéricine B méthyl ester ont une affinité élevée par rapport à la chloroquine et peuvent être considérée comme des inhibiteurs potentiels de la protéase virale 6lu7.

Dans l'étude d'amarrage moléculaire, la moindre énergie de liaison a révélé un ancrage plus fort entre les ligands et les cibles virales (Kumar et al. 2020). Les types d'interactions moléculaires, en particulier les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, impliquées entre les molécules de ligands et les résidus du site actif de la protéine cible ont été déterminés, car ils jouent un rôle clé dans donner forme et stabiliser les complexes d'amarrage (Wade & Goodford., 1989).

Des études antérieures montrent que la protéase principale Mpro (6lu7), a une dyade catalytique Cys-His (Cys-145 et His-41) (Qamar et al. 2020).

D'après nos résultats on constate que la MET49 et la GLU166 du site actif de la 6LU7 sont impliqués dans des interactions type hydrogène de l'enzyme avec l'amphotéricine B et l'amphotéricine méthyl ester. Ces acides aminés sont localisés autour de la dyade catalytique constituée de l'HIS41 et CYS145.

## *Résultat et discussion*

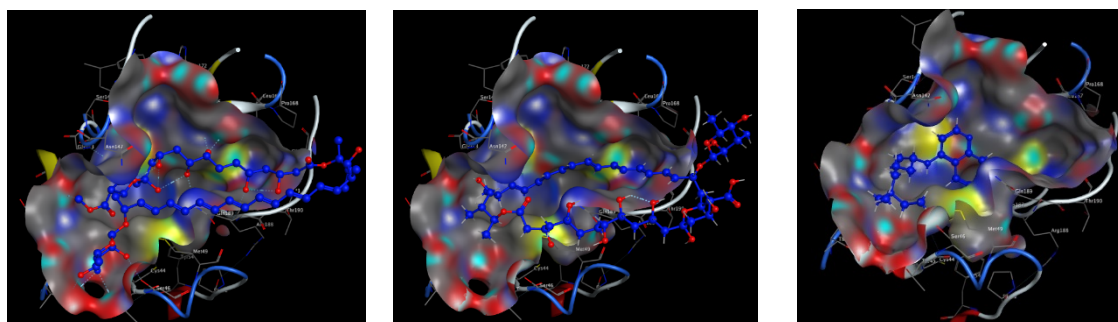
Nos résultats sont en accords avec ceux trouvé par d'autres chercheurs (Das et al., 2020 ; Kumar et al., 2020). Ces auteurs ont trouvé que ces acides aminés sont également impliqués dans la formation du complexe enzyme et composés naturels.

**Tableau 03 :** Résultats du docking moléculaire de l'interaction de l'amphotericine B et l'amphotericine B méthyl ester et la protéase principale (6LU7.)

| <b>Ligand</b>                | <b>Energie libre d'interaction (Kcal/mol)</b> | <b>RMSD (Å°)</b> | <b>Les acides aminés d'interaction-type de liaison</b> |
|------------------------------|---|------------------|--|
| Amphotericine B              | -7,33   | 2,14             | MET49 (donneur-H, GLU166 (Accepteur-H)                 |
| Amphotericine B methyl ester | -7,2  | 2,02             | MET49 (Donneur-H)                                      |
| Chloroquine                  | -6,05   | 1,61             | (GLN149, pi-H)   |

On peu dire, que l'amphotericine B et ses dérivés peuvent être utilisé comme un traitement efficace contre le COVID-19.

Le screening virtuel a été réalisé, afin d'identifier le potentiel inhibiteur de l'amphotéricine B et l'amphotéricine B méthyl ester comme traitement du COVID-19. D'après la Figure (1), on remarque que les ligands testés se lient parfaitement avec le site actif de la protéase principale (6LU7).



(A)

(B)

(C)

**Figure 07** : Structure du complexe protéine principale et l'amphotéricine B et ses dérivés : (6LU7-Amphotéricine B ; 6LU7-Amphotéricine B Méthyl ester ; 6LU7-Chloroquine).

Les résultats du docking moléculaire ainsi trouvés sont indiqués dans le Tableau (1). Selon Wang et al. (2020), une énergie d'interaction faible indique une forte affinité de fixation entre le ligand et la protéine.

D'après les résultats indiqués dans le Tableau (1), on remarque que l'amphotéricine et son dérivé, l'amphotéricine B méthyl ester ont une affinité élevée par rapport à la chloroquine et peuvent être considérée comme des inhibiteurs potentiels de la protéase virale 6lu7.

Dans l'étude d'amarrage moléculaire, la moindre énergie de liaison a révélé un ancrage plus fort entre les ligands et les cibles virales (Kumar et al. 2020). Les types d'interactions moléculaires, en particulier les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, impliquées entre les molécules de ligands et les résidus du site actif de la protéine cible ont été déterminés, car ils jouent un rôle clé dans donner forme et stabiliser les complexes d'amarrage (Wade & Goodford., 1989).

Des études antérieures montrent que la protéase principale Mpro (6lu7), a une dyade catalytique Cys-His (Cys-145 et His-41) (Qamar et al. 2020).

D'après nos résultats on constate que la MET49 et la GLU166 du site actif de la 6LU7 sont impliqués dans des interactions type hydrogène de l'enzyme avec l'amphotéricine B et l'amphotéricine méthyl ester. Ces acides aminés sont localisés autour de la dyade catalytique constituée de l'HIS41 et CYS145.

Nos résultats sont en accords avec ceux trouvé par d'autres chercheurs (Das et al., 2020 ; Kumar et al., 2020). Ces auteurs ont trouvé que ces acides aminés sont également impliqués dans la formation du complexe enzyme et composés naturels.

**Tableau 03 :** Résultats du docking moléculaire de l'interaction de l'amphotericine B et l'amphotericine B méthyl ester et la protéase principale (6LU7.)

| <b>Ligand</b>                | <b>Energie libre d'interaction (Kcal/mol)</b> | <b>RMSD (Å°)</b> | <b>Les acides aminés d'interaction-type de liaison</b> |
|------------------------------|---|------------------|--|
| Amphotericine B              | -7,33   | 2,14             | MET49 (donneur-H, GLU166 (Accepteur-H)                 |
| Amphotericine B methyl ester | -7,2  | 2,02             | MET49 (Donneur-H)                                      |
| Chloroquine                  | -6,05   | 1,61             | (GLN149, pi-H)   |

On peu dire, que l'amphotericine B et ses dérivés peuvent être utilisé comme un traitement efficace contre le COVID-19.

# *Conclusion*

Ce travail avait pour objectif d'étudier *in silico* l'interaction entre l'amphotéricine B et l'amphotéricine B méthyl ester et la protéase principale (Mpro ou 6LU7) du Sars Cov-2, qui représente une des meilleures cibles des médicaments antiviraux utilisés dans le traitement du COVID-19.

Les résultats du docking moléculaire ont montré que l'amphotéricine B, connue pour ses activités antifongiques, est capable de se lier grâce aux liaisons hydrogènes avec LA MET49 localisée au niveau du site actif de l'enzyme virale. De plus, l'amphotéricine B présente une meilleure affinité pour l'enzyme par rapport à la chloroquine.

Les résultats obtenus dans cette étude contribuent sans doute au développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique vue l'absence totale d'un vaccin contre le COVID-19. Il serait envisageable pour compléter cette étude de réaliser des études expérimentales *in vivo*, c'est-à-dire dans le domaine clinique afin de confirmer l'efficacité de l'amphotéricine B comme traitement du COVID-19.

## *Références bibliographiques*

- AL-Khikani (FHO). (2020). Amphotericin B from antifungal to antiviral therapy promising modern therapeutic branch, *Research Results in Pharmacology*, vol .6 ,p .57-65.
- Beaumont, C., Young, G.C., Cavalier, T. (2014). Human absorption, distribution, metabolism and excretion properties of drug molecules: a plethora of approaches. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78, 1185–200.
- Bonny.V , maillard.A ,Mousseaux. C, Plaçais. L , Richier. Q. (2020). *Physiopathologie d'une maladie a plusieurs visages , revue de médecine interne*,vol . 41,p .375 389.
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2017). Swiss ADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7 (1), 1–13.
- George. W, Jordan , Elizabeth.C. (1978). Antiviral Effects of Amphotericin B Methyl Ester, antimicrobial agents and chemotherapy,vol .13,N.2 , p. 199-204.
- Hamill R J. (2013). Amphotericin B Formulations, A Comparative Review of Efficacy and Toxicity, 919: 919–934.
- Hansen. Niels M. John-Erik S. Witzke .Nielsen C. Lars R.Mathiese. Lars S.Teglbjærg .Carsten M.Nielsen . Jens O.Nielsen (1990).Derivatives of amphotericin inhibit infection with human immunodeficiency virus in vitro by different modes of action. vol 14 .page 149-159.
- Kim, H, Seong-J , Sue-Nie P , Jong-Won. O. (2004). Antiviral Effect of Amphotericin B on Japanese Encephalitis Virus Replication, *J. Microbiol. Biotechnol* ,vol 14 ,p 121–127.
- Kumar A , Nilesh , Kumar N , Kushwah ,H. (2020). Calcineurin a immunosuppressant drug and amphotericin-b as antifungal drug both possible efficacy against covid-19, vol 9, p : 873-883
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23 (1–3), 3–25.
- Plaçais. L , Richier. Q. (2020). Caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques chez l'adulte, la femme enceinte et l'enfant. Une mise au point au cœur de la pandémie, *revue de médecine interne*, vol .41,p .308-318.
- Rex JH, Walsh TJ (1999). Editorial Response: Estimating the True Cost of Amphotericin B. *Clin Infect Dis*. Vol 29 ,1408-10.

- Sourav Das, Sharat Sarmah, Sona Lyndem & Atanu Singha Roy (2020) An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, DOI: 10.1080/07391102.2020.1763201
- Tahir Ul Qamar M, Alqahtani SM, Alamri MA, Chen LL. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *J Pharm Anal.* 2020;10(4):313-319. doi:10.1016/j.jpha.2020.03.009
- 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*, 45 (12), 2615–2623.
- Wade R. C., & Goodford P. J. (1989). The role of hydrogen-bonds in drug binding. *Progress in Clinical and Biological Research*, 289, 433–444.
- Wang Jingfang Xu, Xintian , Zhou Xinbo, Chen Ping, Liang Huiying, Li Xuan , Zhong Wu, and Hao Pei. 2020. Molecular simulation of SARS-CoV-2 spike protein binding to pangolin ACE2 or human ACE2 natural variants reveals altered susceptibility to infection. *Journal of General Virology* 2020;101:921–924.
- Zu Y, Sun W, Zhao X, Wang W, Li Y, Ge Y, et al (2014). Preparation and characterization of amorphous amphotericin B nanoparticles for oral administration through liquid ant solvent precipitation. *Eur J Pharm Sci off J Eur Fed Pham Sci.* vol 53:109-117.

**Résumé.** La propagation de la maladie du COVID-19, causée par le nouveau coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2), avait gravement affecté le monde entier. Malheureusement, aucun vaccin ou médicament antiviral efficace n'est actuellement disponible, ce qui laisse la communauté scientifique sous une énorme pression pour lutter contre cette pandémie. Parmi les cibles médicamenteuses prometteuses identifiées et spécifiques à ce virus, se trouve la principale enzyme protéase (Mpro), qui est vitale pour la réplication virale, la transcription et l'interaction avec les cellules hôtes. Dans cette étude, le docking moléculaire de l'amphotéricine B et l'amphotéricine B méthyl ester avec cette enzyme est réalisé afin de déterminer leur effet inhibiteur. L'amphotéricine B a un effet inhibiteur le plus élevée par rapport à la chloroquine avec une énergie libre de fixation de -7.33 kCal/mol. La MET49 et le GLU166 sont les acides aminés essentiels dans l'interaction entre la protéine cible et l'amphotéricine B.

L'amphotéricine B peut être considérée comme un nouveau agent antiviral pour le traitement du COVID-19.

**Mots clés :** Sars Cov-2, COVID-19, Amphotéricine B, Docking.

---

**Abstract.** The widespread of COVID-19 disease, caused by the novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV-2), had severely affected the whole world. Unfortunately, no effective vaccine or antiviral drug is currently available, which leaves the scientific community under enormous pressure to fight this pandemic. Among the promising drug targets identified and specific for this virus is the main protease enzyme (Mpro), which is vital for viral replication, transcription and interaction with host cells. In this study, molecular docking of amphotericin B and amphotericin B methyl ester with this enzyme is performed to determine their inhibitory effect. Amphotericin B has the highest inhibitory effect compared to chloroquine with a free binding energy of -7.33 kCal / mol. MET49 and GLU166 are essential amino acids in the interaction between the target protein and amphotericin B.

Amphotericin B may be considered a new antiviral agent for the treatment of COVID-19.

**Keywords:** Sars Cov-2, COVID-19, Amphotericin B, Docking.

---

**ملخص.** انتشار مرض كوفيد-19، الناجم عن فيروس كورونا المتلازمة التنفسية الحادة الوخيمة (سارس كوفيد-2)، أثر بشدة على العالم بأسره. لسوء الحظ، لا يتوفر حالياً لقاح فعال أو دواء مضاد للفيروسات، مما يترك المجتمع العلمي تحت ضغط هائل لمكافحة هذا الوباء. من بين الأهداف الدوائية الواعدة المحددة لهذا الفيروس هو إنزيم البروتياز الرئيسي (Mpro)، وهو أمر حيوي للتكاثر الفيروسي والنسخ والتفاعل مع الخلايا المضيفة. في هذه الدراسة، تم إجراء الالتحام الجزيئي للأمفوتريسين ب وميثيل استر أمفوتريسين ب مع هذا الإنزيم لتحديد تأثيرهما التثبيطي. أمفوتريسين ب له أعلى تأثير مثبط مقارنة بالكلوروكين مع طاقة ربط حرة تبلغ -7.33 كيلو كالوري / مول. ميثيونين 49 وغلوتامين 166 من الأحماض الأمينية الأساسية في التفاعل بين البروتين المستهدف والأمفوتريسين ب.

يمكن اعتبار الأمفوتريسين ب عاملاً جديداً مضاداً للفيروسات لعلاج كوفيد-19.

**الكلمات المفتاحية:** سارس كوفيد-2، كوفيد-19، الأمفوتريسين ب، الالتحام الجزيئي