

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة عمار ثلجي – الأغواط –
Université Amar TELIDJI Laghouat
كلية العلوم
Faculté des sciences
قسم البيولوجيا
Département de biologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

**Analyse in silico des molécules naturelles et de
synthèse vis-à-vis l'enzyme Lanostérol 14- α -
déméthylase dans le cas de traitement de la candidose**

Présente par :

- ❖ Melle BELARBI Khedidja
- ❖ Melle BENFRIH Freiha
- ❖ Melle NEMEUR Karima

Soutenu publiquement devant les membres de jury :

Président :	LEBOUKH Mourad	MAA Université Laghouat
Examineur :	BOUKEROUIS Djoudi	MAA Université Laghouat
Encadreur :	SIFI Ibrahim	MCA Université Laghouat

Année universitaire 2021 – 2022

Dédicace

*Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur
qu'on dédie du fond du cœur à ceux qu'on aime et qu'on
remercie en expriment la gratitude et la reconnaissance durant
toute notre existence.*

*Je dédie ce modeste travail à mon cher père Djaloul qui a souhaité
vivre pour longtemps juste pour nous voir qu'est-ce que nous allons
devenir que Dieu le protège.*

*A la bougie qui a éclairé mon chemin depuis ma naissance, à celle
dont j'ai prononcé le premier mot, source de ma vie et de mon
bonheur, à ma mère Massouda que Dieu la protège.*

A mes chers frères : Ahmed & Youssef

A mes chères Sœurs : Ahlem, Hind & Hanaa

A tout la famille : NEMEUR & MAIZI.

*A mes très chères copines : Fatima .R, Khadidja.B, Ghania.N et
Feriha.B*

*A ma promotion deuxième année Master et les autres
promotions de biologie.*

*Enfin à tous qui ont participé de près ou de loin pour
l'accomplissement de ce modeste travail*



Karima

Dédicace

Rien n'est aussi à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur à ceux qu'on remercie en expriment la gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.

*je dédie ce modeste travail A mon cher père **Tayeb** qui a souhaité vivre pour longtemps juste pour nous voir qu'est-ce que nous allons devoir que Dieu le protégé.*

*A la bougie qui a éclairé mon chemin depuis ma naissance, à celle dont j'ai prononcé le premier mot, source de ma vie et de mon bonheur, à ma Méré **Abdia** qui Dieu la protège.*

*A mes chers frères : **Messaoud, Youssef et Ameer**.*

*A mes chérés Sœurs : **Fatna, Hanane et Karima***

*A tout la famille : **Ben frih et Arifie***

*A mes très chéries copines : **Karima .N, Fatima .R, Khadija.B, Amina .N kamer .A et Saïda .B***

A ma promotion deuxième année Master et les autres promotions de biologie.

Enfin à tous qui ont participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.



Dédicace

Je dédie ce travail

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

*Particulièrement à **ma chère** mère, pour son amour, sa tendresse, et qui m'a donné toujours l'espoir de vivre.*

*A mon **cher** père pour ses sacrifices, son soutien, grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité.*

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation.

*A ma belle sœur **Wafa** .Mon bonheur est ta présence. Je t'en suis très reconnaissant pour tout.*

*A mes chers frères **Khalil, Abdelfettah et Tarek** pour leur appui et leur encouragements*

*A ma chère amie **Fatima Zohra Baït**, tu es pour moi une sœur, je voudrais se remercier son soutien moral et ton encouragement. Tu me voulais toujours le meilleur. Merci d'être avec moi.*

*A tout la famille : **BELARBI & BOUZIANI***

*A mon fiancé **Ibrahim**, pour tout l'encouragement. Tu étais toujours avec moi, je te remercie de m'avoir jamais déçu.*

A mes chers collègues de ce mémoire

Karima N, Freïha B

Merci d'être toujours là pour moi



Khadidja

Remerciements

Au terme de ce travail, on remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force et la volonté d'entamer et de terminer notre mémoire.

*Tout d'abord, On teint à remercier tout particulièrement notre encadrant **Dr.SIFI IBRAHIM** pour nous avoir et conseillés, et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

On souhaite adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de notre mémoire. et les plus sincères à tous les enseignants du département de biologie durant des études

Nous remercions les membres du jury pour avoir accepté de présider et examiner notre mémoire.

Enfin on teint à exprimer vivement nos remerciement avec une profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation.

Résumé

Notre étude a été effectuée dans le but d'essayer recherche d'un traitement contre la candidose, qui est une infection fongique provoquée par plusieurs espèces de *Candida*, en particulier *Candida albicans*. Ce traitement est basé sur l'inhibition du lanostérol 14 alpha-déméthylase. Et cela se fait à travers les molécules sélectionnées, qui ont été expérimentalement dans le traitement de la candidose. L'objectif principal est d'étude de mode d'action ces inhibiteurs sur la lanostérol 14 alpha-déméthylase plus particulièrement. Sur cette base, nous avons étudié l'interaction entre l'enzyme L-14 α -DM et les (9) composés sélectionnés par l'amarrage moléculaire. Nous avons spécifiquement utilisé deux mesures importantes : l'énergie de liaison, la distance des liaisons entre les composés, et les acides aminés du site actif. Les résultats de docking moléculaire ont montrés que le composé (4), ayant une énergie d'interaction meilleur de -7,03 (kcal/mol) et qui possède une faible toxicité.

Mots clés : La candidose ; La lanostérol 14 alpha-déméthylase ; le Docking moléculaire ; Energie d'interaction.

المخلص

داء المبيضات هي عبارة عن عدوى فطرية تسببها عدة أنواع من "المبيضات"، وخاصة المبيضة البيضاء. في عملنا، حاولنا التركيز على ايجاد علاج داء المبيضات بناءً على تثبيط لانوستيرول 14 ألفا ديميثيلاز. ويتم ذلك من خلال الجزيئات المنتقاة والتي تم استخدامها تجريبياً في علاج داء المبيضات. الهدف الرئيسي هو دراسة طريقة عمل هذه المثبطات على لانوستيرول 14 ألفا ديميثيلاز بالخصوص. بناءً على هذا قمنا بدراسة الارتباط بين الإنزيم لانوستيرول 14 ألفا ديميثيلاز مع تسع مركبات المنتقاة، وذلك عن طريق الارتصاء الجزيئي. لذا اعتمدنا بشكل خاص على مقياسين مهمين: طاقة الربط ومسافة الروابط بين المركبات والاحماض الأمينية المتواجدة في الموقع الفعال للإنزيم. اظهرت نتائج الارتصاء الجزيئي أن المركب (4) لديه طاقة ربط عالية -7,03 ك حريرة/مول والذي يملك سمية منخفضة.

الكلمات المفتاحية: داء المبيضات؛ لانوستيرول 14 ألفا ديميثيلاز؛ الالتحام الجزيئي؛ طاقة الربط.

Abstract

Candidiasis is a fungal infection caused by several species of *Candida*, especially *Candida albicans*. In our work, we have tried to research a remedy for candidiasis based on the inhibition of lanosterol 14-alpha-demethylase. This is done through the selected molecules, which have been experimentally in the treatment of candidiasis. The main objective is to study mode of action these inhibitors on lanosterol 14 alpha demethylase more specifically. On this basis, we studied the interaction between the enzyme L-14 α -DM and the 9 selected compounds through molecular docking. We specifically relied on two important measures: the binding energy, the distance of the bonds between the compounds, and the amino acids of the active site. Molecular docking results showed that the compound (4) have a good interaction energy (-7,03 Kcal/mol), which has low toxicity.

Keywords: Candidiasis; Lanosterol 14 alpha-demethylase; Molecular docking; Interaction energy.

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction.....	1
CHAPITRE I : Rappels Bibliographiques	
1. La Candidose.....	4
2. Généralité de genre <i>Candida</i>	4
2.1. Taxonomie et morphologie.....	4
2.2. Les facteurs favorisant de la candidose.....	5
3. Les antifongiques.....	5
3.1. Les polyènes.....	6
3.2. Analogue nucléotidique.....	8
3.3. Echinocandines.....	9
3.4. Les azolés.....	9
4. L'enzyme lanostérol 14- α -déméthylase.....	11
4.1. Nomenclature de la lanostérol 14- α -déméthylase.....	11
4.2. Structure de la lanostérol 14- α -déméthylase.....	12
4.3. Synthèse des stérols par lanostérol 14 α -déméthylase.....	12
4.4. Les inhibiteurs de la lanostérol 14- α -déméthylase.....	13
CHAPITRE II : Matériel et Méthodes	
1. Micro-ordinateur.....	17
2. Banques des données et serveurs.....	17
2.1. PDB (Protein Data Bank).....	17
2.2. PubChem.....	17
2.3. ADMETlab 2.0.....	18
3. Logiciels utilisés.....	19
3.1. ChemDraw.....	19
3.2. MOE 2015.10.....	20
4. Étude <i>in silico</i>	20
4.1. Présentation des ligands.....	20
4.2. Le site actif de le lanostérol 14 α -déméthylase.....	21
5. Docking moléculaire.....	21
5.1. Les étapes deDocking moléculaire.....	22
5.2. Préparation de l'enzyme.....	23
5.3. Préparation de ligands.....	23
CHAPITRE III : Résultats et Discussions	
1. Résultats de l'étude antérieure (<i>in vitro</i>).....	28
2. Etude des interactions Ligands- L-14 α -DM (5V5Z).....	29
3. L'analyse visuelle des interactions.....	31
4. Résultats ADMET.....	36
Conclusion.....	38
Références bibliographiques.....	41

Liste des abréviations

Å :	Angstrom
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADMET :	Absorption Distribution Métabolisme Excrétion Toxicité
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CYP51 :	Cytochrome P51
3D :	Trois Dimensions
2D :	Deux Dimensions
ERG 11 :	Ergostérol 11
5 FC :	5-fluorocytosine
LDM :	Lanostérol Déméthylation
L-14α-DM :	Lanostérol 14 alpha Déméthylase
MOE :	Molecular Operating Environment
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
PDB :	Protein Data Bank (Banque de donnée protéique)
RMSD :	Root Mean Square Deviation
SIDA :	Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
VIH :	Virus de l'immunodéficience Humaine

Liste des figures

Figure 1 :Mécanisme d'action des antifongiques (Bignon, 2021)	6
Figure 2 : Structure chimique de l'amphotéricine B et la nystatine(Yasuda, 2001).....	7
Figure 3 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B (Accoceberry & Noël, 2006)	8
Figure 4 : Mécanisme d'action des Azolés(Accoceberry & Noël, 2006).....	10
Figure 5 : Structure de La lanostérol 14- α -déméthylase (Code PDB : 5V5Z).....	12
Figure 6 :Voie de la lanostérol 14 α -déméthylase (Cotman et al., 2004).....	13
Figure 7 :Structure des antifongique azolés (Verdier-Lorne, 2018)	14
Figure 8 : L'interface de la page d'accueil du RCSB PDB.....	17
Figure 9 : L'interface d'accueil du PubChem.....	18
Figure 10 : L'interface graphique du serveur ADMETLAB 2.0	18
Figure 11 : L'interface graphique de ChemDraw.....	19
Figure 12 : L'interface de la page d'accueil du MOE.2015.10	20
Figure 13 : Principe du Docking moléculaire.....	22
Figure 14 : Simulation du Docking et Scoring	23
Figure 15 : l'enzyme 5V5Z préparée par MOE 2015.10	23
Figure 16 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (4) en (2D)	31
Figure 17 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (4) en (3D)	31
Figure 18 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (2) en (2D)	32
Figure 19 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand 2 en (3D).....	32
Figure 20 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (9) en (2D)	33
Figure 21 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (9) en (3D)	33
Figure 22 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (8) en (2D)	34
Figure 23 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (8) en (3D)	34
Figure 24 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (3) en (2D)	35
Figure 25 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour Ligand (3) en (3D)	35

Liste des tableaux

Tableau 1: La classification des champignons selon la reproduction (Maruyama <i>et al.</i> , 2005)	5
Tableau 2: Les molécules sélectionnées	21
Tableau 3 : Structure des ligands sélectifs dans le Docking moléculaire.....	24
Tableau 4: Structure des médicaments utilisés dans le Docking moléculaire	25
Tableau 5 : Valeurs de CMI (μM) des molécules isolées et de synthèse contre <i>Candidaalbicans</i>	28
Tableau 6 : Les résultats du Docking moléculaire (Ligands).....	29
Tableau 7 : Les résultats du Docking moléculaire (Standards)	30
Tableau 8 : Les propriétés physico-chimiques pour 5 ligands	36
Tableau 9 : Les propriétés pharmacocinétiques des cinq ligands	36
Tableau 10 : Les résultats de la toxicité potentielle et l'excrétion.....	37

Introduction

La candidose est un regroupement des pathologies ou infections fongiques qui touchent l'être humain sont aussi connues sous le nom de mycoses humaines. Celles-ci ont divers degrés de sévérité, allant d'infections superficielles à des infections invasives et mortelles (**Banerjee et al., 1991**). Elles sont des maladies causées par des champignons microscopiques, les plus fréquemment impliqués dans ces infections, sont les levures opportunistes appartenant au genre *Candida*, la plus communément est *Candida albicans*. Ces infections peuvent être localisées sur différentes muqueuses, comme celles de la cavité buccale, de l'œsophage, du tractus gastro-intestinal ou du vagin, sur l'épiderme ainsi que sous les ongles. (**Le Lay, 2009**).

Malgré l'existence des molécules antifongiques, comme le fluconazole, l'amphotéricine B et l'échinocandine, visant le traitement des infections fongiques, peu d'entre elles sont utilisées aujourd'hui. En effet, l'utilisation des molécules chimiques de synthèse en médecine humaine est limitée à cause de leur toxicité et des effets secondaires qu'elles engendrent. Selon des études épidémiologiques menées dans plusieurs pays, leur incidence a augmenté au cours des deux dernières décennies (**Le Lay, 2009**). Il y a également un développement croissant de la résistance contre les agents antifongiques. L'importance de trouver de nouveaux agents antifongiques naturels moins toxiques devient donc une priorité pour le secteur de la santé.

Parmi les alternatives envisageables, l'usage des molécules considérées comme naturelles, non toxiques et possédant un large spectre d'action, pourrait représenter une solution prometteuse en remplacement des antifongiques traditionnels dans le traitement de pathologies fongiques comme la candidose. Des études effectuées par Van Wyk et son collaborateur, ont examiné le traitement actuel et l'utilisation potentielle de médicaments à base de plantes pour traiter les infections à *Candida albicans*. (**Van Wyk et al., 2018**)

Le fluconazole et l'amphotéricine B sont antifongiques le plus couramment prescrit. Ces composés inhibent l'enzyme lanostérol-14 α -déméthylase (CYP51) responsable de la biosynthèse de l'ergostérol par déméthylation du lanostérol. L'ergostérol est un composant stéroïdien critique des membranes des cellules fongiques (**Marin et al., 2020**).

Notre projet de fin d'étude, vise à proposer un mode d'action contre *Candida albicans*. Les molécules testées *in vitro* par **Van Wyk et al. (2018)**, où ils ont prouvé leurs effets antifongiques contre l'espèce *Candida albicans*, seront utilisées comme des inhibiteurs potentiels de l'enzyme clé lanostérol 14-déméthylase (CYP51), en utilisant la méthode de Docking moléculaire et d'évaluer l'énergie libre entre le ligand et le site actif, ainsi que d'évaluer leurs propriétés pharmacocinétiques par le serveur ADMET.

Le travail de ce mémoire est présenté en trois parties :

- La première partie est une introduction générale dans laquelle nous avons donné un aperçu sur la candidose, relation de lanostérol 14-alpha-déméthylase avec la candidose et le Docking moléculaire.
- La deuxième partie est présente le matériel et les méthodes utilisés, tels que le Docking moléculaire et les propriétés pharmacocinétiques.
- Finalement, tirer une conclusion à partir des résultats obtenus au cours de ce travail.

CHAPITRE I :
Rappels Bibliographiques

1. La Candidose

La candidose est une infection cutanéomuqueuse due à *Candida*. Cette maladie est provoquée par *Candida albicans* en particulier, levure saprophyte et microorganisme relativement résistante dans le milieu extérieur exogène ou endogène. La forme la plus fréquente de candidose est une infection superficielle de la bouche, du vagin ou de la peau. La candidose de la bouche et de l'œsophage est fréquente chez les personnes atteintes du SIDA. La candidose est aussi fréquente chez les personnes traitées par des antibiotiques, car les antibiotiques tuent les bactéries qui vivent normalement dans l'organisme et qui rivalisent avec les *Candida*, ce qui permet aux *Candida* de se développer de façon désorganisé (Ascioglu *et al.*, 2003).

2. Généralité de genre *Candida*

Les *Candida* sont des champignons levuriformes dont l'appareil végétatif peut se présenter sous des formes variées (blastospores ovales de 2 à 5 µm, filaments ou pseudo filaments) et se multipliant par bourgeonnement. Les *Candida* sont habituellement commensaux des muqueuses et de la peau ou peuvent être des espèces environnementales. Certaines espèces peuvent se manifester en tant que pathogène animal. Les infections causées par les espèces *Candida* sont connues sous le nom de candidoses. Mais il existe des noms communs décrivant des pathologies spécifiques telles que le Muguet (candidose buccale), par exemple (Barnett *et al.*, 1990). L'infection existe sous deux formes :

- ❖ Superficielle (cutanée et unguéale, digestive, génito-urinaire),
- ❖ Disséminée ou septicémique (candidose profonde ou candidémie).

La capacité de ces champignons à adhérer au tissu de l'hôte, à sécréter des protéases et des phospholipases, à changer de morphologie et à moduler la défense de l'hôte constitue les déterminants majeurs de sa pathogénicité (Barnett *et al.*, 1990).

2.1. Taxonomie et morphologie

La classification des levures genre *Candida* a beaucoup évolué, selon la reproduction (Tableau 1).

Le genre *Candida* regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de pseudomycélium. *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* ont en plus la capacité de différencier un véritable mycélium. (Maruyama *et al.*, 2005)

Tableau 1: La classification des champignons selon la reproduction (Maruyama *et al.*, 2005)

Reproduction sexuée	Reproduction asexuée
<p>Règne : Champignonne Division : Fungi perfecti Phylum : Ascomycètes Classe : Saccharomycètes Ordre : Saccharomycétales Genre : Candida Espèce : <i>Candida albicans</i>, <i>Candida parapsilosis</i>, ...</p>	<p>Règne : Champignonne Division : Fungi perfecti Phylum : Deuteromycotina Classe : Blastomycètes Ordre : Cryptococcales Famille : Cryptococcaceae Genre : Candida Espèce : <i>Candida albicans</i>, <i>Candida glabrata</i>, <i>Candida parapsilosis</i>, ...</p>

2.2. Les facteurs favorisant la candidose

Les levures du genre candida sont des champignons opportunistes c'est-à-dire qu'ils ne seront pathogènes que chez les patients déjà fragilisés par sa pathologie initiale et par les moyens mis en œuvre pour la traiter. (Tortorano *et al.*, 2004). Le principal facteur de développer une candidose invasive est la neutropénie, qui entraîne une baisse des capacités phagocytaires et qui favorise la colonisation par candida. (Pfaller & Diekema, 2007).

Les facteurs généraux qui favorisent les candidoses sont multiples états pathologiques (diabète, SIDA, leucémie, âge (prématuré, vieillesse) états physiologiques particuliers (grossesse) (Blumberg *et al.*, 2001). Les facteurs locaux tels que l'humidité, la macération, la radiothérapie et l'acidité sont également favorisant. (Zaoutis *et al.*, 2011).

Les principaux facteurs endogènes prédisposant à l'infection par candida sont essentiellement les neutropénies, les dysfonctionnements du système immunitaire, les thérapies aux corticostéroïdes, les transplantations de moelle ou quelque organe, les dysfonctionnements métaboliques ou encore la malnutrition, modification du pH cutané, contact avec un milieu riche en sucre et l'antibiothérapie générale (Garnacho-Montero *et al.*, 2010).

3. Les antifongiques

Les antifongiques ou fongicides sont des médicaments possédant la capacité de traiter les mycoses, c'est-à-dire des infections causées par des champignons microscopiques et levures. (Contet-Audonnet & Schmutz, 2001).

Les classes d'antifongiques sont disponibles les polyènes (*Amphotéricine B* et *Amphotéricine B liposomal*) les dérivés azolés (*Fluconazole*, *Voriconazole* et *Isavuconazole*) les échinocandines (*Caspofongine*, *Micafungine*, ...) (Contet-Audonneau & Schmutz, 2001). Ces antifongiques existent les fongistatiques (azolés) et les fongicides (polyènes, échinocandines) (Contet-Audonneau & Schmutz, 2001).

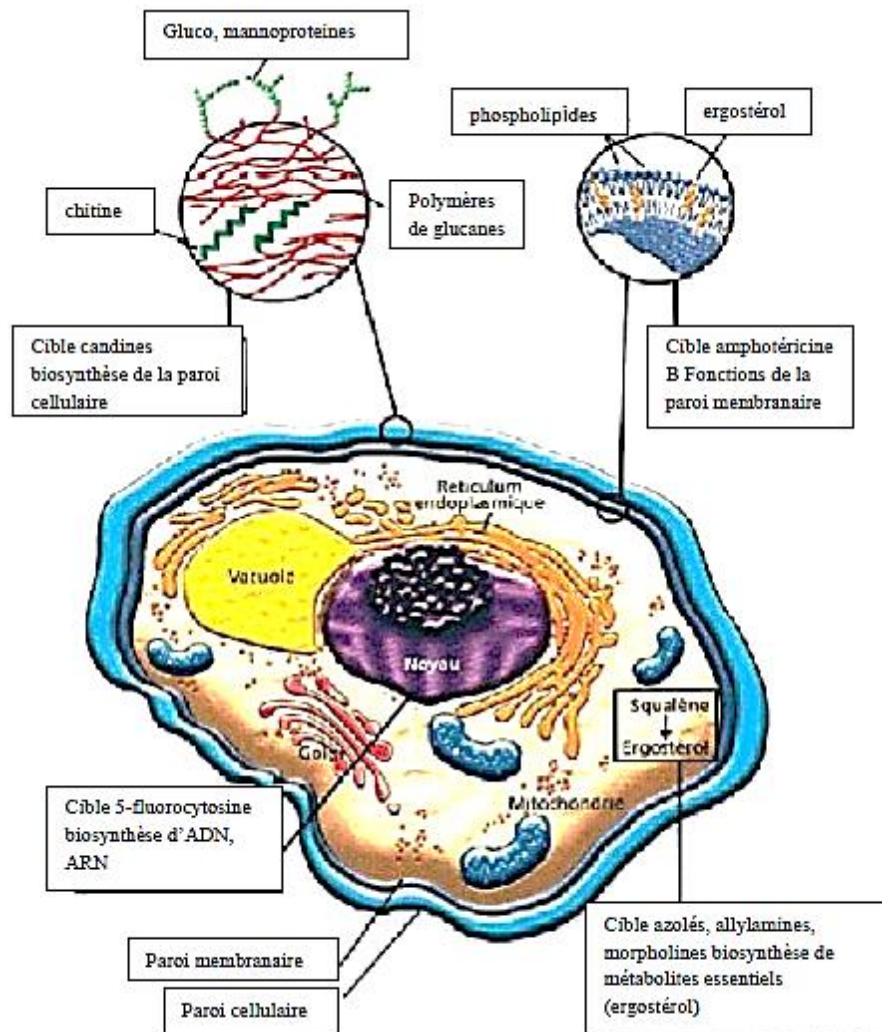


Figure 1 : Mécanisme d'action des antifongiques (Bignon, 2021)

3.1. Les polyènes

Amphotéricine B

L'amphotéricine B (figure 2) est fongicide, représente la première antifongique de la famille des macrolide polymérique d'administration intraveineuse (IV) (Yasuda, 2001). Le principal mécanisme d'action de l'amphotéricine B se lie de façon covalente à l'ergostérol nécessaire à l'intégrité de la membrane cellulaire pour former des pores ou des canaux causant une dépolarisation de la membrane plasmique et augmentation de la perméabilité

cellulaire avec perte du contenu cytoplasmique, la fuite des ions Na^+ , K^+ et H^+ et des molécules intracellulaires, lequel les électrolytes vont transiter de façon incontrôlée et provoque la mort de la cellule fongique (Accoceberry & Noël, 2006). L'utilisation de l'amphotéricine B particulièrement difficile dans la pratique clinique à cause de sa toxicité rénale et des troubles métaboliques (Yasuda, 2001).

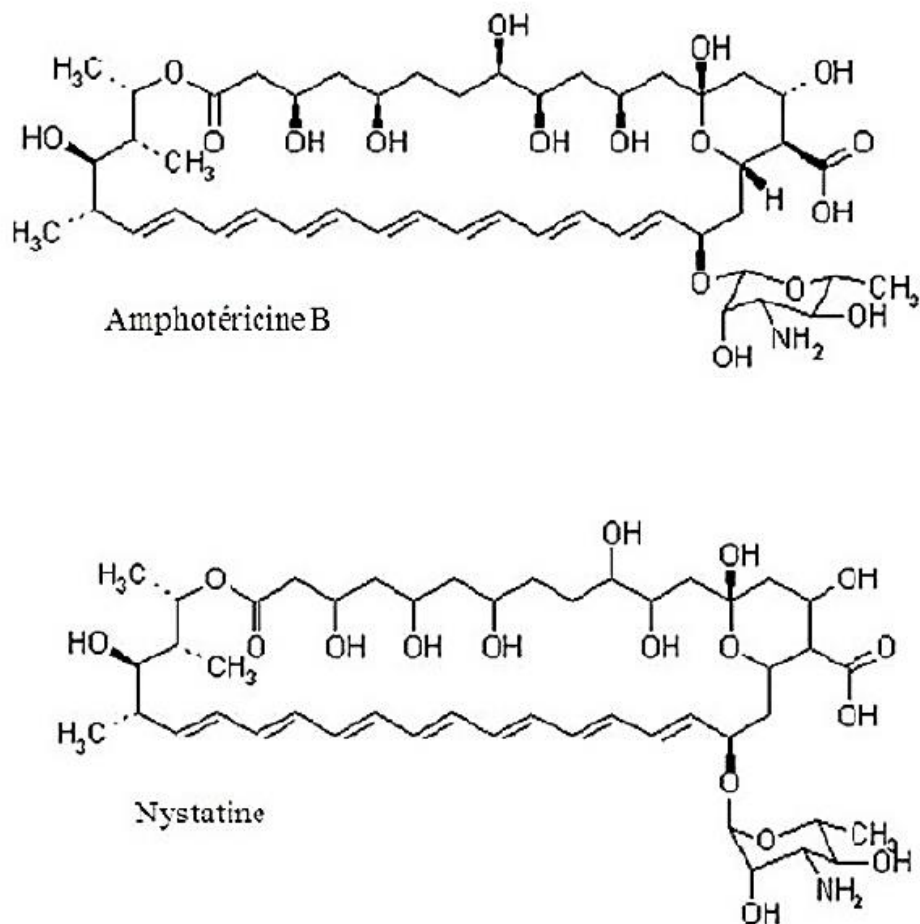


Figure 2 : Structure chimique de l'amphotéricine B et la nystatine (Yasuda, 2001)

Mécanisme d'action

Ces molécules interagissent avec l'ergostérol, une molécule constituant la paroi des champignons. Les polyènes forment des pores dans la paroi du champignon ce qui provoque la sortie de potassium et de sodium du cytoplasme fongique (figure 3). La structure chimique est composée d'une chaîne carbonée cyclique de forme rectangulaire avec d'un côté une zone hydrophile conférée par le port sur la chaîne carbonée de groupements hydroxyles et de l'autre côté une zone hydrophobe composée paroi explique

l'action fongicide des polyènes d'une chaîne carbonée avec des doubles liaisons. Des molécules d'amphotéricine ou de nystatines s'associent entre elle pour former un pore dans la paroi fongique, la zone hydrophobe étant en contact avec la membrane fongique et la zone hydrophile formant l'une des parois du port hydrophile(Accoceberry & Noël, 2006).

Mode d'action de l'amphotéricine B (AmB)

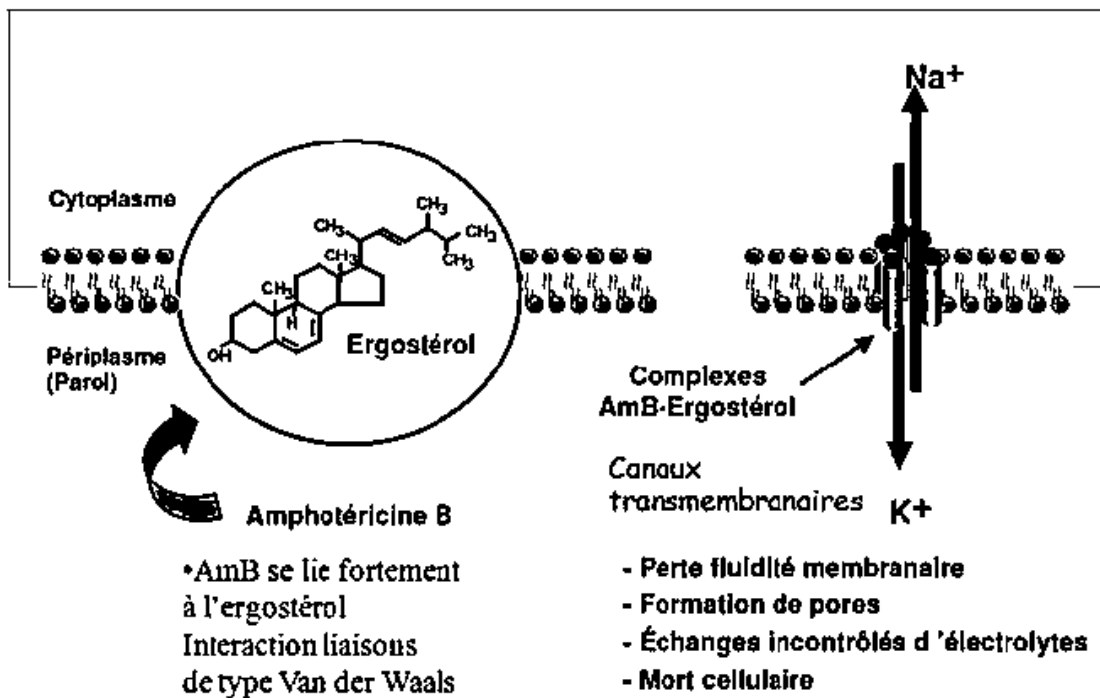


Figure 3 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B (Accoceberry & Noël, 2006)

3.2. Analogue nucléotidique

La flucytosine ou 5-fluorocytosine (5-Fc) est une pyrimidine fluorée et analogue de la cytosine produisant des inhibiteurs spécifiques de la synthèse de l'ADN et de l'ARN(Mactaggart & Wong, 2002). Son exercice une action antimétabolique selon deux voies :transformé en 5-fluorouridine triphosphate il inhibe la synthèse protéiques en incorporant à l'ARNm à la place de l'uridine ; transformé fluorodéocytidine monophosphate il inhibe la thymidylate synthétase enzyme nécessaire à la synthèse de thymidine et donc la répliation de l'ADN (Groll *et al.*, 2001).

L'association utilisée entre l'amphotéricine B et le fluconazole, la flucytosine agissent en synergie contre des espèces fongiques, le *Cryptococcus neoformans* et la *Candida albicans*(Vermes *et al.*, 2000).

3.3. Echinocandines

Sont des molécules commercialisées et indiquées dans le traitement de candidose : la caspofungine et la micafungine , la composition clinique d'une chaîne latéral plus longue qui détermine le spectre d'activité de la molécule et d'une court chaîne hydroxylée (**Odds et al., 2003**).

Mécanisme d'action

Les échinocandines inhibe l'enzyme $\beta(1,3)$ -glucane-synthase ce qui empêche la synthèse des glycannes de la paroi fongique. Les échinocandines déstabilisant la structure de la paroi ont des propriétés fongicides. Les champignons qui possèdent dans leur parois une majorité de polymère de glycanne lié par des positions $\beta(1,3)$ sont les plus sensibles aux échinocandines. Les levures et les champignons filamenteux sont sensibles aux échinocandines. Les basidiomycètes qui possèdent des glycannes liés par des position $\beta(1,6)$ sont peu affectés par les échinocandines(**Sibrac-Pelayo, 2013**).

3.4. Les azolés

Les azolés sont les médicaments de 1^{ère} intention pour traiter une infection fongique (**Terrell, 1999**). Ce sont des substances entièrement synthétiques, elles sont utilisées depuis le milieu des années 1960 (**Vandeputte et al., 2012**). Ils se caractérisent par leur noyau azolé, celui-ci peut contenir :

- ✓ 2 atomes d'azotes : ce sont les imidazolés (miconazole, kétoconazole...)
- ✓ 3 atomes d'azotes : ce sont les triazolés (itraconazole, fluconazole, voriconazole...)

La présence d'un noyau triazolé permet d'augmenter la spécificité d'action de l'antifongique (**Terrell, 1999**).

Les imidazolés sont bien absorbés par voie orale mais ils sont hépatotoxiques. De plus, ils interagissent avec de nombreux autres médicaments ce qui rend leur utilisation limitée. Les triazolés présentent une meilleure tolérance. Les azolés sont des antifongiques à large spectre d'action (**Vandeputte et al., 2012**).

Mécanisme d'action

Les dérivés imidazolés sont des inhibiteurs de la synthèse d'ergostérol, l'un des constituants de la membrane cytoplasmique fongique. L'ergostérol contribue à la fluidité et au maintien de la membrane plasmique des cellules fongiques. La biosynthèse de

l'ergostérol comprend plus de 20 étapes avec intervention de plusieurs enzymes. C'est une enzyme du cytochrome P450, la 14 α stérol déméthylase Erg 11p (produit du gène ERG 11) qui est la cible des azolés. Cette enzyme est impliquée dans la voie de biosynthèse des stérols. Elle permet la déméthylation du lanostérol en 14 α . L'inhibition de cette enzyme entraîne une diminution de la synthèse d'ergostérols et une accumulation de stérols méthylés précurseurs de l'ergostérol ce qui entraîne un ralentissement de la croissance des cellules fongiques (figure 04). A la différence de l'amphotéricine et de la 5-fluorocytosine, les antifongiques azolés sont fongistatiques mais pas fongicides. Les antifongiques aux noyaux triazolés présentent une plus grande affinité pour le site actif de la 14- α stérol déméthylase, on constate donc une augmentation de l'efficacité de ces antifongiques(Accoceberry & Noël, 2006).

Mode d'action des azolés

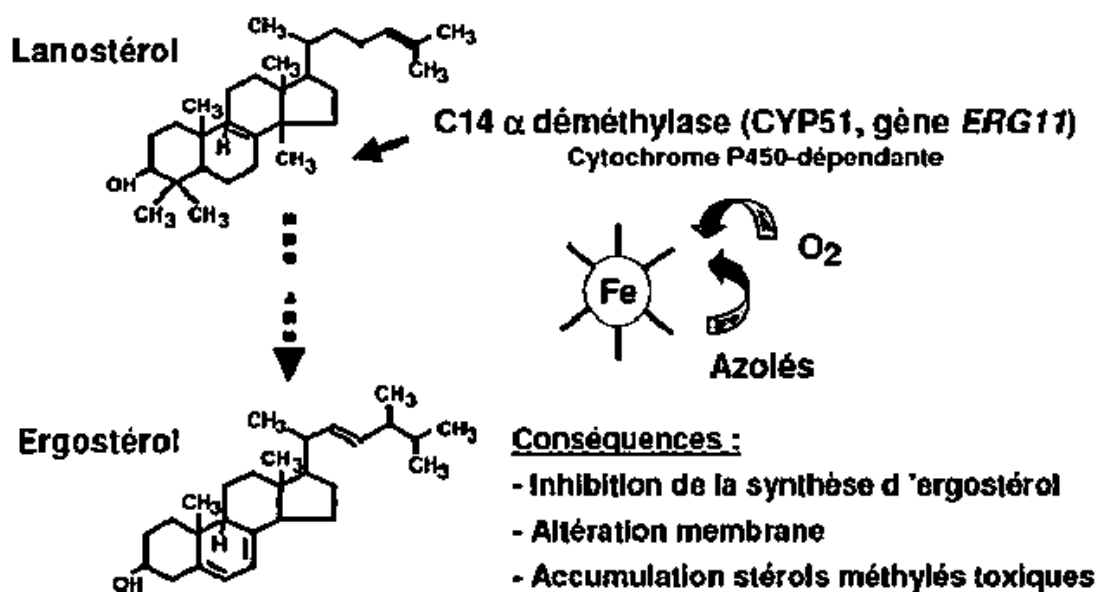


Figure 4 : Mécanisme d'action des Azolés(Accoceberry & Noël, 2006)

4. L'enzyme lanostérol 14- α -déméthylase

Les CYPs (monooxygénases du cytochrome P450) sont formés un grand groupe d'enzymes présentes dans la plupart des organismes, des bactéries aux mammifères. Selon leur fonction : les CYPs peuvent devenir des enzymes qui métabolisent un grand nombre de médicaments mais également des substances endogènes (stéroïdes, eicosanoïdes, vitamines...). Ces enzymes jouent un rôle majeur dans voies biosynthétiques clés (genèse des stéroïdes). L'isoenzyme 51 du cytochrome P450 (CYP51/lanosterol-14- α -déméthylase) est une famille de monooxygénases phylogénétiques avec une fonction conservée à travers les animaux, les champignons, les plantes, les humains et les mycobactéries, dans la synthèse des stérols essentiels. Chez les mammifères, il est exprimé dans de nombreux tissus différents. Dans les plantes, il fonctionne dans une voie métabolique spécialisée liée à la défense. CYP51 est également trouvé dans plusieurs espèces bactériennes. (Trösken *et al.*, 2006).

Bien que la lanostérol 14 α -déméthylase soit présente dans une grande variété d'organismes, cette enzyme est étudiée principalement dans le contexte des champignons, où elle joue un rôle essentiel dans la médiation de la perméabilité membranaire. De plus Le CYP51 catalyse l'élimination oxydative du 14-méthyl (C-32) du lanostérol, pour produire un précurseur important qui est finalement converti en ergostérol, un composé stéroïdien critique de la membrane cellulaire fongique, dont il modifie la perméabilité et la rigidité des membranes plasmiques de la même manière que le cholestérol chez les animaux (Can *et al.*, 2017).

4.1.Nomenclature de la lanostérol 14- α -déméthylase

La nomenclature CYP est la convention de dénomination officielle, bien que parfois CYP450 ou CYP450 soit utilisé comme synonyme. Cependant, certains noms de gènes ou d'enzymes des CYP peuvent différer de cette nomenclature, indiquant l'activité catalytique et le nom du composé utilisé comme substrat. lanostérol 14- α -déméthylase, parfois abrégé officieusement en LDM selon son substrat (Lanosterol) et activité (DeMéthylation) (Cotman *et al.*, 2004).

- ✓ Nom recommandé : *Lanostérol 14- α -déméthylase*
- ✓ Nom court: *LDM*
- ✓ Autres noms : *CYP51, Cytochrome P450 51, Lanostérol 14-déméthylase.*

4.2. Structure de la lanostérol 14- α -déméthylase

En général, tous les cytochromes P450 présentent une structure secondaire et tertiaire très similaire, sauf que la structure de la 14 α -déméthylase varie considérablement d'un organisme à l'autre. Ceux-ci comprennent les résidus dans l'hélice B', la boucle B' / C, l'hélice C, l'hélice I, la boucle K / β 1-4 et le brin β 1-4 responsables de la formation de la surface de la cavité de liaison du substrat. Les modèles d'homologie indiquent que les substrats migrent de la surface de la protéine au site actif enterré de l'enzyme par un canal formé en partie par l'hélice alpha A' et la boucle β 4. (Tili, 2019)

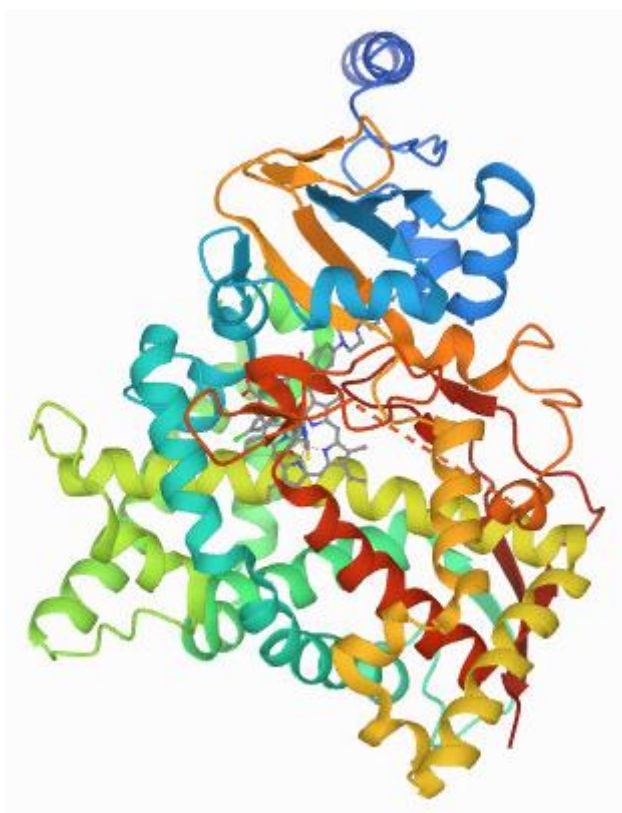


Figure 5: Structure de La lanostérol 14- α -déméthylase (Code PDB : 5V5Z)

4.3. Synthèse des stérols par lanostérol 14 α -déméthylase

Les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 sont généralement situées dans tous les organismes vivants, à différents niveaux de localisation cellulaire : dans le cas des procaryotes, les CYPs sont des protéines cytosoliques, tandis que chez les eucaryotes, ils sont membranaires, localisés dans différents compartiments cellulaires. Ainsi, on distingue les P450s mitochondriaux, les P450s microsomaux, fixés aux

membranes du réticulum endoplasmique (RE), et les cytochromes plastidiaux chez les végétaux.

La L-14 α -DM est un cytochrome p450 microsomal qui, se déroule en trois étapes (figure 6), chacune nécessitant une molécule d'oxygène et deux équivalents réducteurs dérivés du NADPH. Au cours des deux premiers cycles, qui sont des monooxygénations P450 typiques, le groupement 14 α -méthyle est transformé successivement en 14 α -carboxyalcool puis en 14 α -carboxyaldéhyde. Dans l'étape finale, le NADPH et l'oxygène moléculaire, élimine le 14 α - groupe méthyle du lanostérol pour donner le produit déméthylé (4,4-diméthyl-5 α -cholesta-8,14,24-diène-3 β -ol)(Cotman *et al.*, 2004).

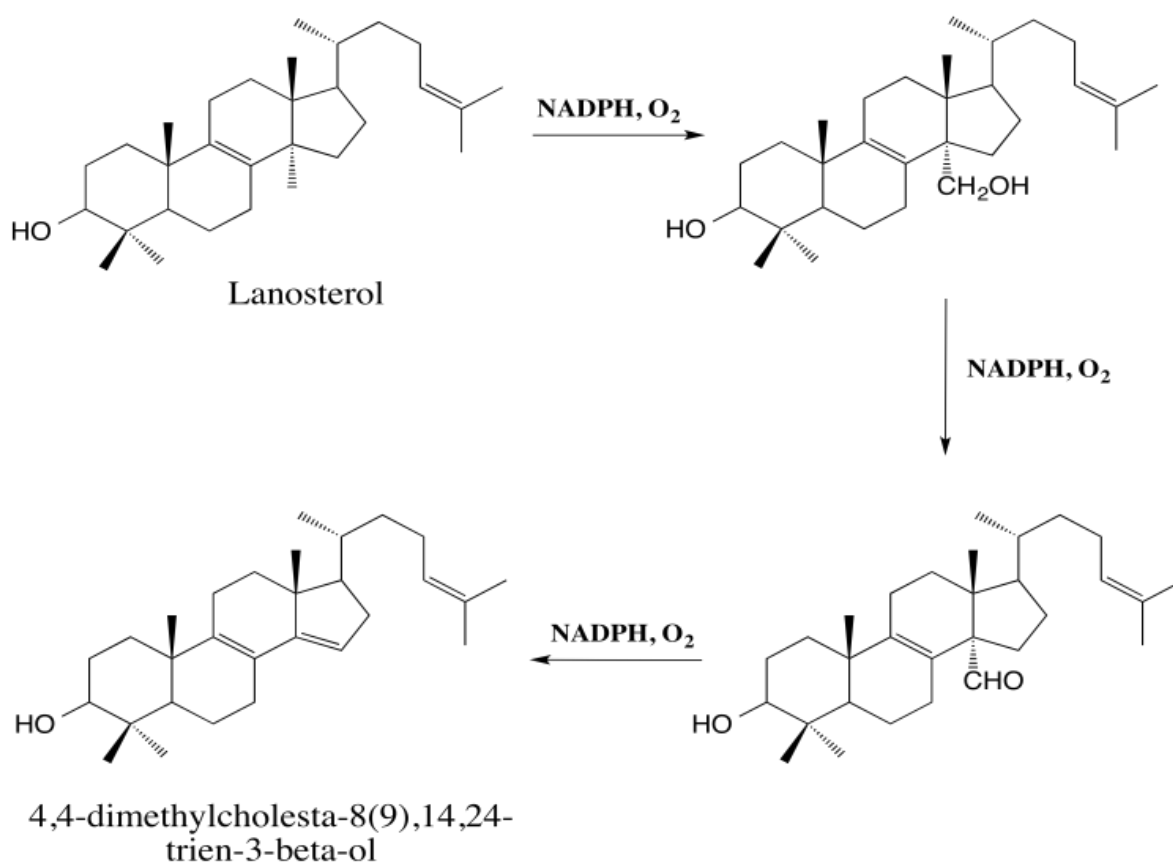


Figure 6 :Voie de la lanostérol 14 α -déméthylase (Cotman et al., 2004)

4.4.Les inhibiteurs de la lanostérol 14- α -déméthylase

Comme un sujet intéressant pour les études fondamentales sur le P450, le CYP51 a aussi une grande importance pratique en tant que cible de médicaments. L'inhibition de l'activité de la lanostérol 14- α -déméthylase empêche la biosynthèse des stérols, qui est mortelle chez les organismes unicellulaires, affecte la croissance des plantes et les processus de développement et réduit la production de cholestérol endogène chez les

animaux. Bien que les inhibiteurs du CYP51 soient largement étudiés comme herbicides et médicaments hypocholestérolémiants, ils sont surtout utilisés comme fongicides pour traiter les mycoses humaines (antifongiques cliniques) et pour prévenir les infections d'origine alimentaire (antifongiques agricoles) (Lepesheva & Waterman, 2007).

En raison de la résistance aux médicaments, augmentation mondiale de l'incidence des infections fongiques opportunistes en raison du nombre croissant d'hôtes immunodéprimés (infection par le VIH, chimiothérapie anticancéreuse, transplantation d'organes et de moelle osseuse) et de patients atteints d'infections telles que la tuberculose, etc. Il y a une demande croissante pour les inhibiteurs du CYP51. Parmi ces inhibiteurs la famille des azolés est la plus grande famille de médicaments antifongiques, que l'on peut diviser en deux groupes selon leur structure chimique : les **triazolés** et les **imidazolés** (figure 7). Malgré un mécanisme d'action pharmacologique commun, ils sont caractérisés par des indications et des paramètres pharmacocinétiques variables(Verdier-Lorne, 2018).

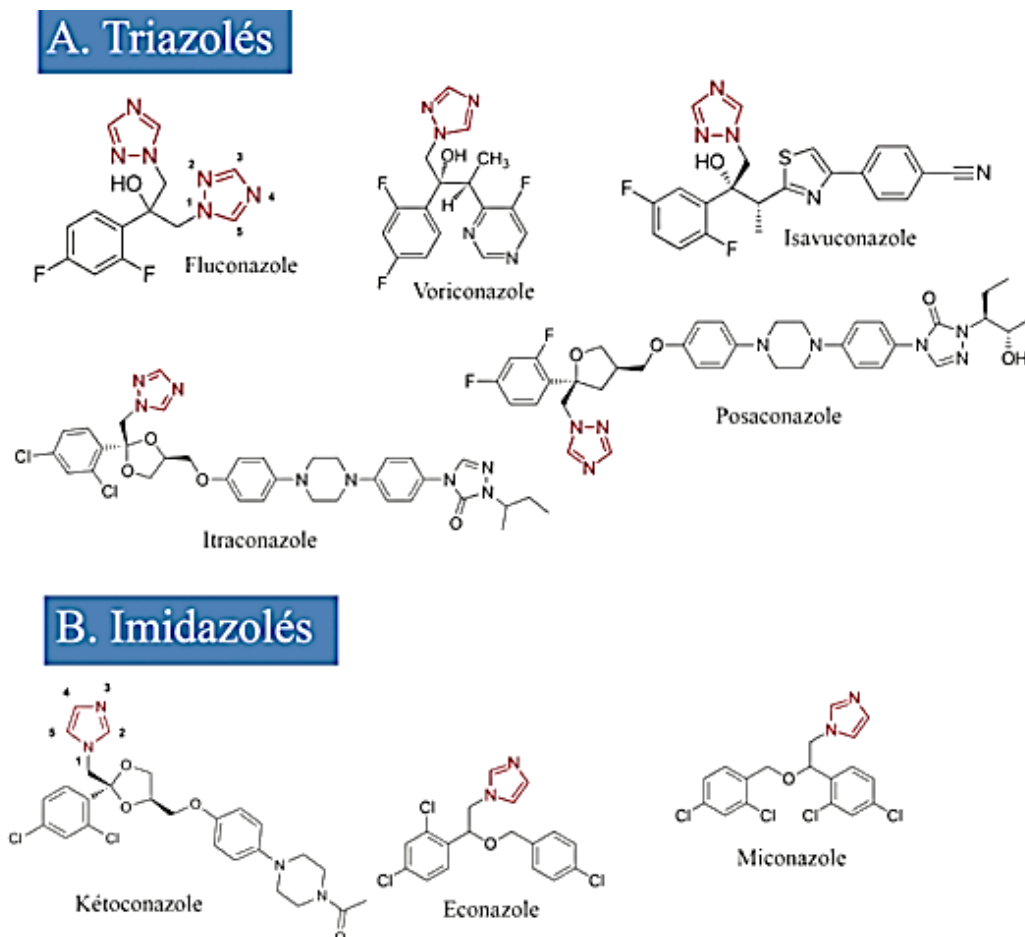


Figure 7 :Structure des antifongique azolés (Verdier-Lorne, 2018)

Ces composés sont des inhibiteurs de la lanostérol 14- α -déméthylase qui forme un complexe avec le cytochrome P-450 des mitochondries fongiques. L'inhibition de cette enzyme induit une déplétion d'ergostérol (diminution de la conversion du 14- α -méthylstérol en ergostérol) accompagnée par l'accumulation de 14- α -méthylstérol dans les cellules entraînant un changement de la fluidité membranaire. Ceci induit une diminution de la croissance de la cellule fongique et la mort de celle-ci (**Hamoir et al., 2001**).

Les azolés sont moins toxiques que les autres médicaments antifongiques, peu coûteux et largement disponibles, mais ont plusieurs désavantages. Leur usage à long terme peut inhiber d'autres enzymes P450 et entraîner une résistance permettant aux médicaments de tolérer l'agent pathogène (**Verdier-Lorne, 2018**).

Les raisons possibles de résistance sont :

- ✓ Des mutations dans le CYP51 fongique
- ✓ Une augmentation de l'expression du gène CYP51
- ✓ Un efflux d'azolé plus rapide ou une perméabilité diminuée

Il y a une autre classe des antifongiques agissant sur la membrane des champignons : Les **polyènes** sont des macrolides comportant un cycle lactone et une chaîne carbonée avec des doubles liaisons conjuguées. Les deux principales substances de ce groupe sont l'amphotéricine B et la nystatine. L'amphotéricine B interagit avec l'ergostérol présent dans la membrane des levures et des champignons sensibles pour former des pores, canaux perméables aux cations comme le potassium qui sort du cytoplasme. L'amphotéricine B agit sur tous les microorganismes dont la membrane est riche en ergostérol, comme *Candida*. Administrée par voie buccale, son absorption est très faible et elle est surtout utilisée dans le traitement des candidoses digestives (**Abdellatifi, 2011**).

CHAPITRE II :
Matériel et Méthodes

1. Micro-ordinateur

Lors de notre étude, nous avons utilisé un micro-ordinateur où tous les programmes utilisés ont été installés sous système d'exploitation Windows 10 professionnel (64 bits). Cemicroordinateur possède une mémoire vive de 8Go et un processeur 2,20 GHz AMD A8-7410 APUwith AMD Radeon R5 Graphics.

2. Banques des données et serveurs

2.1. PDB (Protein Data Bank)

La PDB « Protein Data Bank » est la principale source de données structurales de macromolécules biologiques qui permet de consulter et de télécharger gratuitement les structures 3D des protéines biologiques via son site web : <https://www.rcsb.org/pdb/>

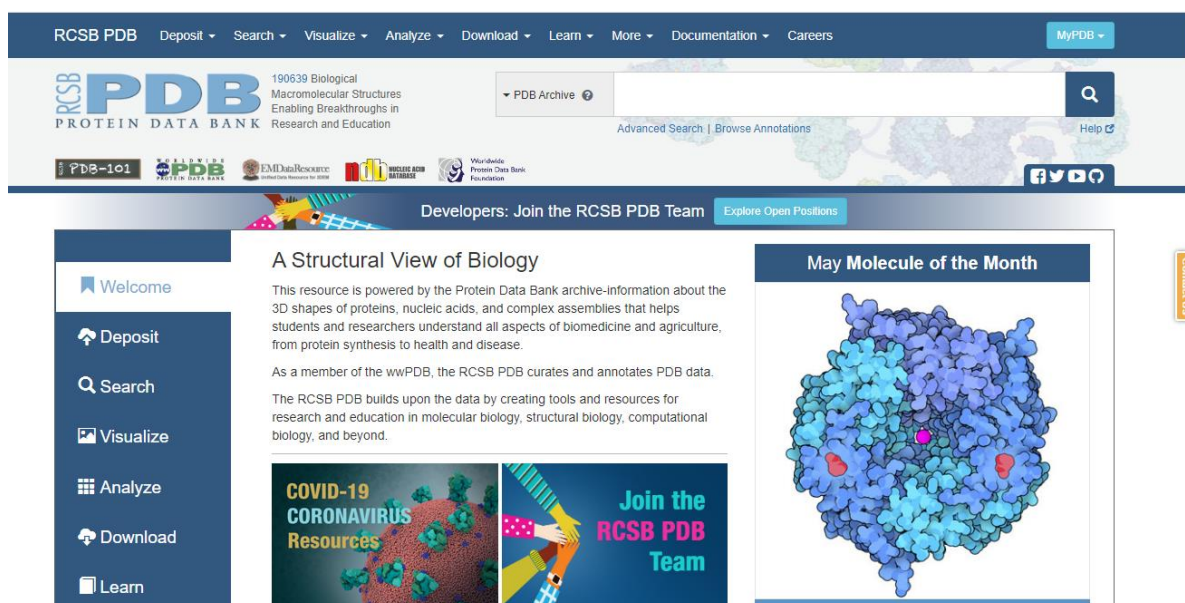


Figure 8 : L'interface de la page d'accueil du RCSB PDB

2.2. PubChem

C'est un système important, servant de source d'informations chimiques pour la recherche scientifique. Pour la recherche et le téléchargement des similaires de l'inhibiteur de la lanostérol 14 α -déméthylase ; on a utilisé cette base de données. Les différentes conformations tridimensionnelles des modèles proposés par la PubChem sont téléchargeables sous l'extension .sdf. Ces fichiers ont été par la suite convertis au format

.pdb à l'aide du programme « Open Babel ». On peut consulter cette base de données via le lien : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

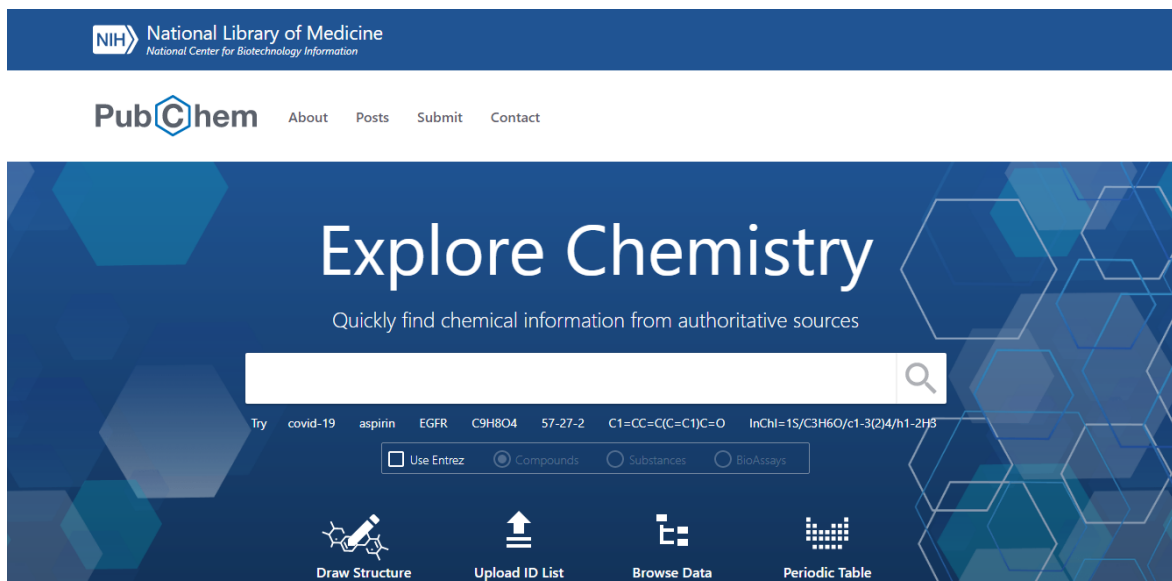


Figure 9 : L'interface d'accueil du PubChem

2.3. ADMETlab 2.0

C'est un serveur web gratuit qui calcule les paramètres physicochimiques et prédit les paramètres pharmacocinétiques et de toxicité des molécules sélectionnées par Docking moléculaire, via son site web <https://admetmesh.scbdd.com/>

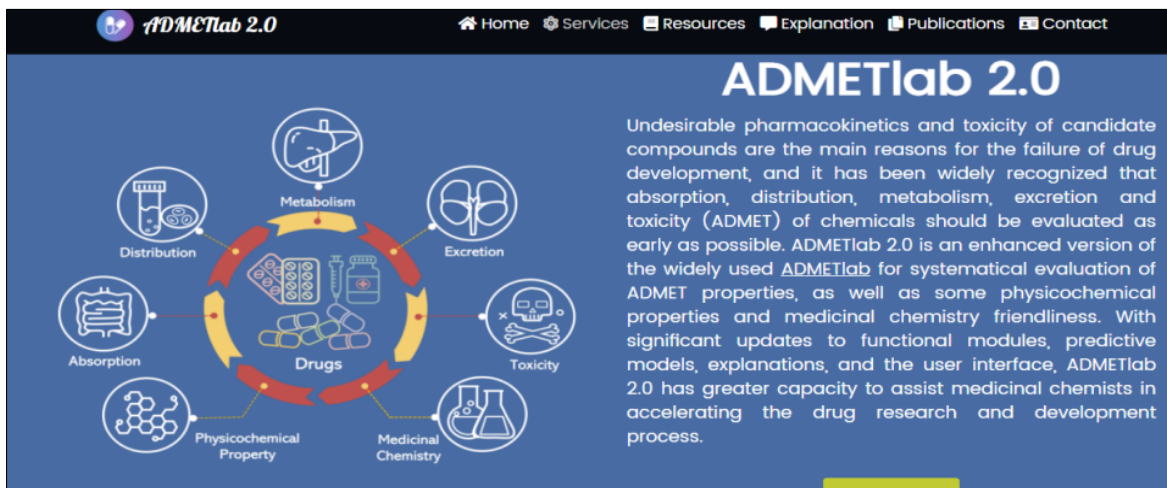


Figure 10 : L'interface graphique du serveur ADMETLAB 2.0

3. Logiciels utilisés

3.1. ChemDraw

ChemDraw est l'un des principaux logiciels pour l'édition moléculaire. Il a des fonctionnalités intéressantes telles que de nombreux outils d'édition et de calcul. Il nous permettra de dessiner et de planifier des dessins moléculaires. Afin de proposer à chaque utilisateur l'outil adapté à ses besoins, le logiciel existe maintenant en trois versions : ChemDraw Prime, ChemDraw Professional et ChemOffice Professional. Cet outil permet de satisfaire les besoins de tous les chercheurs, étudiants et professeurs impliqués dans la chimie et les domaines connexes.

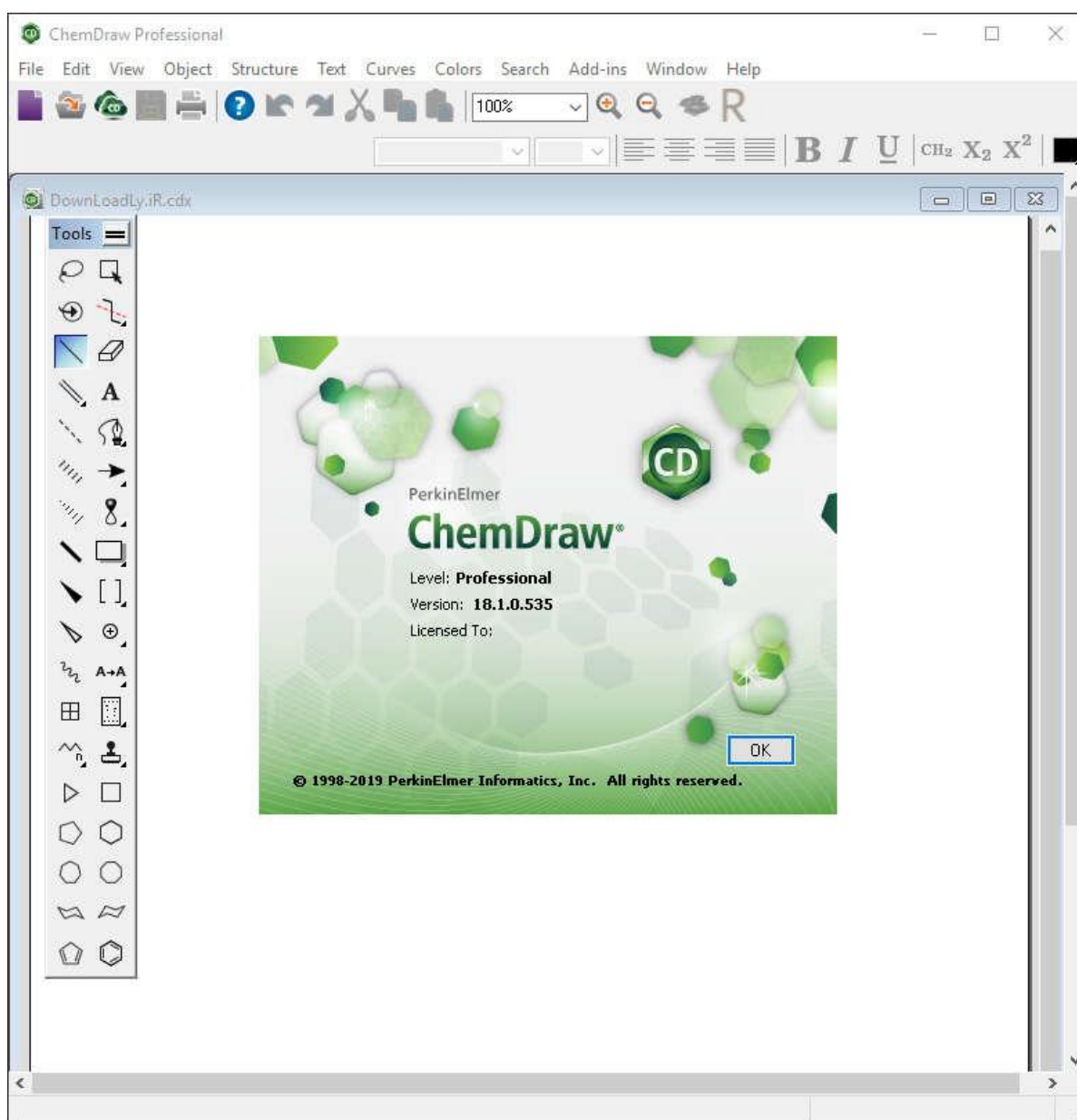


Figure 11 : L'interface graphique de ChemDraw

3.2. MOE 2015.10

The *Molecular Operating Environment* (MOE) est une plateforme logicielle pour la découverte de médicaments qui combine la visualisation, la modélisation et les simulations, ainsi que le développement de la méthodologie, en un seul paquet. Les scientifiques biologiques, les chimistes médicaux et les informaticiens utilisent les applications scientifiques du MEO dans la recherche pharmaceutique, biotechnologique et universitaire. MEO fonctionne sous Windows, et ses principales applications comprennent la conception basée sur la structure, la conception basée sur les fragments, la découverte du pharmacophore, les applications de chimie médicale, les applications de produits biologiques, la modélisation des protéines et des anticorps, et ainsi de suite.

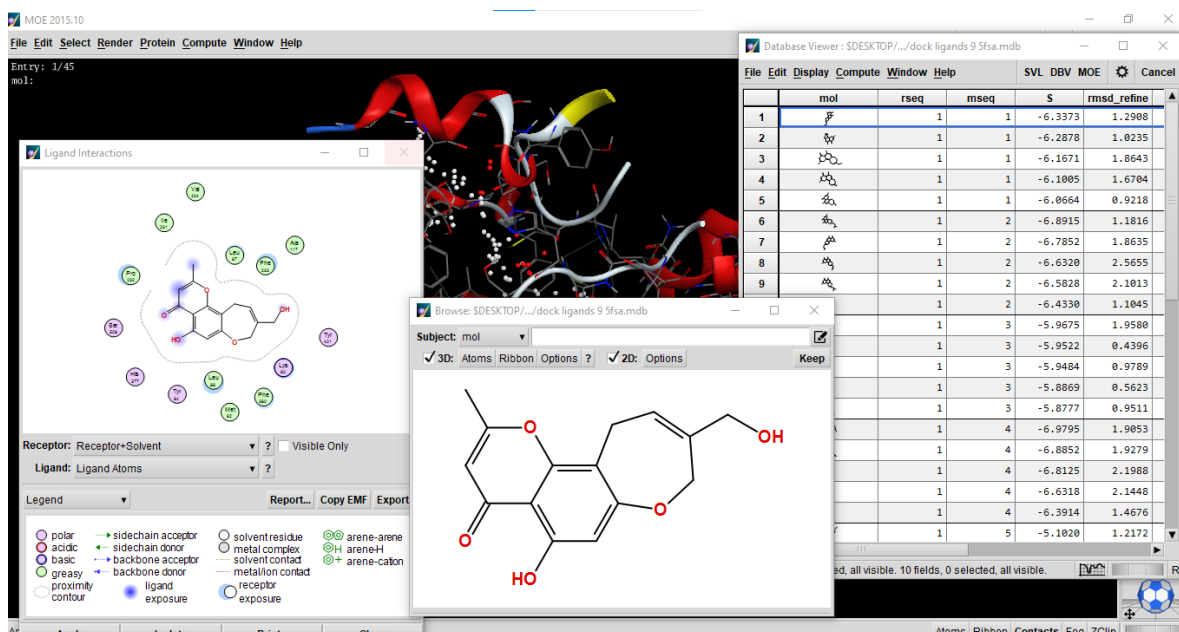


Figure 12 : L'interface de la page d'accueil du MOE.2015.10

4. Étude *in silico*

4.1. Présentation des ligands

D'après ce qui a été dit au sujet des inhibiteurs connus et standards de lanostérol 14- α -déméthylase qui sont les polyènes (l'amphotéricine B) et les azolés.

Dans notre étude, nous avons utilisés les molécules (ligands) testé *in vitro* par **Van Wyk et al. (2018)**, où ils ont prouvé leurs effets antifongiques contre l'espèce *Candida albicans*. Les ligands sélectionnés sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 2: Les molécules sélectionnées

N°	Molécules (Ligands)	Source
01	Eranthin	<i>Eranthisyemalis</i>
02	Ptaeroxylinol	<i>Ptaeroxylonobliquum</i> (feuilles)
03	12-O-acetyleranthin (obliquumol) (angulaire)	<i>Ptaeroxylonobliquum</i> (feuilles)
04	12-O- acetylptaeroxylinol (linéaire)	<i>Ptaeroxylonobliquum</i> (feuilles)
05	5,7-Dihydroxy-2-methyl-4H-chromen-4-one	Synthesis
06	8-Allyl-5,7-dihydroxy-2-methyl-4H-chromen-4-one	Synthesis
07	1-(2,5-Dihydro-3-hydroxymethyl-6,8-dimethoxybenzo[b]- oxepin-7-yl)ethanone	Synthesis of Benzoxepine
08	8-Allyl-5-hydroxy-2-methyl-3',3'-dimethylpyrano[7,6]- chromone	Synthesis of Benzoxepine
09	1-(8-Allyl-5-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromen6-yl) ethanone	Synthesis of Benzoxepine

Voilà le cadre dans lequel s'inscrit notre travail qui vise à rechercher de nouveaux inhibiteurs potentiels de la Lanostérol 14 alpha déméthylase en faisant appel à une nouvelle approche *in silico* par Docking moléculaire.

4.2. Le site actif de le lanostérol 14 α -déméthylase

C'est la région de l'enzyme qui permet la reconnaissance et la fixation de substrat, il est aussi le siège de la catalyse (site de la catalyse).

Le site actif de CYP51 est divisé en quatre sous-sites : une liaison de coordination avec le fer du groupe hémique, le groupe prosthétique hémique dans lequel le fer est attaché à un ligand thiolate sur un résidu de cystéine conservé. Ce groupe se lie également à l'oxygène diatomique au sixième site de coordination, qui est finalement incorporé au substrat, et la région hydrophobe, la région hydrophile de liaison H, et la fissure hydrophobe étroite qui s'est formée(Nguyen, 2007).

5. Docking moléculaire

Le Docking ou amarrage protéine-Ligand est une technique informatique qui permet de prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et les acides aminés composant la structure d'une protéine, et optimiser aussi des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur. Ily a différents types de Docking moléculaire dont ligand-protéine, protéine-protéine, glucide-protéine et ADN-protéine. Il permet de déterminer les modes de liaison ou les conformations possibles d'un ligand à un récepteur et de calculer l'énergie de liaison ou l'énergie du complexe permettant de donner une

estimation sur l'affinité de liaison entre deux molécules, ceci a pour but de déterminer quel ligand candidat interagira le mieux avec une protéine cible donnée (Tlili, 2019).

En effet, avec le développement de la cristallographie par rayons X et l'outil informatique, les méthodes de modélisation par Docking moléculaire sont devenues des étapes cruciales dans de nombreux programmes de découverte de médicaments. L'introduction du criblage virtuel a offert une nouvelle voie d'identification de ligands. Le criblage virtuel basé sur la structure 3D de la protéine consiste à amarrer et à prédire l'affinité d'un grand nombre de molécules (collectées en chimiothèques) pour le site actif ciblé. Les molécules les plus prometteuses sont sélectionnées, achetées ou synthétisées puis testées expérimentalement.

Dans notre travail nous avons utilisé le programme *MOE 2015.10* pour réaliser le Docking moléculaire. Ce programme est un algorithme de Docking capable d'aligner les ligands dans un environnement constitué d'acides aminés avec une bonne précision.

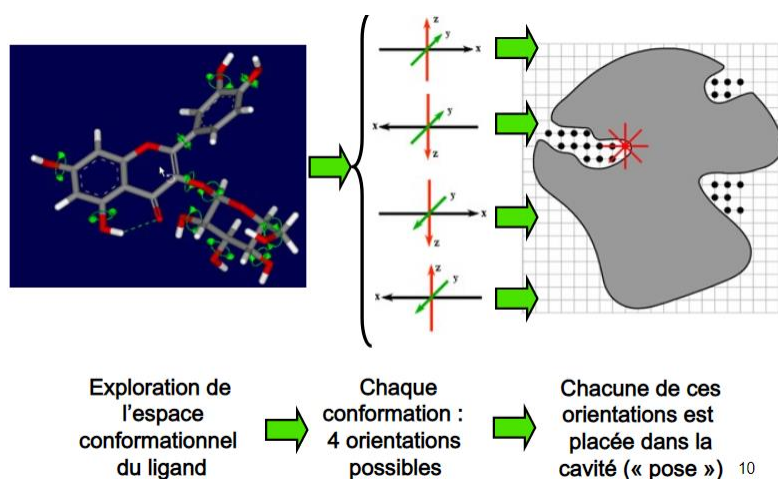


Figure 13 : Principe du Docking moléculaire

5.1. Les étapes de Docking moléculaire

Une simulation de Docking comprend essentiellement deux étapes complémentaires :

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

Le **Scoring** (la deuxième) : est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le Ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de Docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées.

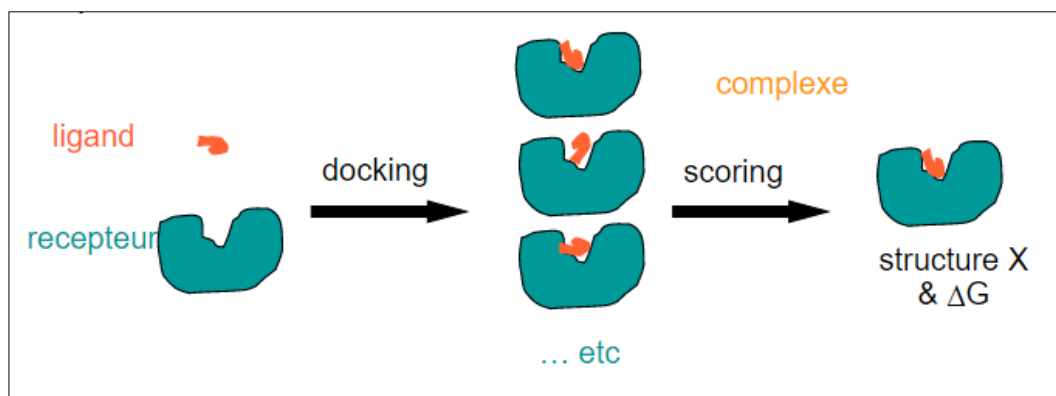


Figure 14 : Simulation du Docking et Scoring

5.2. Préparation de l'enzyme

La structure 3D de l'enzyme a été téléchargée via la PDB sous le format pdb sous le code « 5V5Z ». Ce code représente la structure 3D de L-14 α -DM sous forme homodimérique en complexe avec son inhibiteur. Nous avons choisi ce portant le code 5V5Z en raison de sa faible valeur de résolution soit 2.90 Å, qui est constituée d'une seule chaîne A. Pour faciliter le travail de Docking moléculaire, nous avons éliminé les molécules d'eau l'inhibiteur présent dans la chaîne A. Enfin, L'enzyme ainsi préparée a été enregistrée sous le format pdb files.

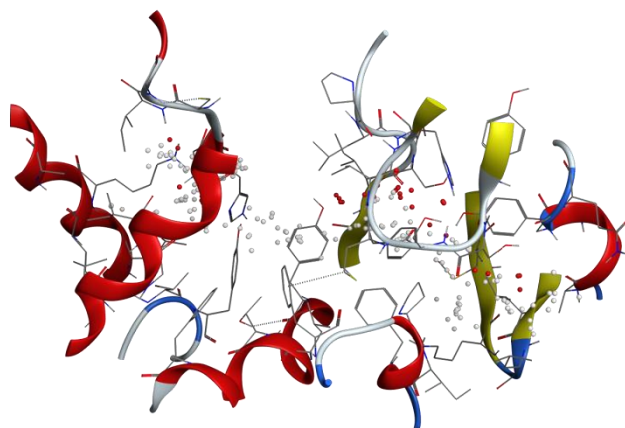


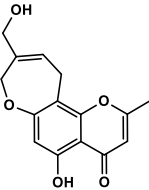
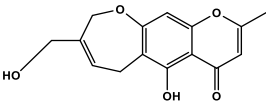
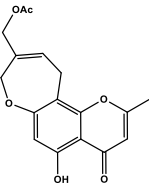
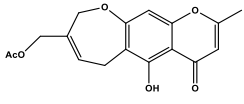
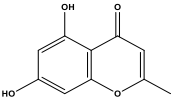
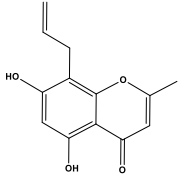
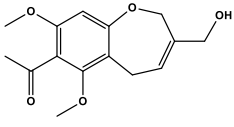
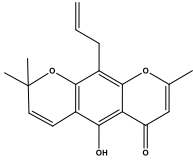
Figure 15 : l'enzyme 5V5Z préparée par MOE 2015.10

5.3. Préparation de ligands

Comme pour la préparation de l'enzyme, Nous avons modélisé les 9 structures des ligands à l'aide de programme de *ChemDraw*. Les ligands préalablement dessinés à l'aide du programme *ChemDraw* sont par la suite préparés pour le Docking avec plateforme logicielle *MOE 2015.10*. Ce dernier contrôle les mouvements du ligand pour déterminer

comment le ligand est lié au récepteur, en définissant les interactions formées, et l'une des caractéristiques les plus intéressantes est l'évolution vers le calcul à distance.

Tableau 3 : Structure des ligands sélectionnés dans le Docking moléculaire

Composé	Structure par ChemDraw
(1)	
(2)	
(3)	
(4)	
(5)	
(6)	
(7)	
(8)	

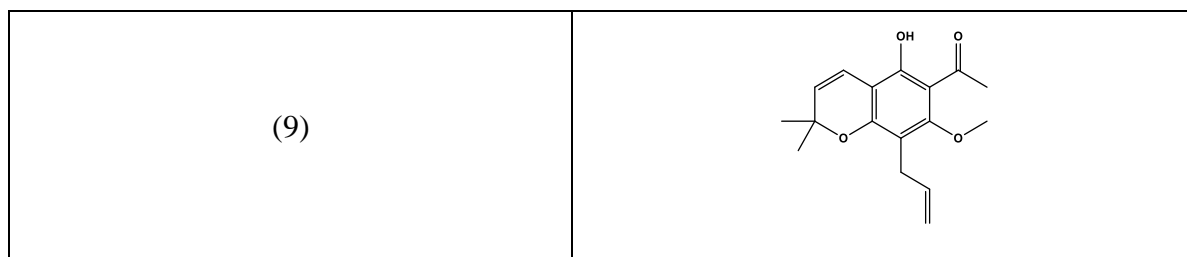
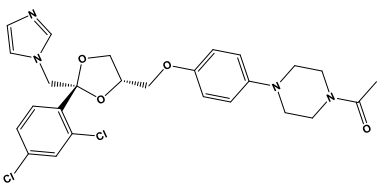
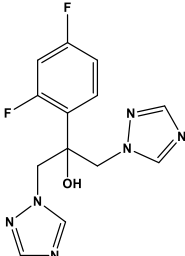
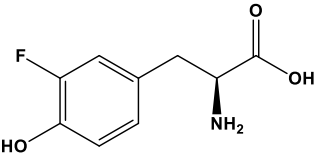
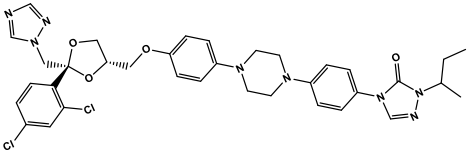
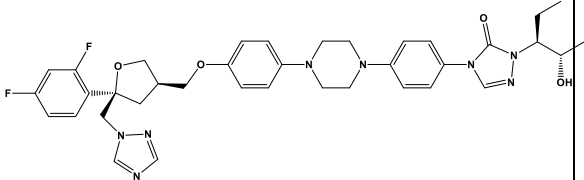
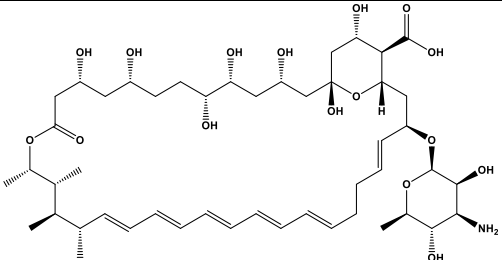


Tableau 4: Structure des médicaments utilisés dans le Docking moléculaire

Composé	Structure par ChemDraw
Ketoconazol	
Fluconazol	
5-fluorotyrosine	
Itraconazol	
Posaconazol	

<p>Amphotericin B</p>	 <p>The chemical structure of Amphotericin B is a large, complex polyene macrolide. It features a long, unsaturated hydrocarbon side chain with multiple conjugated double bonds. The molecule is composed of several fused and linked rings, including a 14-membered macrolide ring, a 15-membered ring, and a 16-membered ring. It has multiple hydroxyl groups, a carboxylic acid group, and an amino group.</p>
<p>Echinocandin</p>	

CHAPITRE III :
Résultats et Discussions

1. Résultats de l'étude antérieure (*in vitro*)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI, μM) de tous les composés testés sont regroupées dans le tableau 6. Dans cette étude, l'amphotéricine B a été utilisée comme témoin positif. Parmi les neuf composés filtrés, le composé (9) était le moins puissant contre *Candida albicans*, et le composé (8) était inefficace contre *C. albicans*. La benzoxépinochromone³ était le composé le plus actif contre *C. albicans* avec une valeur CMI de $9,9\mu\text{M}$. Compte tenu des résultats, il a été décidé d'explorer d'autres benzoxépinochromones (1) et (2) dépourvus du groupe acétoxy. L'élimination du groupe acétylique aux points (3) et (4) a permis de réduire légèrement l'activité observée dans composés (1) et (2). Les composés (1) et (2) présentaient tous deux une activité équivalente ($11,4 \mu\text{M}$) chez *C. albicans*. La benzoxépine⁽⁷⁾ dépourvue de chromone avait également une activité comparable à celle de (1) et (2) contre *C. albicans*, ce qui indique l'importance de la partie théxépine pour l'activité antifongique des composés. Cependant, les composés avec un échafaudage de chromone, (5) et (6), sans la partie oxépine, ont montré une faible puissance. Cette tendance a également été observée avec les composés porteurs de la fraction diméthylpyrienne, (8) et (9), qui avaient une activité plus faible contre *C. albicans*. Dans la plupart des cas, l'activité semble être fongicide et non fongistatique.

Tableau 5 : Valeurs de CMI (μM) des molécules isolées et de synthèse contre *Candidaalbicans*

Molécules	<i>Candida albicans</i> en CMI (μM)	
	24h	48h
(1)	11.4	11.4
(2)	11.4	11.4
(3)	9.9	9.9
(4)	19.8	19.8
(5)	16.3	16.3
(6)	13.5	13.5
(7)	11.2	22.5
(8)	41.9	83.8
(9)	86.7	86.7
Amphotéricine B	0.42	0.84

2. Etude des interactions Ligands- L-14 α -DM (5V5Z)

Dans notre étude *in silico*, nous avons réalisé des expériences sur l'amarrage du meilleur complexe inhibiteur (L-14 α -DM) dans le site actif de l'enzyme (5V5Z) avec le programme MOE.2015.10 pour définir la nature des interactions entre inhibiteur-enzyme. La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct de ligand par rapport à son récepteur (Score, RMSD, type de liaison, et la distance entre eux).

Les interactions entre le site actif de l'enzyme L-14 α -DM et les ligands sont calculées lors de Docking moléculaire, les valeurs sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Les résultats du Docking moléculaire (Ligands)

Ligands	Score (kcal/mol)	RMSD	Type de liaison	Distance(Å)	AA-interactions
(1)	-6.1207	0.9938	Hydrogène Hydrophobe	3.28	HIS 377 (A) H-acceptor PHE 233, PHE 380, PRO 230, MET 508, LEU 87
(2)	-6.8539	1.9634	Hydrogène Hydrophobe	3.12	HIS 377 (A) H-acceptor PHE 233, PHE 380, MET 508, PRO 230, LEU 376
(3)	-6.1963	1.8294	Hydrogène Hydrophobe	3.02	TYR 505 (A) H-donor MET 508, LEU 87, ALA 61, PHE 233, PRO 230, PHE 380
(4)	-7.0359	0.6980	Hydrogène Hydrophobe	2.92	TYR 505 (A) H-donor MET 508, PRO230, LEU 88, PHE 233, PHE 380, LEU 87
(5)	-5.2660	1.0068	Hydrogène Hydrophobe	3.86	PHE 380 (A) H-pi LEU 376, MET 508, PHE 233, PHE 228
(6)	-5.3053	0.9659	Hydrogène Hydrophobe	3.21	TYR 505 (A) H-donor PRO 230, PHE 233 LEU 87, LEU 88, ILE 231
(7)	-6.3674	0.8689	Hydrogène Hydrophobe	3.00	TYR 505 (A) H-donor PRO 230, MET 508 PHE 233, PHE 380, LEU 376
(8)	-6.5220	1.5553	Hydrogène Hydrophobe	2.64	TYR 505 (A) H-donor PRO 230, MET 508 LEU 87, PHE 380 PHE 233, ALA 61
(9)	-6.6072	1.3777	Hydrogène Hydrophobe	2.72	TYR 505 (A) H-donor PRO 230, MET 508 LEU 87, PHE 380 PHE 233, LEU 88

Tableau 7 : Les résultats du Docking moléculaire (Standards)

Standards	Score (kcal/mol)	RMSD	Type de liaison	Distance(Å)	AA-interactions
Fluconazol	-10.4005	1.4438	Hydrogène Hydrophobe	3.06 3.65	HIS 377 (A) H-acceptor PRO 230 (A) pi-H ILE 304, GLY 308, TYR 118, GLY 307, TYR 132, TYR 64, GLY 65, LEU 376, MET 508, ILE 471
Amphotericin B	-9.8011	1.8441	Hydrogène Hydrophobe	4.43 2.47 2.99 2.74 2.74	CYS 470 (A) H-donor MET 508 (A) H-donor TYR 505 (A) H-donor SER 507 (A) H-donor HIS 377 (A) H-acceptor HIS 486, TYR 118, TYR 132, PRO 230 PHE 233, LEU 376, GLY 307
Echinocandin	-11.5964	1.4029	Hydrogène Hydrophobe	3.76 3.12 3.05 3.00 3.18	CYS 470 (A) H-donor HIS 468 (A) H-donor LYS 143 (A) H-acceptor ARG 381 (A) H-acceptor TYR 132 (A) H-acceptor LEU 376, TYR 118 MET 508, THR 311, GLY 307

Dans notre étude, nous avons utilisé quelques médicaments par exemple (Fluconazole, l'amphotéricine B et Echinocandine) comme témoins positifs, ce qui confirme les résultats le tableau au-dessus (Tableau 8), Parce qu'ils ont la meilleure énergie « Score (kcal/mol) » qui environ entre [-9.8à-11] c'est à dire qui ont une bonne inhibition pour L-14 α -DM (5V5Z).

Par rapport aux résultats de Docking moléculaire des médicaments, les résultats d'amarrage des ligands (Tableau N ° 7) montrent, le (4), (2), (9), (8) et (3), présents une meilleure énergie d'interaction avec (5V5Z), qui est respectivement égale à (-7.0, -6.9, -6.6, -6.5, -6.2). Ils possèdent donc le meilleur effet inhibiteur, c'est pour cela nous l'avons choisi comme modèle afin d'interpréter leur différente interaction établie avec l'enzyme.

3. L'analyse visuelle des interactions

L'analyse visuelle est une étape essentielle permettant une meilleure appréciation des résultats de RMSD. Nous avons sélectionné la meilleure pose d'amarrage, lié au score obtenu par le logiciel et du type d'interaction existant dans les solutions générées. A travers cette étude, nous avons sélectionné la meilleure pose d'amarrage pour chaque inhibiteur, lié au nombre de répétitions et du type d'interaction existant dans 9 ligands. Pour cela nous avons choisi 5 composés avec une bonne valeur du RMSD [-6.1à -7.0].

❖ **Ligand (4)**, (RMSD : 1.0), (Score : -7.0),(Distance : 2.92Å)

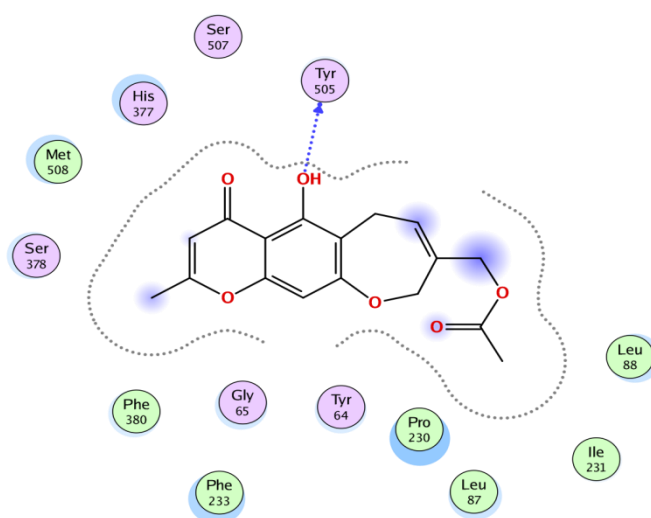


Figure 16 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (4)** en (2D)

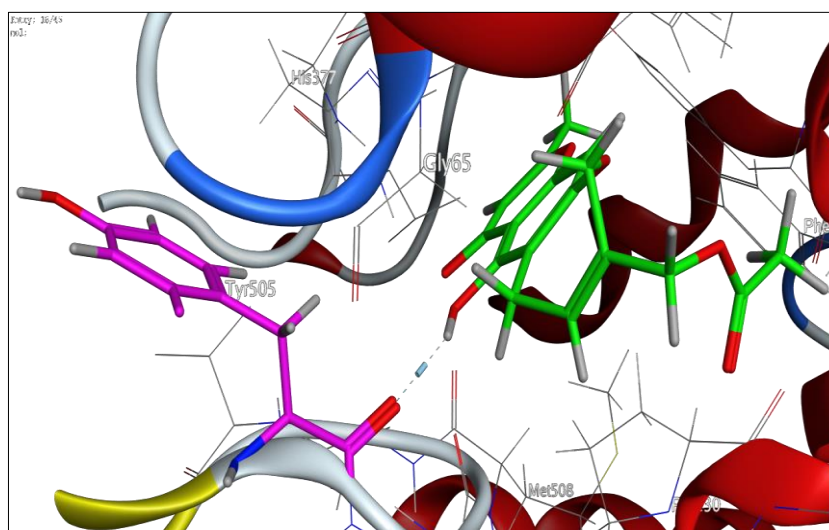


Figure 17 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (4)** en (3D)

❖ **Ligand (2)** (RMSD : 1.9), (Score : -6.9), (Distance : 3.12 Å)

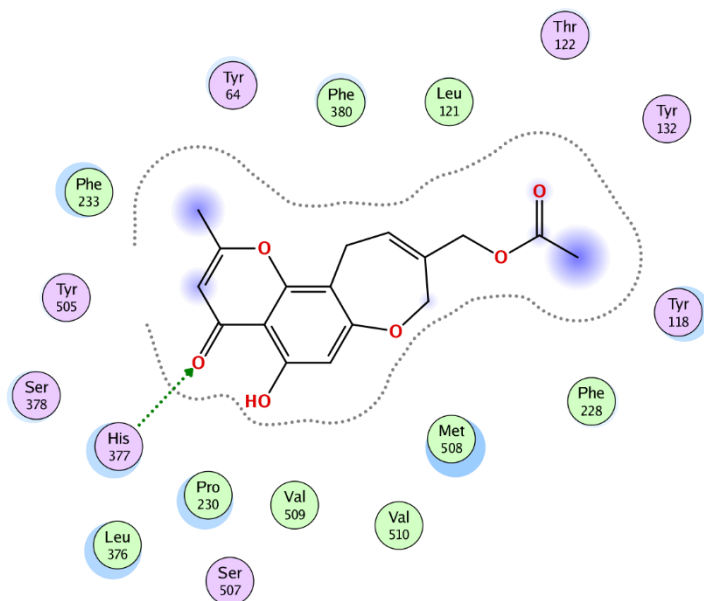


Figure 18 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (2)** en (2D)

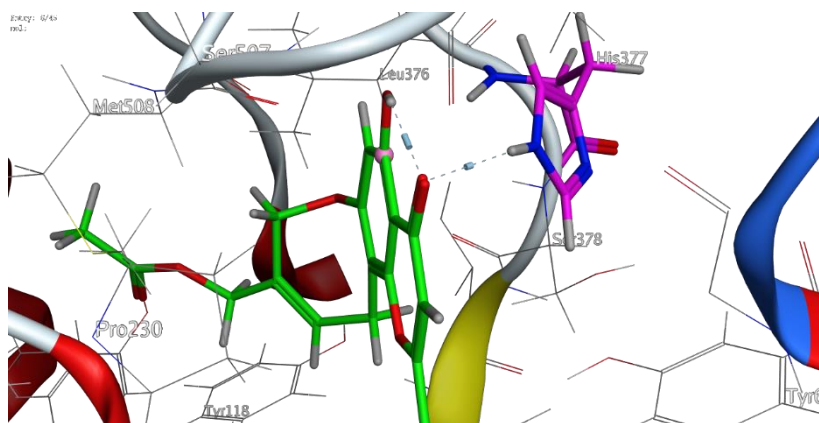


Figure 19 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (2)** en (3D)

❖ **Ligand (9)** (RMSD: 1.4), (Score: -6.6), (Distance: 2.72Å)

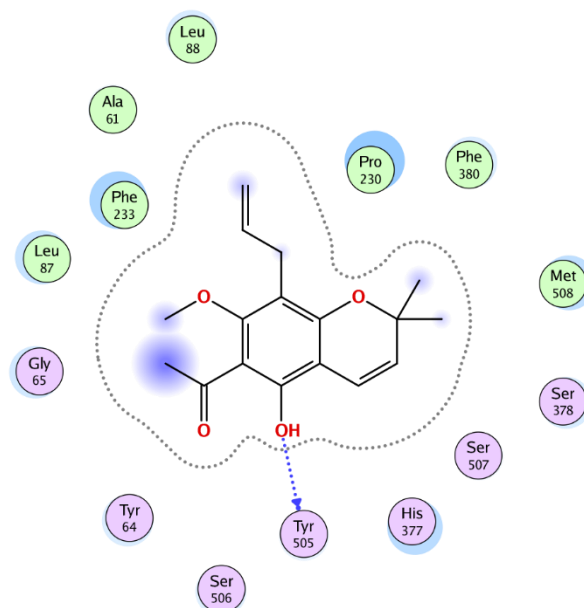


Figure 20: Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (9)** en (2D)

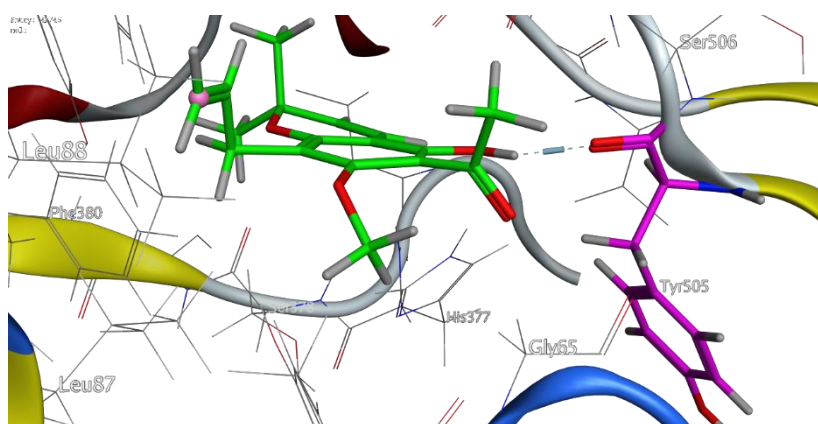


Figure 21 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (9)** en (3D)

❖ **Ligand (8)** (RMSD : 1.6), (Score : -6.5), (Distance : 2.46Å)

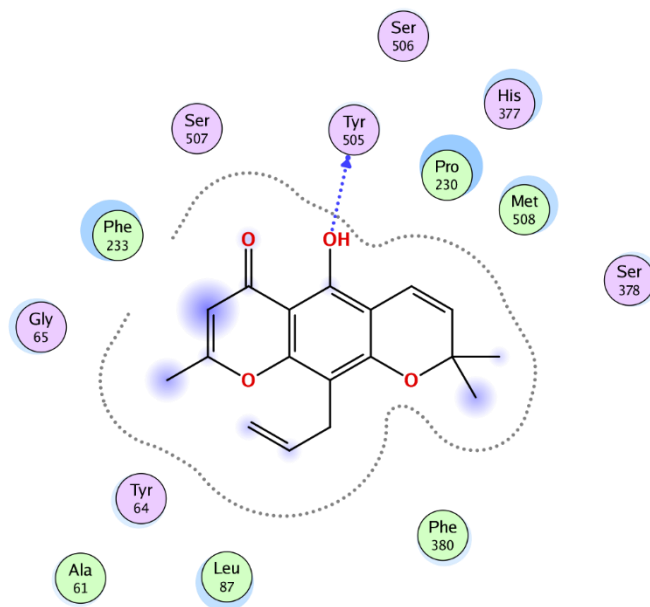


Figure 22 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (8)** en (2D)

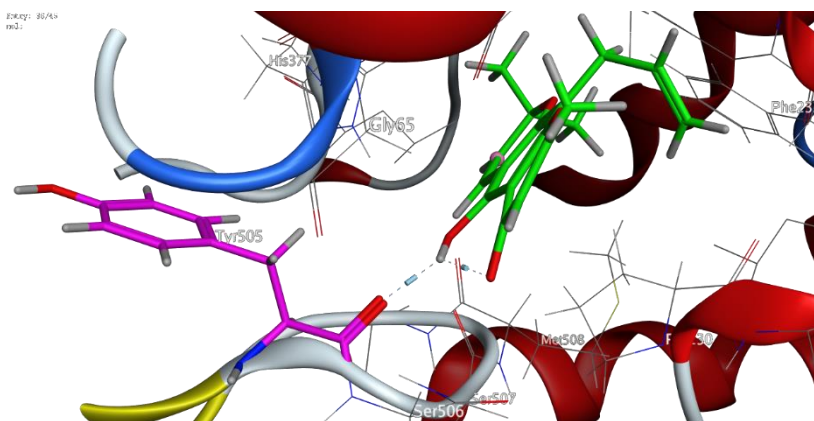


Figure 23 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (8)** en (3D)

❖ **Ligand (3)** (RMSD : 1.8),(Score : -6.2),(Distance : 3.02 Å)

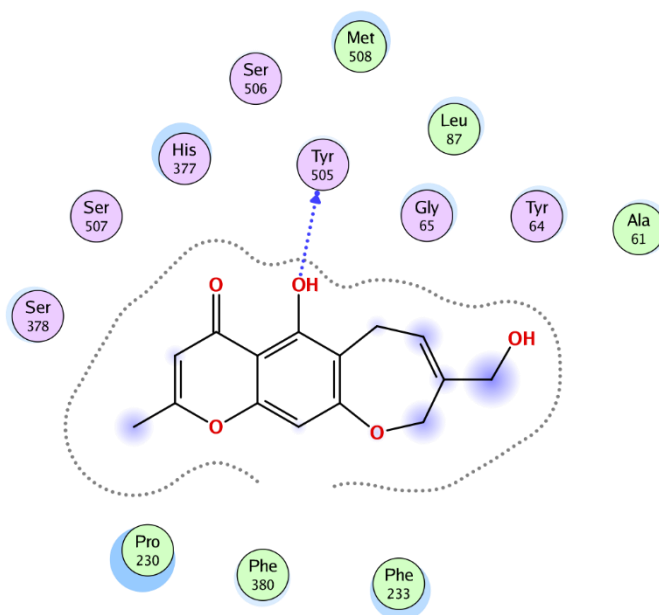


Figure 24 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (3)** en (2D)

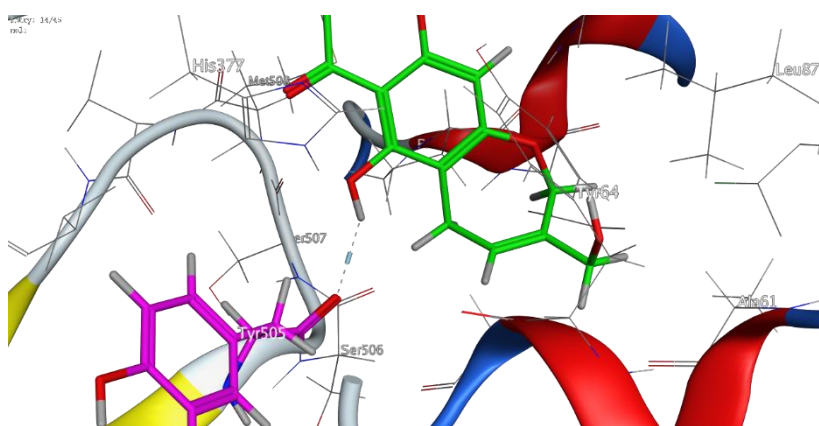


Figure 25 : Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour **Ligand (3)** en (3D)

4. Résultats ADMET

Il était indispensable de compléter notre travail par la prédiction de certains paramètres liés aux propriétés d'ADME. ADMETlab 2.0 est utilisé pour mesurer les paramètres pharmacocinétiques des composés nouvellement conçus, qui permet aussi de vérifier leur aptitude à être utilisables comme médicament. Les résultats ADMET sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau 8 : Les propriétés physico-chimiques pour 5 ligands

Catégories	Propriétés	Ligand 4	Ligand 2	Ligand 9	Ligand 8	Ligand 3
Propriétés physiques chimique	PM	316.09	274.08	289.12	232.07	316.09
	Volume	311.205	270.459	310.921	235.634	311.205
	Densité	1.016	1.013	0.959	0.985	1.016
	Log S	-3.098	-2.932	-3.276	-2.829	-3.279
	Log D	1.628	1.453	3.316	2.035	1.751
	Log p	2.375	1.953	4.781	2.961	2.487
Chimie médicale	NP score	1.886	2.02	2.793	1.869	1.884
	Regel <i>Lipinski</i>	accepter	accepter	accepter	accepter	accepter
	Regel <i>Pfizer</i>	accepter	accepter	accepter	accepter	accepter
	Triangle d'or	accepter	accepter	accepter	accepter	accepter

Tableau 9 : Les propriétés pharmacocinétiques des cinq ligands

Catégories	Propriétés	Ligand 4	Ligand 2	Ligand 9	Ligand 8	Ligand 3
Absorption	MDCK Perméabilité	1.6 ^e -05	9 ^E -06	2e -05	1.4e-05	1.5e-05
	HIA	0.04	0.042	0.047	0.016	0.02
Métabolisme	Cyp2C19 inhibiteur	0.905	0.934	0.583	0.208	0.363
	Cyp 2 c 9 inhibiteur	0.488	0.051	0.697	0.517	0.513
	Cyp 2 D 6 inhibiteur	0.069	0.141	0.669	0.67	0.207
Distribution	PPB	84.51	86.96	92.24	90 .10	84.47
	VD	0.949	0.887	0.892	0.814	1.078
	BBB Pénétration	0.032	0.015	0.014	0.02289	0.022

Tableau 10 : Les résultats de la toxicité potentielle et l'excrétion

Catégories	Propriétés	Ligand 4	Ligand 2	Ligand 9	Ligand 8	Ligand 3
Toxicité	H-HT	0.118	0.24	0.594	0.1	0.294
	Cancérogénicité	0.974	0.936	0.921	0.759	0.971
	Toxicité aigüe par voie orale chez le rat	0.174	0.262	0.952	0.282	0.351
Excrétion	CL	4.125	8.539	2.393	7.317	6.048
	T 1/2	0.871	0.889	0.27	0.85	0.872

À l'aide du serveur ADMETlab 2.0, nous avons détecté les propriétés physicochimiques et les paramètres pharmacocinétiques régissant les critères ADME des meilleurs composés inhibant la cible. Elle permet de vérifier leur aptitude à être utilisables comme médicament.

Les critères d'évaluation liés à l'ADMET pourraient être grossièrement divisés en trois sections différentes : propriétés physicochimiques, propriétés pharmacocinétiques, et la toxicité potentielle et l'excrétion (Tableau 8, 9 et 10).

Le tableau 8 montre que les cinq composés répondent parfaitement aux règles de *Lipinski* et de *Pfizer* et par conséquent peuvent être administrés par voie orale sans poser de problèmes. Par ailleurs, les ligands se sont avérés être moyennement solubles dans l'eau ce qui nous amène à conclure qu'ils peuvent se dissoudre dans les milieux aqueux tel que le sang afin pour parvenir jusqu'à leur lieu d'action. Ils ont un bon coefficient de partage (Log P) sauf le ligand 9 a moyennement de coefficient de partage.

Les résultats du tableau 9 montrent que les composés ont une perméabilité gastro-intestinale élevée. Donc, ils peuvent traverser facilement le tractus gastro-intestinal à travers la paroi de l'intestin pour arriver jusqu'au sang. De plus, ces composés ont une capacité élevée pour traverser la barrière hémato-encéphalique.

Le dernier tableau 10 qui montre la toxicité potentielle, on a discuté que ces composés possèdent une moyenne toxicité sauf le ligand 9 a une faible toxicité hépatique. Enfin, les tests de cancérogénicité révèlent que ces composés sont des composés moins cancérigènes.

Conclusion

L'intérêt de nos travaux est d'acquérir de nouvelles compétences en Docking moléculaire afin de proposer de nouveaux inhibiteurs de Lanostérol alpha déméthylase, et l'objectif de tout cela est de traiter les maladies fongiques telles que la candidose.

Après recherche par Van et son équipe en *in vitro* afin de savoir quels sont les inhibiteurs fongiques dans le but de traiter les candidoses, nos travaux sont venus confirmer leurs résultats et compléter leurs travaux par l'étude *in silico* en sachant quels sont les inhibiteurs pour l'enzyme lanostérol 14-alpha-déméthylase (CYP51) dont l'inhibition conduit à l'arrêt de la croissance de l'espèce *Candida albicans* et donc au traitement de la candidose.

Les résultats *in silico* obtenus ont montré que les 9 molécules analysés par le programme MOE, cinq composés qui possèdent une bonne énergie (score), le composé (9) qui a donné le meilleur score [-7.0359 kcal/mol]. Par conséquent peuvent être considérés comme de nouveaux inhibiteurs potentiellement actifs vers la Lanostérol 14 alpha-déméthylase.

La dernière étape de notre travail consistait à vérifier certains critères physicochimiques et pharmacocinétiques et même leur toxicité potentielle de ces composés régissant leurs propriétés grâce au serveur ADMETLAB 2. Les résultats obtenus montrent que ces composés possèdent des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques compatibles avec une application biologique. Cependant, les problèmes notés quant à leur toxicité potentielle seront très utiles lors de l'optimisation de ces composés avant de devenir des candidats-médicament.

Les résultats que nous avons obtenus *in silico* doivent être complétés et confirmés par des études expérimentales *in vitro* et *in vivo*.

Enfin, le traitement de la candidose ne dépend pas uniquement de l'inhibition d'une Lanostérol 14 alpha déméthylase, mais il existe une possibilité de la traiter en inhibant une autre enzyme 1,3-bêta-glucane synthase et pour cela nous proposons de travailler et de le prouver.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdellatifi, R. F. (2011). *Incidence des candidémies dans les services de réanimation chirurgicale du CHU de Rabat de septembre 2010 à February 2011.*
- Accoceberry, I., & Noël, T. J. T. (2006). Antifungals cellular targets and mechanisms of resistance. *61*(3), 195-199.
- Ascioglu, S., Rex, J., De Pauw, B., Bennett, J., Bille, J., Crokaert, F., . . . Erjavec, Z. J. II. M. M. (2003). Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *5*(1), 10-16.
- Banerjee, S. N., Emori, T. G., Culver, D. H., Gaynes, R. P., Jarvis, W. R., Horan, T., . . . Martone, W. J. J. T. a. J. O. M. (1991). Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. *91*(3), S86-S89.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1990). Yeasts: characteristics and identification.
- Bignon, C. (2021). *Prévention des Infections Fongiques Invasives (IFIs) par le posaconazole comprimé chez le patient d'hématologie: intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique dans la prise en charge du patient.*
- Blumberg, H. M., Jarvis, W. R., Soucie, J. M., Edwards, J. E., Patterson, J. E., Pfaller, M. A., . . . Wiblin, R. T. J. C. I. D. (2001). Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *33*(2), 177-186.
- Can, N. Ö., Acar Çevik, U., Sağlık, B. N., Levent, S., Korkut, B., Özkay, Y., . . . Koparal, A. S. J. J. O. C. (2017). Synthesis, molecular docking studies, and antifungal activity evaluation of new benzimidazole-triazoles as potential lanosterol 14 α -demethylase inhibitors. *2017*.
- Contet-Audonneau, N., & Schmutz, J.-L. J. R. F. D. L. (2001). Antifongiques et mycoses superficielles. *2001*(332), 37-48.
- Cotman, M., Jezek, D., Tacer, K. F., Frangez, R., & Rozman, D. J. E. (2004). A functional cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase CYP51 enzyme in the acrosome: transport through the Golgi and synthesis of meiosis-activating sterols. *145*(3), 1419-1426.
- Garnacho-Montero, J., Díaz-Martín, A., García-Cabrera, E., Ruiz Pérez De Pipaón, M., Hernández-Caballero, C., Aznar-Martín, J., . . . Chemotherapy. (2010). Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. *54*(8), 3149-3154.
- Groll, A. H., Piscitelli, S. C., Walsh, T. J. J. P. T. J. O. H. P., & Therapy, D. (2001). Antifungal pharmacodynamics: concentration-effect relationships in vitro and in vivo. *21*(8P2), 133S-148S.
- Hamoir, J., Goret, M., Mignon, B., & Gustin, P. J. a. M. V. (2001). Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses. *145*, 226-232.
- Le Lay, C. (2009). Mise en évidence et caractrisation in vitro de l'activité antifongique de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719, sur *Candida albicans*.

- Lepesheva, G. I., & Waterman, M. R. J. B. E. B. a.-G. S. (2007). Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *1770*(3), 467-477.
- Mactaggart, B., & Wong, G. (2002). *Invasive Fungal Infection: Review and Update of Drug Management*.
- Marin, V., Iturra, A., Opazo, A., Schmidt, B., Heydenreich, M., Ortiz, L., . . . Paz, C. J. B. (2020). Oxidation of isodrimeninol with PCC yields drimane derivatives with activity against candida yeast by inhibition of lanosterol 14-alpha demethylase. *10*(8), 1101.
- Maruyama, J.-I., Juvvadi, P. R., Ishi, K., Kitamoto, K. J. B., & Communications, B. R. (2005). Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *331*(4), 1081-1088.
- Nguyen, T.-A. (2007). *Relations structure - Fonction dans la superfamille des Cytochromes P450*. (Thèse), Université Paris-Diderot - Paris VII. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00447215>
- Odds, F., Brown, A., & Gow, N. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *24 Trends Microbiol*.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. C. M. R. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *20*(1), 133-163.
- Sibrac-Pelayo, C. (2013). *Les antifongiques azolés: utiles et efficaces mais non dénués de danger: adaptation de la thérapie antifongique chez une patiente atteinte d'histoplasmose*. (Thèse), Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Terrell, C. L. (1999). *Antifungal agents. Part II. The azoles*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Tlili, I. (2019). *Simulation par docking moléculaire des interactions enzyme-inhibiteur: cas de la Lanosterole 14 alpha-déméthylase*. (Thèse), Université Frères Mentouri - Constantine 1.
- Tortorano, A., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Kibbler, C., Faure, O., . . . Diseases, I. (2004). Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *23*(4), 317-322.
- Trösken, E. R., Adamska, M., Arand, M., Zarn, J. A., Patten, C., Völkel, W., & Lutz, W. K. J. T. (2006). Comparison of lanosterol-14 α -demethylase (CYP51) of human and *Candida albicans* for inhibition by different antifungal azoles. *228*(1), 24-32.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., & Coste, A. T. J. I. J. O. M. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *2012*.
- Verdier-Lorne, M.-C. (2018). *Pharmacologie des anti-infectieux*: Elsevier Health Sciences.
- Vermes, A., Guchelaar, H.-J., & Dankert, J. J. J. O. a. C. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *46*(2), 171-179.
- Yasuda, J. J. C. J. H. S. P. (2001). An update on antifungal therapy: a focus on systemic agents for invasive fungal infections. *13*, 4-12.

- Zaoutis, T. E., Webber, S., Naftel, D. C., Chrisant, M. A., Kaufman, B., Pearce, F., . . .
Transplantation, P. H. T. S. I. J. P. (2011). Invasive fungal infections in pediatric
heart transplant recipients: incidence, risk factors, and outcomes. *15*(5), 465-469.