

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ZIANE ACHOUR – DJELFA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



MEMOIRE

Préparé en vue de l'obtention du diplôme de

Master Académique

Spécialité : **MICROBIOLOGIE APPLIQUEE**

Thème :

**La protéase principale (M^{pro}) du SARS COV-2 comme cible
Thérapeutique : structure, fonction et inhibition**

Préparé par :

BENASSLOUN Zohra

HAOUARI Manal

BEN SALEM Ikram Zineb

Les membres du jury sont composés de:

BOUTAIBA Saad	Président	Université Djelfa
OUNISSI Mourad	Encadreur	Université Djelfa
RACHEDI Fatma Zohra	Co-encadreur	Université Djelfa
KHALED KHODJA Yazid	Examineur	Université Djelfa

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu tout puissant de nous avoir donné la santé, la volonté, la foi et le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier également toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus en particulier :

Notre encadreur : Ounissi Mourad pour avoir accepté de diriger notre travail par ses conseils, sa disponibilité et ses orientations.

Que le président et les examinatrices

.

Trouvent ici l'expression de nos sincères remerciements, pour avoir Accepté d'examiner et de juger notre travail.

Merci à tous nos enseignants pour leurs efforts puissants au cours de Toutes ces années et nous leur exprimons toute notre gratitude pour leur aide.

Nos vifs remerciements vont également à toutes les personnes, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Zohra, Manal, Ikram

Dédicace

Je dédie cet humble travail :

A l'âme qui a habité le creux de la terre, à celle qui m'a enseigné et travaillé pour moi, à mon exemple et à la lumière de mon chemin dont je suis fier, source de sécurité et de chaleur.

Mon cher père, que Dieu lui fasse miséricorde

A mon sourire et mon bonheur, A la source de la tendresse résolue, A celui qui trace pour nous le chemin du succès et nous donne la confiance nécessaire pour y marcher, A qui sa supplication et son contentement étaient-ils le secret de mon succès et de mon succès permanent.

Ma chère mère

A ma deuxième mère, qui m'a apporté sa tendresse et son soutien depuis l'enfance, à qui je vois de l'optimisme dans ses yeux et du bonheur dans son rire.

Chère grand-mère

À mon soutien dans cette vie, à ceux avec qui j'acquiers une force et un amour sans limites.

Mes chers frères

A mes amis avec qui j'ai partagé ce travail.

Manal, Ikram

Zohra

Dédicace

A celle que dieu le tout puissant à mis le paradis sous ses pies, à mon ange dans cette vie qui m'a offert son amour et son affection. Celle qui a veillée avec moi et m'a épaulée dans chaque bas de ma vie et qui à été la mère et le père.

Ma très chère maman.

A celui qui m'a encourager à être persévérante durant toute ma vie, et n'a pas hésiter un jour à me procurer les moyens de bonheur et de bien-être, à celui que je porte son nom mon père, je porte son nom et je suis fière.

Mon père

A ma soeur, ma seule et la source de mon courage, je te souhaite de réussir ton bac... A mes amis qui m'ont fait partager ce travail dans sa douceur et sa cruauté, vous m'avez été fidèle.

Ikram. Zohra

Manal

Dédicace



Je dédie ce modeste travail à :

*A mes deux plus être chers sur terre : mes
parents, pour leur amour, leur Confiance et
leur Sacrifices sans limite et leur Conseils
judicieux.*

A mon mari et compagnon

*A mes soeures : Makhtar, Najah, Mustafa,
Ashraf, Sohail, Dido,
et sa famille de mon mari, ma deuxième
mère et mes sœurs : Abla, lisa, et Masoud.*

A tous les étudiants de ma spécialité.

*A Tous les enseignants qui m'ont suivies au
long de mon parcours éducatif.*

*Et à ceux qui ont contribué à la réalisation de
ce travail.*

Résumé

Le SARS-CoV-2 est l'agent causal de la pandémie de COVID-19, provoquant une urgence sanitaire mondiale. Le manque de thérapies ciblées et les options de traitement limitées ont incité la science communautaire à développer de nouveaux vaccins ou des thérapies à petites molécules contre diverses cibles du SARS-CoV-2. Le développement de médicaments qui ciblent des protéines vitales pour le cycle de vie du virus est une approche pratique pour lutter contre cette pandémie. La protéase principale (M^{pro}) joue un rôle dominant dans le traitement de plusieurs protéines codées par le CoV qui interviennent dans l'assemblage de la machinerie de réplication, et est donc reconnue comme une cible antivirale idéale. Cette étude présente une analyse détaillée de la structure et de la fonction de la protéase principale (M^{pro}), ainsi que des avancées récentes dans la découverte d'agents anti-SARS-CoV-2 contre M^{pro} et plusieurs candidats thérapeutiques, notamment des médicaments redirigés et des molécules sur mesure.

Mots clés: Protéase principale, SARS-CoV-2, inhibition.

Abstract

SARS-CoV-2 is the causative agent of the COVID-19 pandemic, causing a global health emergency. The lack of targeted therapies and limited treatment options have prompted the science community to develop new vaccines or therapies to small molecules against various targets of SARS-CoV-2. The development of drugs that target proteins vital to the life cycle of the virus is a practical approach to combat this pandemic. The master protease (M^{pro}) plays a dominant role in the processing of several CoV-encoded proteins involved in the assembly of the replication machinery, and is therefore recognized as an ideal antiviral target. This study presents a detailed analysis of the structure and function of the major protease (M^{pro}), as well as recent advances in the discovery of anti-SARS-CoV-2 agents against M^{pro} and several therapeutic candidates, including redirect drugs and tailor-made molecules.

Key Words: Main Protease, SARS-CoV-2, Inhibition.

المخلص

فيروس SARS-CoV-2 هو العامل المسبب لوباء COVID-19، مما تسبب في حالة طوارئ صحية عالمية. دفع الافتقار إلى العلاجات المستهدفة وخيارات العلاج المحدودة المجتمع العلمي إلى تطوير لقاحات جديدة أو علاجات جزيئية صغيرة ضد أهداف مختلفة من SARS-CoV-2. إن تطوير الأدوية التي تستهدف البروتينات الحيوية لدورة حياة الفيروس هو نهج عملي لمكافحة هذا الوباء. يلعب البروتين الرئيسي (M^{pro}) دوراً مهماً في التعبير للعديد من البروتينات المشفرة للـ CoV اللازمة في تجميع آلة النسخ المتماثل، لذلك فهو معروف كهدف مثالي لمضاد للفيروسات.

تقدم هذه الدراسة تحليلاً مفصلاً لبنية ووظيفة البروتين الرئيسي (M^{pro})، بالإضافة إلى التطورات الحديثة في اكتشاف العوامل المضادة لـ SARS-CoV-2 ضد M^{pro} والعديد من المرشحين العلاجيين، بما في ذلك الأدوية المعاد توجيهها والجزيئات المصممة خصيصاً.

الكلمات المفتاحية: البروتين الرئيسي، السارس-كوف-2، تثبيط

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 01: SARS-COV-2	4
1. Historique.....	5
2. Définition	7
3. La composition biochimique	8
3.1 .Structure du virus.....	8
3.2. Organisation génomique.....	10
3.3 La protéase principale (M ^{pro}) du SARS-CoV-2	11
3.4. Cycle de réplication	11
4 .Mode de transmission.....	14
5. Diagnostic de l'infection par le SARS-COV-2.....	16
5.1. Testé moléculaire par RT-PCR	16
5.2. Teste sérologique avec le teste rapide	17
5.3. Diagnostic radiologique	18
6. Classification et taxonomie	19
6 .1.Mutation SARS-CoV-2	21
6 .2. Variantes.....	23
7. Thérapeutiques.....	24
7.1. Influence potentielle sur la vaccination	24
7.2. Différent types vaccins	26
Chapitre 02: Matériel de banque de donnée utilisé.....	31
1. Banque de données sur les protéines (PDB)	32
2. Logiciel PyMOL	34
Chapitre 03: Protéase principale (M ^{pro})	38
1. Structure.....	39
1.1. Structure de l'enzyme protéase principale M ^{pro} du SARS-CoV-2	39
1.2. Site de la liaison au substrat	40
1.3. Spécificité du substrat	42
1.4. Comparaison structurale de la protéase principale de SARS-CoV-2 et SARS-CoV.	43
2. Fonction	46
Chapitre 04: Inhibiteur de protéase principale (M ^{pro})	49
Méthode découverte inhibiteur M ^{pro}	50

1. Réutilisation des médicaments	53
1.1. Lopinavir / Ritonavir.....	53
1.2. Ebselen	54
1.3. Disulfirame	55
1.4. Atazanavir.....	56
1.5. Nelfinavir.....	56
1.6. Shikonine	57
1.7. Dipyridamole	58
1.8. Baicalein	58
1.9. Carmofur.....	59
1.10. PX-12	60
1.11. Danoprevir	60
1.12. Remdesivir	61
1.13. Boceprevir.....	62
1.14. GC-376	63
1.15. Chloroquine / Hydroxychloroquine	64
1.16. Calpain inhibiteur II et XII	65
2. Inhibiteurs peptidomimétiques	66
2.1. Esters vinyliques (N3).....	66
2.2. Aldehyde.....	68
2.3. α -cétoamide.....	70
2.4. Peptidyl fluorométhyl cétones (pFMKs)	71
2.5. Hydroxyméthylcétones.....	72
2.6. Acyloxyméthylcétones	73
Conclusion.....	74
Références	76

Liste des figures

Figure 1: Chronologie de l'urgence des corona virus humains	6
Figure 2: Structure du SARS-CoV-2.....	9
Figure 3: Schéma général de la protéine S.....	10
Figure 4: Organisation génomique du SARS-CoV-2	11
Figure 5: Cycle de réplication virale dans les cellules eucaryotes	14
Figure 6: Représentation schématique des différents modes de transmission du SARS-CoV-2	15
Figure 7: Résultat RT-qPCR sur le gène E du SARS-CoV-2	17
Figure 8: Atteintes caractéristiques de la pneumonie COVID-19	19
Figure 9: La classification des coronavirus dans le domaine Riboviria.....	20
Figure 10: L'interface graphique du site web de la base de données PDB	34
Figure 12: L'interface graphique du Logiciel PyMOL.....	36
Figure 13: La fenêtre de visualisation.....	37
Figure 13: Structure du protéase principale (M^{pro})	40
Figure 14: Structure 3D du SARS-CoV-2 M^{pro} en monomère (PDB: 6M03).....	40
Figure 15: Structure cristallographique du SARS-CoV-2 M^{pro} libre résolue à une résolution de 1,75 Å (entrée PDB : 6Y2E) (à gauche) et vue de surface du substrat-fente de reliure (à droite)	41
Figure 16: Structure tridimensionnelle des cristaux de SARS-CoV-2 M^{pro} est montrée (PDB: 6Y2E)	42
Figure 17: site actif de l'enzyme SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB: 6Y7M), avec représentation les différents sites <i>P</i> dans la cavité catalytique	43
Figure 18: Sites de clivage des polyprotéines reconnus par M^{pro} du SARS-CoV-2, SARS-CoV et MERS-CoV.....	43
Figure 19: Superposition de structures cristallographiques aux rayons X de Protéase majeure du SARS-CoV-2 (tan, PDB: 6Y2F), et SARS-CoV (cyan, PDB: 3TNT).....	45
Figure 20: Séquence d'acides aminés des M^{pro} s du SARS-CoV et du SARS-CoV-2	Erreur ! Signet non défini.
Figure 21: Substrats traités par SARS-CoV-2 M^{pro}	47
Figure 22: Détail de la structure cristalline du complexe sélénium- M^{pro}	55
Figure 23: Détails de la structure cristalline du complexe formé entre le disulfirame et le SARS-CoV-2 M^{pro}	56
Figure 24: Détails de la structure cristalline du complexe formé entre la Shikonine et le SARS-CoV-2 M^{pro}	58
Figure 25: Pose de la liaison d'un inhibiteur de Baicalein dans un complexe avec SARS-CoV-2 M^{pro}	59
Figure 26: Modes de liaison des inhibiteurs nouvellement identifiés en complexe avec SARS-CoV-2 M^{pro}	64
Figure 27: Vue rapprochée des interactions entre SARS-CoV-2 M^{pro} et Boceprevir. (PDB : 7C6S).....	63
Figure 28: Structures cristallines aux rayons X du SARS-CoV-2 M^{pro} en complexe avec les inhibiteurs de Calpain II (PDB : 6XA4) et XII (PDB : 6XFN).....	66
Figure 29: Structure aux rayons X du complexe entre N3 et SRAS-CoV-2 M^{pro}	68

Figure 30: Interaction de 11a, 11b (entrée PDB : 6LZE, entrée PDB : 6m0k) avec SARS-CoV-2 M ^{pro}	69
Figure 31: Composé 13b dans la liaison au substrat fente située entre domaines I et II de la M ^{pro} dans la monoclinique forme cristalline	71
Figure 32: Structure chimique de MFMK qui est un inhibiteur irréversible du SARS-CoV-2 M ^{pro}	72
Figure 33: PF-00835231, à gauche, et PF-07321332, à droite.....	72
Figure 34: Structure chimique et activité biologique de l'acyloxyméthyl cétone	73

Liste des tableaux

Tableau 1: Activité antivirale des hits nouvellement découverts contre le SARS-CoV-2 **Erreur ! Signet non défini.**

Liste des abréviations

CoV: Coronavirus

ICTV: Comité International de Taxonomie des Virus

IBV: Virus infectieux des bronches inflammatoires

TGEV: Virus de la gastro-entérite transmissible

MHV: Virus de l'hépatite murine

HCOV: Coronavirus humain

SARS-CoV: Syndrome Respiratoire Aigu Sévère Coronavirus

HKU: Université de Hong Kong

MERS-CoV: Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient Coronavirus

SARS-CoV-2: Syndrome Respiratoire Aigu Sévère Corona virus 2

ARN: Acide Ribo Nucléique

nCoV: Nouveau Coronavirus

COVID-19: Coronavirus Disease 2019

ARNg: Acide Ribo Nucléique génomique

S: Spik protein

E: Enveloppe

M: Membran protein

N: Nucleocapsid protein

HEF: Hemag glutinin-estérase fusion

ORP: Open Reading frame

RdRp: RNA-dependent RNA-polymerase

ACE2: Angiotensin-Converting Enzyme 2

NSP: Protéines non structurales

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RBD: Domaine de liaison au récepteur

NTD: Domaine N-terminal

AcN: Anticorps neutralisants

Ac: Anticorps

ARNm: Acide Ribo Nucléique messenger

VP: Variant préoccupant

PDB: Banque de données sur les protéines

3D: Three Dimensions

M^{pro}: Protéase Principale

3CL^{pro}: 3-C like Protease

OMS: Organisation mondiale de la santé

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

FDA: Administration des aliments et des médicaments

EC₅₀: Concentration Effective demi-maximale

IC₅₀: Concentration Inhibitrice demi-maximale

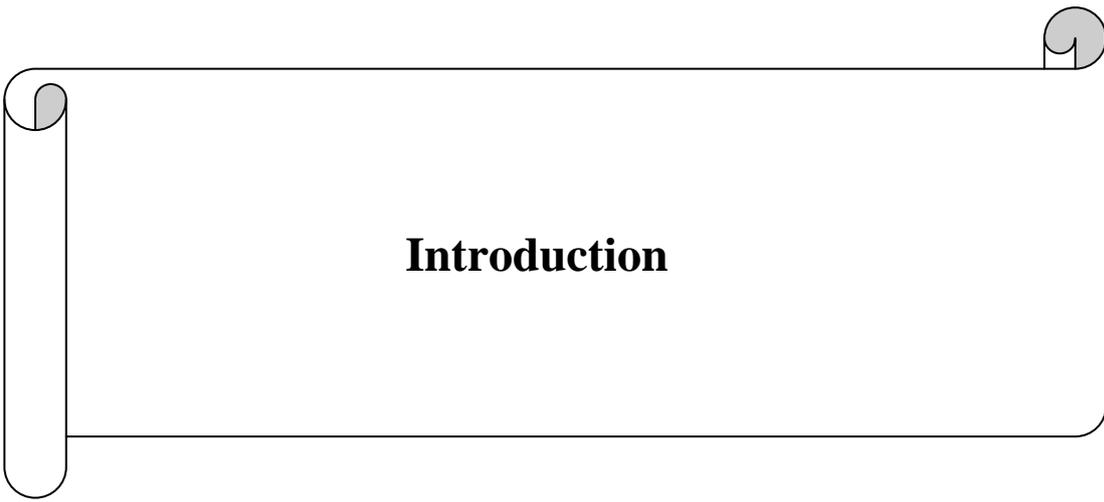
PFMKs: Peptidyl fluorométhyl cétones

MFMK: Monofluorométhyl cétones

DFMK: Difluorométhyl cétones

TFMK: Trifluorométhyl cétones

ABPs: Sondes basées sur l'activité



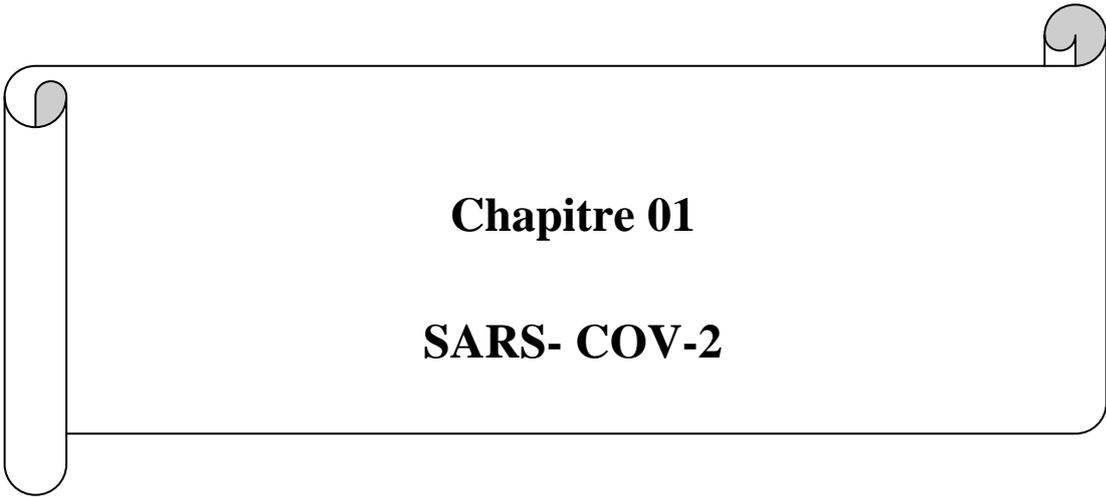
La maladie à virus corona (COVID-19) représente une grande menace pour le monde à bien des égards [1]. Il s'agit d'une maladie infectieuse causée par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère, ou SARS-CoV-2 [2]. Elle est apparue pour la première fois en décembre 2019 à Wuhan, dans la province du Hubei, en Chine, et s'est propagée rapidement de Wuhan à d'autres régions [3]. Ses symptômes sont la fièvre, la toux, la fatigue, l'essoufflement, la pneumonie et d'autres symptômes respiratoires, et dans de nombreux cas une progression à mort [4]. Avec plus d'un million de personnes et plus de 300 000 décès confirmés dans 188 pays à la mi-mai 2020. Le SARS-CoV-2 est la troisième épidémie de virus zoonotique du coronavirus après l'émergence du SARS-CoV-1 en 2002 et Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient MERS-CoV en 2015 [5].

Le SARS-CoV-2 fait partie de l'ordre des Nidovirales, dans la famille des Coronaviridae (CoV) qui est largement distribuée chez l'homme et d'autres mammifères. Le SARS-CoV-2 est classé dans le genre Beta-CoV [4]. C'est un virus à un génome d'ARN simple brin de sens positif de 30 kb de long [6], non fragmenté [4], il est recouvert de protéines de nucléocapside interne (N) et d'une enveloppe externe constituée de protéines de membrane (M) et d'enveloppe (E) ainsi que de protéines (S) protéines [6]. L'ARN viral code pour deux cadres de lecture ouverts (PRF) qui génèrent, par un changement de cadre ribosomique, deux polyprotéines pp1a et pp1ab. Ces multiples protéines produisent la plupart des protéines du complexe de réplication. Plusieurs protéines sont transformées par deux protéases virales à cystéine : la protéine de type papaïne (PL^{Pro}) qui clive trois sites, libérant des protéines non structurales nsp1-3 et la protéase de type 3C, également appelée protéase principale (M^{Pro}), qui fait le clivage de 11 sites de libération de protéines non structurales (nsp4-16) [5].

La cible principale des vaccins et des anticorps monoclonaux actuels est la protéine S, qui médie la liaison virale et l'entrée dans les cellules hôtes. Par conséquent, l'apparition de variantes avec des mutations dans cette protéine est d'une importance particulière en raison de sa capacité à réduire les anticorps neutralisants résultant d'une vaccination ou d'une infection antérieure [7]. De nouveaux types de virus sont apparus avec de multiples mutations majeures, telles que B.1.1.7, B.1.351, P.1 et B.1.617, qui menacent de rendre les vaccins disponibles, ou médicaments potentiellement inefficaces [2].

À cet égard, nous soulignons la protéase principale (M^{pro}), une protéine virale majeure, comme une cible thérapeutique précieuse qui ne présente aucune mutation dans les variantes décrites d'importance épidémiologique [2]. M^{pro} joue un rôle central lors de l'apparition de l'infection et sa fonction est étroitement liée à l'initiation de la réplication virale. L'inactivation de son activité catalytique représente une stratégie appropriée pour le développement de médicaments anti-coronavirus, étant ainsi reconnue comme une cible antivirale idéale [8].

Cette revue se concentre sur l'étude de la structure et de la fonction des protéases principale (M^{pro}) à l'aide du logiciel de visualisation moléculaire (PyMOL), la collecte d'informations sur les inhibiteurs importants (médicaments recyclés ou composés nouvellement fabriqués) et l'analyse de leurs structures (complexe protéine/inhibiteur si disponible dans PDB).



Chapitre 01

SARS- COV-2

1. Historique

Le coronavirus (CoV) infecte les humains et de nombreuses espèces animales (mammifères et oiseaux). Le premier type de CoV a été décrit chez l'animal. Le nom de « coronavirus » n'a pas été initialement donné, mais est apparu plus tard dans le premier rapport de l'ICTV en 1971 : la description du CoV chez le poulet en 1937 (anciennement connu sous le nom d'IBV, virus infectieux des bronches inflammatoires), maintenant appelé coronavirus aviaire), les porcs en 1946 (anciennement appelé TGEV, virus de la gastro-entérite transmissible, maintenant appelé alphacoronavirus 1), et les souris en 1949 (anciennement appelé MHV, virus de l'hépatite murine), maintenant appelé coronavirus murin).

Chez l'homme, le premier CoV a été isolé des sécrétions respiratoires de patients atteints d'infections respiratoires aiguës en culture cellulaire dans les années 1960. Parmi les premiers isolats de coronavirus humain (HCoV), les souches 229E, B814, OC43, OC48 et 692, dont seulement 2 (appartenant aux espèces de coronavirus humain 229E et de coronavirus humain OC43) ont été isolées en 1965 et conviennent aux cellules adhérentes ont été cultivé et constitué seulement deux souches prototypes de HCoV en plus de 40 ans. De 1967 à 2004, les HCoV ont été éliminé en médecine humaine et n'ont pas été trouvés dans les laboratoires de diagnostic virologique. La connaissance biologique de ces virus est obtenue à partir de l'étude des CoV animaux IBV, TGEV et MHV. Il a été découvert en mars 2003 que le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) était l'agent pathogène qui a provoqué la première pandémie infectieuse au 21e siècle, ce qui a d'abord causé une grande surpris. L'identification de HCoV-NL63 et HCoV-HKU1 aux Pays-Bas en 2004 (NL aux Pays-Bas) et à Hong Kong (HKU à l'Université de Hong Kong) en 2005 a montré qu'ils sont omniprésents et compatibles avec HCoV-229E et HCoV-OC43. Enfin, la propagation du coronavirus associé au syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) est apparu en Arabie saoudite en 2012, provoquant un syndrome respiratoire sévère, confirmant ainsi le grand potentiel de ces virus. Ce dernier s'appelait MERS-CoV après avoir reçu plusieurs noms car il se propage presque exclusivement dans la péninsule arabique [9].

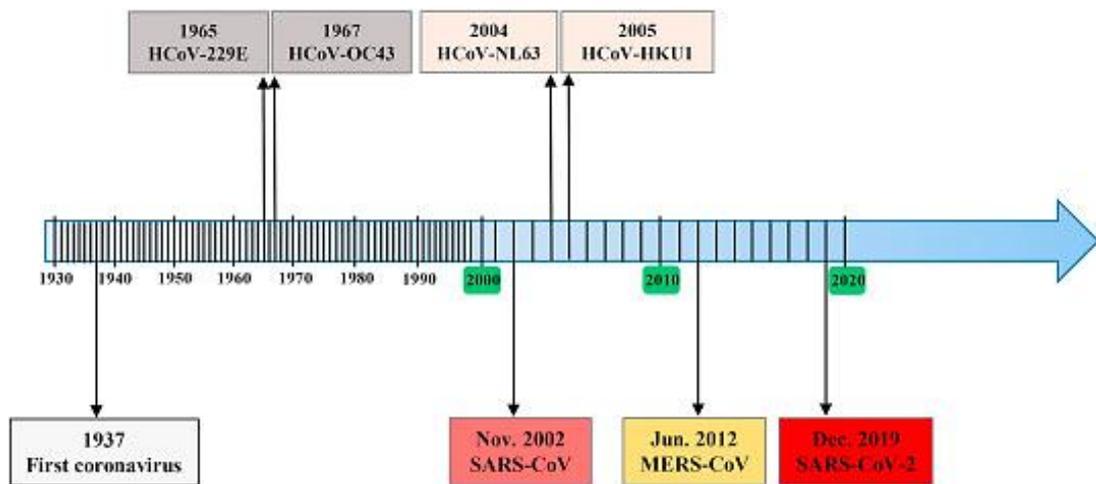


Figure 1: Chronologie de l'urgence des corona virus humains. HCoV, corona virus humains ; MERS, syndrome respiratoire du Moyen-Orient ; SARS, syndrome respiratoire aigu sévère. (<https://doi.org/10.1016/j.medntd.2020.100043>).

Varints

- **B.1.617** a été - découvert pour la première fois en octobre 2020 [9]. Fin avril 2021, B.1.617 était prédominant en Inde, où une vague dévastatrice de COVID-19 submergeait les hôpitaux. Outre l'Inde, la souche B.1.617 a été identifiée aux États-Unis, au Royaume-Uni et à Singapour.
- En décembre 2020, des scientifiques du Royaume-Uni ont découvert que parmi les milliers de mutations du SARS-CoV-2 découvertes au Royaume-Uni et ailleurs, un coronavirus présentant un ensemble particulier de mutations semblait devenir rapidement la lignée prédominante pour les nouvelles infections dans certaines parties de l'Angleterre. Cette lignée est appelée B.1.1.7 ou VOC 202012/01. Parmi plus de 700 lignées définies, il s'agit de la première lignée mutante bien caractérisée, distribuée dans le monde entier et reconnue à un stade avancé de la pandémie.
- Fin décembre 2020, des informations en provenance d'Afrique du Sud ont fait état de la prévalence d'une autre lignée, appelée 501Y.V2, 501.V2 ou B.1.351.

- En décembre 2020, de nombreux scientifiques pensaient que le B.1.1.7 était plus contagieux, mais il subsistait une certaine incertitude, car l'augmentation du B.1.1.7 pouvait également être liée à des effets fondateurs ou à des variations des comportements humains dans les régions d'Angleterre. Cependant, au début du mois de janvier 2021, il semblait très probable que B.1.1.7 et 501Y.V2 soient plus contagieux.
- En janvier 2021, on a signalé que la lignée B.1.429 avec la mutation L452R se développait rapidement en Californie du Nord, aux États-Unis. De la fin de l'année 2020 au début de l'année 2021, cette lignée est passée de 4 % des échantillons à 25 %.

Toujours en janvier 2021, il a été constaté que la lignée P.1 avait augmenté rapidement Manaus, au Brésil. P.1 présente 10 mutations dans la protéine Spike, dont 3 en commun avec la lignée sud-africaine 501Y.V2 (N501Y, K417N, et E484K). P.1 a été découvert aux États-Unis en janvier 2021.

- En février 2021, - il a été signalé que des mutations en position 677 (Q677P, Q677H) étaient apparues indépendamment (évolution convergente) dans le centre-sud et le sud-ouest des États-Unis, où elles représentaient 28 % (en Louisiane) et 11 % (au Nouveau-Mexique) des génomes de SARS-CoV-2 séquencés à la fin janvier. Q677H est présent dans la lignée B.1.525

2. Définition

Les coronavirus (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae), ces virus tirent leur nom de leur halo en forme de couronne. Ce sont des virus enveloppés et sphériques de 100 à 160 nm de diamètre, contenant un génome à ARN simple brin positif de 27 à 32 kilo paire de bases [10].

Leurs découverts au cours des années 1960, les coronavirus appartiennent à l'ordre des Nidovirales et plus particulièrement à la famille des Coronaviridae. Ces virus sont retrouvés majoritairement chez les oiseaux et les mammifères. Cette famille est composée de quatre genres : Alpha-, Beta-, Gamma- et Delta-coronavirus, le SARS-CoV-2 est un Béta Coronavirus [10].

Le coronavirus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2, francisé en SARS-CoV-2 (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère), initialement

2019-nCoV puis "SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1 genome". Le SARS-CoV-2 utilise une ARN polymérase ARN dépendante pour la réplication de son génome et la transcription de ses gènes. Ce virus est responsable de la maladie Covid-19 ("Co" : corona, "vi" : virus, "d" : disease, "19" : 2019) [10].

Fin 2019, est apparu en Chine un nouveau Coronavirus, le SARS-CoV-2, nommé ainsi pour sa similitude avec le SARS-CoV, et responsable du COVID-19 [11]. L'apparition de ce virus a rapidement entraîné le développement d'une épidémie qui a explosé en pandémie en l'espace de quelques mois [12].

Depuis le début de pandémie, de nombreux essais cliniques ciblant le Covid-19 ont été initiés à travers le monde <https://covid-trials.org>.

3. La composition biochimique

Les coronavirus présentent un diamètre compris entre 100 et 160 nm. Ce sont des virus enveloppés qui sont caractérisés par la présence de pointes (**S** pour *spike* en anglais) constituées de glycoprotéines hautement glycosylées, retrouvées sous forme trimérique et enchâssées dans l'enveloppe virale. Ces pointes, disposées en forme de couronne autour de la membrane virale ont donné leur nom aux coronavirus. L'ARN génomique (ARN_g) est encapsulé dans une nucléocapside phosphorylée de forme hélicoïdale (**N**). L'ensemble ARN_g + N, nommé ribonucléoprotéide (RNP), est enveloppé dans la particule virale à l'aide de glycoprotéines de membrane (**M**) et d'enveloppe (**E**) [13].

3.1 .Structure du virus

Les coronavirus prennent la forme de virus enveloppés, plutôt sphériques et mesurent 80 à 220 nanomètres de diamètre. Le SARS-CoV-2 constitue un virus à ARN monocaténaire non segmenté de polarité positive. Sa taille s'élevant à près de 30 kb, Ils ont la particularité de posséder le plus long génome à ARN parmi les virus à ARN, constitué de 27 000 à 32 000 bases (soit un génome 100 000 fois plus petit que le génome humain) Ce génome est coiffé en 5' et polyadénylé en 3'. Il comporte un grand transcrit se traduisant en 16 protéines coupées par des protéases. Ces protéines réalisent la structure du virus et permettent la réplication virale. Outre ce grand transcrit, le génome comporte également quatre gènes de l'extérieur vers l'intérieur la glycoprotéine Spike (**S**), la protéine d'enveloppe (**E**), la protéine de matrice (**M**) et la nucléocapside (**N**). L'enveloppe virale porte à sa surface de hautes projections

formées de protéines de surface S associées en trimère donnant un aspect en couronne (d'où le préfixe latin « corona ») à la particule virale [14].

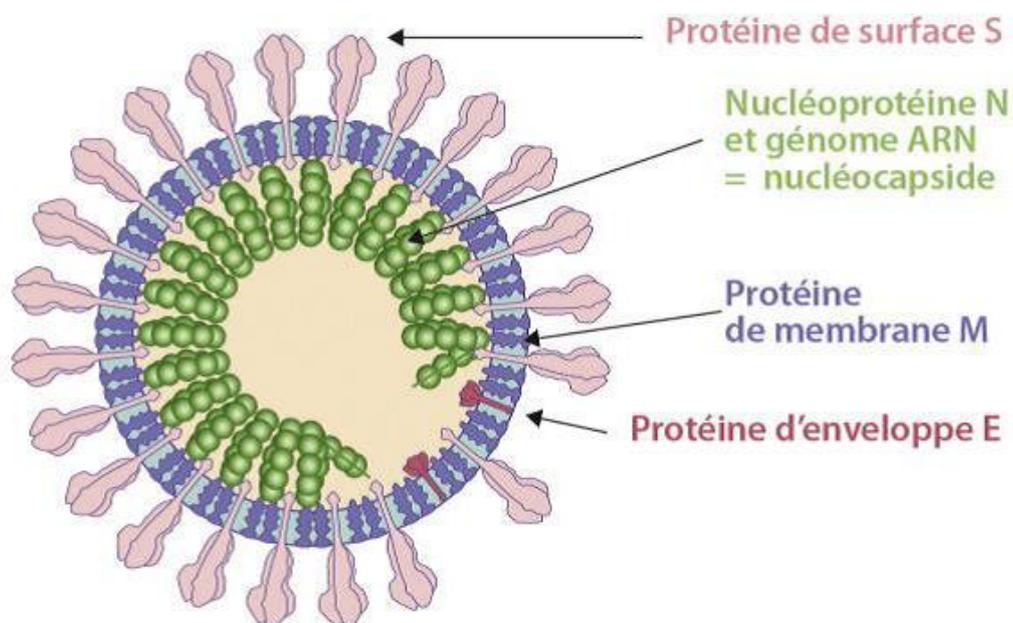


Figure 2: structure du SARS-CoV-2 [14].

Comme montrée la figure 2 le virus du SARS -CoV-2 est un virus dit enveloppé par une enveloppe d'origine cellulaire entourant sa structure cellulaire virale, qui contenant son génome. Les éléments qu'ils figurent sont, protéine **S** (Spik) (permet l'entrée du virus dans la cellule hôte), protéine **M** pour membrane (sert à lui donner sa structure), protéine **E** enveloppe (sert à la libération du virus hors de la cellule hôte), la protéine **N** nucléoprotéine (se lie à l'ARN pour former avec lui un complexe afin de produire un nouveau virion à l'intérieur de la cellule).

La protéine **S** est une protéine de fusion de type I, organisée en trimères. La partie globulaire, ou S1, permet la liaison du virus, à son récepteur cellulaire, porte les épitopes neutralisants, et présente une grande diversité génétique, la partie « tige », ou S2, assure la fusion des membranes virales et cellulaires lors de l'entrée du virus dans la cellule, Figure -3-. Dans le modèle classique, la nucléocapside (protéine N) a une structure tubulaire à symétrie hélicoïdale, fait exceptionnel chez les virus à ARN de polarité positive. Un modèle est proposé, comportant une capsid interne tubulaire à

symétrie hélicoïdale et une capsid externe icosaédrique, à symétrie cubique constituée essentiellement, de la protéine M de matrice (ou de membrane). Parmi les protéines structurales, la protéine E (anciennement appelée protéine sM pour small membrane), a été découverte plus tardivement ; elle joue un rôle important, dans la phase d'assemblage de la particule virale, et porterait des facteurs de virulence. Ainsi, il a été montré, que l'infection expérimentale de la souris par des SARS-CoV délétés du gène codant la protéine E est atténuée, Enfin, les Beta coronavirus de clade A (dont HCoV-OC43 et HCoV-HKU1) portent une protéine de surface, qui est une hémagglutinine-estérase (HE). Cette protéine présente une homologie de 30% avec la protéine HEF (hémagglutinine-estérase fusion) du virus influenza C., Elle aurait été acquise par l'ancêtre commun des Coronavirinae et des Torovirinae., Elle n'est pas nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule, et sa persistance chez les Betacoronavirus de clade A, serait liée à un avantage sélectif de l'infection, invivoparces virus qui utilisent, des acides sialiques modifiés, comme récepteurs. Ainsi, son activité acétyle estérase améliore le repartage des particules virales à partir des cellules infectées, favorisant ainsi la diffusion de l'infection [15].

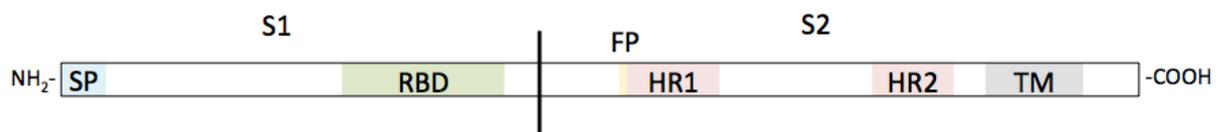


Figure 3 : Schéma général de la protéine S.

3.2. Organisation génomique

Le génome des coronavirus est de grande taille, environ 30 kb. Il s'agit d'une molécule d'ARN monocaténaire linéaire non segmentée, de polarité positive. Le génome comprend deux régions non codantes en 5' et en 3'. La partie codante est divisée en plusieurs sections. Les deux premiers tiers du génome sont constitués de deux grandes régions chevauchantes, (open Reading frame ORF1a et ORF1b), codant le complexe de réplication-transcription, dont le gène RNA-dépendant RNA Polymérase (RdRp) qui code l'ARN polymérase ARN-dépendante. Le dernier tiers du génome code les protéines de structure (S, E, M, N) et des protéines non structurales variables selon les espèces de coronavirus (Figure 4) [15].

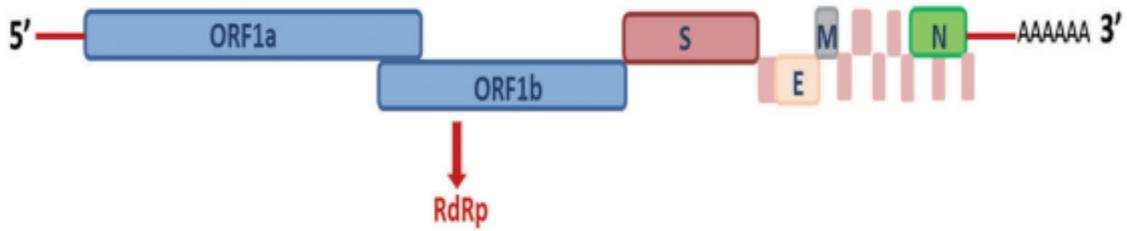


Figure 4 : Organisation génomique du SARS-CoV-2. ORF : open reading frame ; RdRp: gène codant l'ARN polymérase ARN-dépendante ; S, E, M, N : gènes codant les protéines de structure S [surface], E [enveloppe], M [membrane], N [nucléoprotéine] [15].

Les coronavirus présentent une grande diversité génétique liée à la plasticité de leur génome. Ainsi, au cours de leur évolution, ils ont pu acquérir un certain nombre de gènes codant des protéines leur permettant d'enrichir leur potentiel d'adaptation. Cette diversité génétique est liée à plusieurs facteurs : apparition et sélection de mutations lors de la réplication du génome ARN, insertions ou délétions ayant pour conséquence une modification des régions codantes, recombinaisons facilitées par la nature discontinue de la transcription du génome, présence de quasi-espèces. La région du génome qui subit la plus forte sélection est le gène codant la protéine de surface **S** qui s'attache au récepteur de la cellule hôte et qui est l'épitope des anticorps neutralisants [16] [17].

3.3 La protéase principale (M^{Pro}) du SARS-CoV-2

Également appelée la protéase principale 3-C like protéase (3CLpro), est une protéase à cystéine homodimérique et sa séquence est identique à 96% à celle du SARS-CoV M^{Pro} . Est constituée de deux chaînes polypeptidiques de 306 acides aminés et possède 3 domaines.

3.4. Cycle de réplication

Le virus se lie dans les cellules de l'hôte à un récepteur de surface cellulaire (ACE2) (ACE2 pour le SARS-CoV et le SARS-CoV-2; DPP4 pour le MERS-CoV), et la fusion entre virion et la membrane cellulaire se produit à la surface cellulaire ou à l'intérieur des endosomes, selon le virus. La fusion est déclenchée par un faible pH,

conduisant à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. Le génome viral est traduit pour produire des protéines 1a et 1ab (cette dernière par recodage ribosomal traduction ou ribosomal frame shift [18].

3CL^{pro} et PL^{pro} ont clivées ces polyprotéines (pp1a et pp1ab) en 16 protéines effectrices non structurales (les nsp), ce qui leur permet de former le complexe de réplication avec la polymérase d'ARN dépendante de l'ARN (Rdrp), qui synthétise un modèle de brin négatif d'ARN pleine longueur [24]. Protéines qui remodelent les membranes cellulaires pour former des structures qui servent de sites pour la synthèse d'ARN viral, des enzymes qui catalysent plusieurs étapes de la synthèse des structures de coiffe terminale de l'ARNm5 et des exonucléases impliquées dans la relecture lors de la réplication du génome. D'autres protéines virales sont codées par un ensemble d'ARNm emboîtés qui partagent une séquence leader commune (5'UTR) à l'extrémité 5'. La synthèse d'ARN en vrac se produit pendant le processus de synthèse d'ARN à brin négatif. La plupart des brins positifs ne sont pas répliqués, probablement parce qu'ils se relâcheront lorsque la polymérase aura fini de synthétiser en 5'UTR. L'ARN négatif résultant a une séquence UTR de 3' à la fin, qui est ensuite répliquée pour former un micro-ARNm [18].

Ces micros ARNm sont traduits pour former les protéines structurelles et non structurelles. Les protéines M, S et E attachées à la membrane sont insérées dans la cavité du réticulum endoplasmique, puis se dirigent vers le site d'assemblage du virus, le compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique-Golgi (ERGIC). Produire de l'ARN à brin négatif de pleine longueur, qui sert de modèle pour la synthèse d'ARN à brin positif de pleine longueur, puis est enveloppé par la protéine N. Le noyau germe dans ERGIC, et la membrane contenant les protéines S et E et M est obtenue. Lorsque la vésicule porteuse fusionne avec la membrane plasmique, les particules virales sont transportées vers la membrane plasmique sous forme de vésicules à paroi lisse et sont libérées de la cellule par exocytose [23]. Enfin, les particules matures du virus SARS-CoV-2 sont excrétées du corps et libérées de la cellule hôte dans l'environnement pour répéter le cycle d'infection [19].

3.4.1 Attachement: La protéine de surface S interagit avec le récepteur de surface membranaire ACE2 [21]. ACE2 est l'enzyme de conversion de l'Angiotensine 2, dont la fonction principale est de diminuer la concentration plasmatique en angiotensine, provoquant ainsi une vasoconstriction et la régulation de la pression

sanguine [22]. Ce récepteur est commun à plusieurs souches de coronavirus, dont SARS-CoV, SARS-COV-2 et NL63 [23]. Cependant, la protéine S du SARS-CoV-2 présenterait une meilleure affinité pour ACE2 [24].

3.4.2 Entrée : Alors qu'initialement, une entrée du SARS-CoV dans les cellules avait été décrite comme dépendante d'un mécanisme de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule cible, des études plus récentes ont montré [25], que cette étape faisait intervenir des mécanismes d'endocytose [26]. Une interaction de la protéine virale S avec la protéase transmembranaire à sérine 2 (TMPRSS2) permettrait son clivage, de manière dépendante du pH [27]. Exposant ainsi le peptide fusogène de la protéine S et la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane des vésicules d'endocytose [28]. Un mécanisme d'entrée semblable serait utilisé par les SARS-CoV-2 pour entrer dans les cellules épithéliales [29]. La fusion des membranes permet la libération du matériel viral dans le cytosol de la cellule infectée.

3.4.3 Expression de la réplicase virale: L'ARN génomique viral est polyadénylé en 3', permettant donc sa traduction directe en protéines par les ribosomes cellulaires. Les cadres ouverts de lecture permettent la traduction de cet ARN en plusieurs protéines non-structurales sous formes de polypeptides qui sont par la suite auto-clivés par leur activité protéolytique et réassemblés en un complexe protéique réplicase-transcriptase ARN-dépendant [30].

3.4.4 Réplication génomique, transcription et traduction. : Les ARN subgénomiques sont alors produits par transcription et traduits en protéines structurales (N, M, E et S) ou en protéines non-structurales et protéines accessoires ce qui permet l'assemblage de nouveaux virions au niveau d'un compartiment vésiculaire intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (ERGIC) A ce niveau, la furine, protéase cellulaire permettrait [31] la maturation de la protéine virale S [32] .

3.4.5 Sortie: La fusion des vésicules contenant les particules virales et de la membrane plasmique cellulaire permet le relargage par exocytose des virions dans le milieu extracellulaire [32].

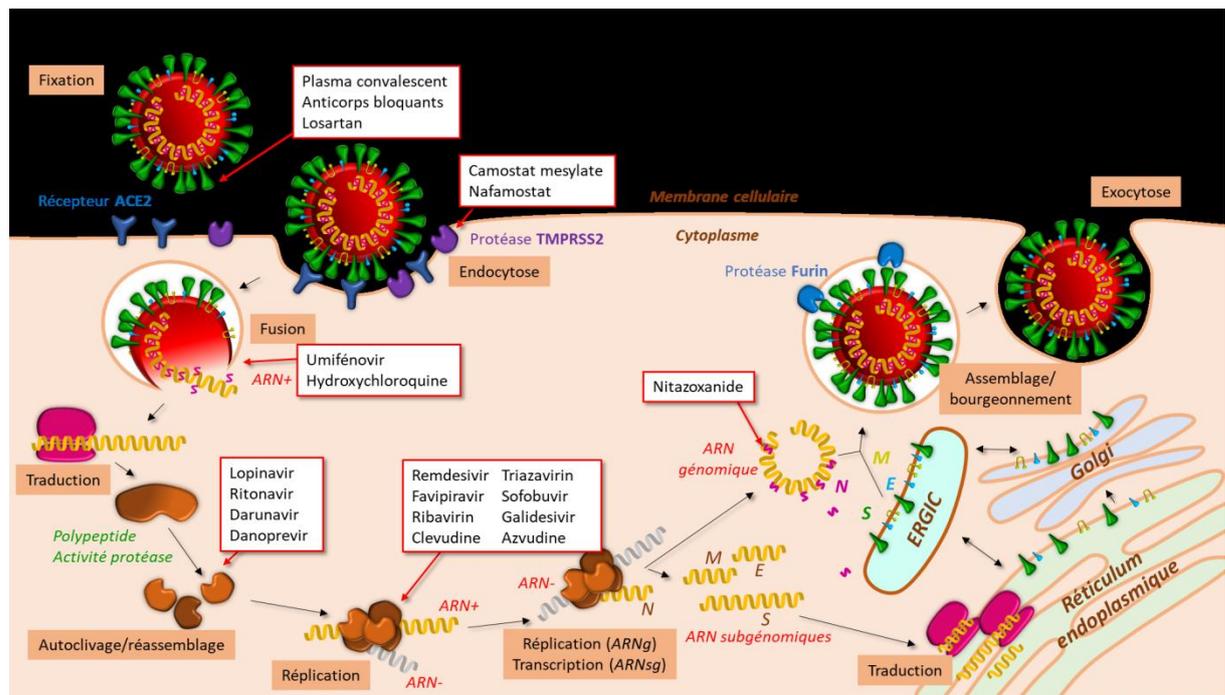


Figure 5: Cycle de réplication virale dans les cellules eucaryotes. Le virus se lie à un récepteur à la surface des cellules (ACE2 pour le SARS-CoV et le SARS-CoV-2; DPP4 pour le MERS-CoV et le SARS-CoV 2) [24].

4 .Mode de transmission

Dans cette section, nous décrivons les types de transmission possibles du virus SARS-CoV-2 par contact direct, indirect ou étroit avec une personne infectée par le biais de sécrétions enflammées, telles que les sécrétions respiratoires, la salive ou les gouttelettes respiratoires [33] ainsi que les facteurs environnementaux qui favorisent et influencent la transmission du virus [34].

Transmission par gouttelettes

Lorsque la personne moyenne est en contact direct, c'est-à-dire moins que beaucoup avec une personne infectée, dans le cas de la parole ou du chant. Ici, des infections respiratoires se produisent, ce qui signifie que des gouttelettes respiratoires porteuses du virus atteignent le nez ou les yeux d'une personne saine, et s'expose ainsi à l'infection .Et la transmission devient indirecte si j'ai un objet ou une surface infectée (figure 6) [33].

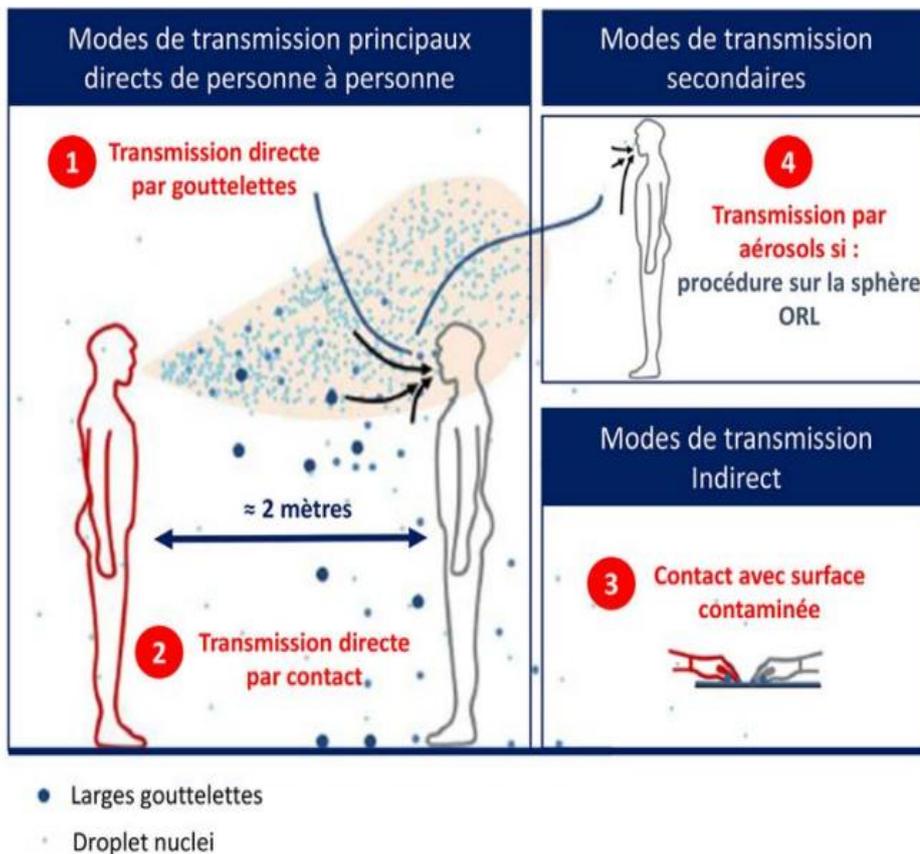


Figure 6 : Schématisation des différents modes de transmission du SARS-CoV-2 [35].

Transmission aérienne

Ce virus peut être transmis par des aérosols dans l'air. Les aérosols sont de fines gouttelettes qui restent dans l'air, surtout à l'intérieur [33].

Infectés Transmission par des surfaces

En général, les coronavirus ne survivent pas longtemps sur les objets, de quelques heures à quelques jours, cela dépend notamment du type de surface et de la température et de l'humidité environnante. Certaines variantes semblent se transmettre plus facilement que d'autres. Les personnes vaccinées peuvent également transmettre l'infection si elles sont infectées par certaines variantes telles que la variante Delta ou la variante Omicron [33].

5. Diagnostic de l'infection par le SARS-CoV-2

Le diagnostic d'infection à SARS-CoV-2 se manifeste sur un ensemble de vicioux biologiques et radiologiques, afin de faire face à l'émergence avec l'émergence du virus SARS-CoV-2 qui provoque l'épidémie mondiale COVID, un grand nombre de tests diagnostiques ont été développé et mis à jour et diffusé sur le marché en peu de temps, où il est nécessaire de vérifier l'exactitude des méthodes qui ont été testées pour le panel d'échantillons [36] Certains tests de diagnostic sont représentés dans la sélection de la RT-PCR réaction de polymérase qui contribue à la découverte de l'antigène CoV-2 dans l'étape de refus [37].

5.1. Testée moléculaire par RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

C'est une technique de diagnostic qui détecte le génome viral dans des échantillons biologiques, ce qui est utile dans la phase aiguë de la propagation de l'infection virale, afin que la réplication du virus devienne active et efficace, car un faible niveau d'anticorps est associé à une diminution de l'efficacité. Elle est réalisée sur des prélèvements naso-pharyngés, oro-pharyngés ou des prélèvements des voies respiratoires basses (le lavage broncho-alvéolaire, les aspirations endo-trachéales). Les échantillons sont prélevés par le personnel et les formateurs équipés d'un équipement spécial. Les échantillons sont prélevés trois jours après le début de symptômes, tout en respectant les mesures préventives .Après le prélèvement, les échantillons peuvent être mis au réfrigérateur à une température de 4 Celsius afin qu'il reste un maximum de 3 jours pour chaque personne, après quoi ils sont traités et analysés [37].

Dans sa mise en œuvre, la détection du génome viral (ARN) dans les voies respiratoires supérieures dépend en laboratoire du "protocole de Berlin" mis au point par le professeur Christian Drosten .Ce test cible à la fois le gène E et le gène RdRq du SARS-CoV-2 (Figure 7) [38].

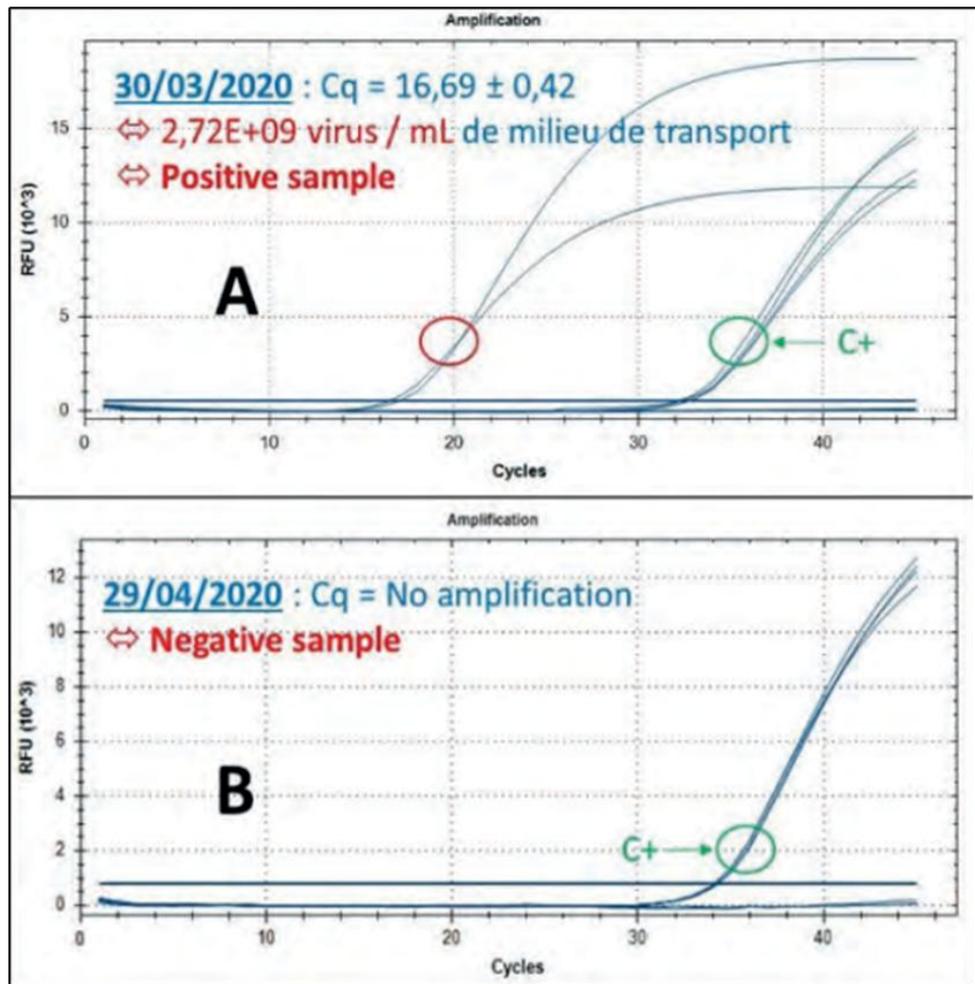


Figure 7 : Résultat RT-qPCR sur le gène E du SARS-CoV-2: (A), test positif ($Ct = 20$) ; (B), test négatif (absence de fluorescence) [38].

5.2. Teste sérologique avec teste rapide

Il s'agit de tests de type bandelettes immun chromatographiques qui ne nécessitent aucun équipement développé et permettent une détection rapide de l'antigène SARS-CoV-2 à partir d'un échantillon prélevé dans le nasopharynx, en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes viraux (protéines N et S) visibles à l'œil nu, par particules. Les tests morphologiques rapides de dépistage qui utilisent une alternative à la RT-PCR sont utiles dans les décisions cliniques et de quarantaine [37].

Ce diagnostic repose sur la détection qualitative des IgM ou IgG dans le sang total ou le sang ou le plasma humain dans un délai allant de 10 à 15 minutes, où les premiers symptômes sont avec l'apparition de M (IgM) plus que les IgG tardives (IgG) [39]. Le système immunitaire produit de l'immunoglobine pour fournir une

protection contre le SARS-CoV-2, ce qui explique la possibilité de détection des antigènes. Dans le cas de l'infection par le SARS-CoV-2, le profil de séroconversion apparaît plus variable, l'apparition des IgM peut précéder celle des IgG, mais parfois être simultanée, voire postérieure, généralement les anticorps apparaissent à partir du cinquième jour après le début des symptômes (spécifiquement pour les IgM environ 7 jours et 21 jours pour les IgG) Après 28 jours, les IgM sont présentes chez la majorité des patients Chez un petit nombre de patients infectés par le SARS-CoV-2. De plus, tous les patients infectés ne développent pas d'anticorps, et une grande partie des patients infectés par le SARS-CoV-2 voient leur taux d'anticorps disparaître avec le temps. Cela rend difficile l'interprétation d'une sérologie négative, car aucune infection précoce, infection antérieure ou protection contre le SARS-CoV-2 ne peut être éliminée. Quant à la nature protectrice des anticorps SARS-CoV-2, elle fait encore débat [37].

Une réponse immunitaire spécifique a été détectée chez les patients et les convalescents et en l'absence de traitement antiviral efficace, l'élimination du virus de l'organisme ne peut être liée qu'au système immunitaire de l'hôte et à ses fonctions. Il existe deux grandes classes de tests sérologiques : les tests automatisés tels que le dosage immuno-enzymatique (ELISA) ou le dosage immunologique par chimioluminescence (CLIA), qui sont réalisés à partir d'une prise de sang et qui nécessitent un plateau technique approprié pour l'analyse des échantillons. Les tests unitaires dits rapides se font à l'aide d'une goutte de sang prélevée du bout du doigt et le résultat s'affiche directement en quelques minutes [37].

5.3. Diagnostic radiologique

Face aux difficultés d'effectuer un grand nombre de tests de réaction en chaîne par polymérase (PCR) et d'obtenir des résultats rapidement, le scanner thoracique sans injection s'est avéré être une alternative fiable au diagnostic du Covid-19 [40], et constitue la première ligne d'examen d'imagerie pulmonaire chez les patients présentant des signes d'altération de la tolérance respiratoire (essoufflement ou saturation) [41]. Dans les cas graves avec suspicion d'obstruction, un scanner pulmonaire doit être réalisé avec l'injection d'un produit de contraste [37].

La tomographie joue un rôle central dans le diagnostic et l'évaluation de l'atteinte pulmonaire dans le COVID-19. À l'heure actuelle, les protocoles Computed Tomography (CT) sont utilisés pour estimer les lésions pulmonaires [42].

La malformation du tissu pulmonaire observée dans les formes sévères de COVID-19 est une atteinte alvéolaire diffuse avec thrombose des petits vaisseaux sanguins. Ce qui se traduit en imagerie thoracique par une infiltration vitreuse multifocale de type sol à prédominance périphérique (Figure 8) [43].

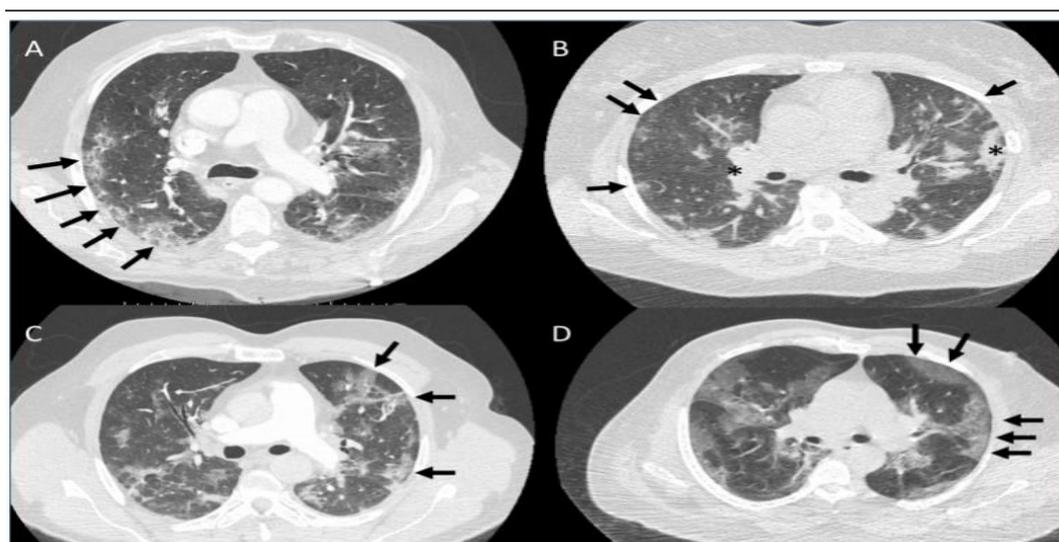


Figure 8: Atteintes caractéristiques de la pneumonie COVID-19. Flèches noires : opacités en verre dépoli de localisation sous pleurale. Astérisque: condensation pulmonaire moins caractéristique. **A, C et D** : pattern typique de pneumonie COVID-19 avec uniquement du verre dépoli périphérique. **B** : association de lésions condensates et de verre dépoli périphérique [43].

6. Classification et taxonomie

La dénomination des virus est en fait un système formel de noms utilisé pour nommer les virus et les taxons. L'existence de noms pour presque tous les virus est due à la reconnaissance historique que les virus sont les agents pathogènes de certaines maladies. L'objectif de l'Organisation mondiale de la santé, une Agence des Nations Unies, est de contrôler, contenir et enquêter sur les maladies infectieuses, y compris les épidémies virales. Il est responsable de nommer les maladies [44].

Les virus corona (CoV) sont originaires d'une variété de différents types d'animaux principalement représentés par les chauves-souris, les vaches, les

chameaux et les souris, en plus de la prévalence élevée et de la large distribution des COV et en raison du niveau élevé de diversité génétique et des recommandations répétées selon lesquelles ces virus représentent un danger effrayant pour la santé humaine, trois coronavirus hautement pathogènes d'origine zoonotique, le SARS-CoV, le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) et le SARS-CoV-2, qui provoquent des maladies respiratoires mortelles, ont été signalés chez l'homme au 21^e siècle. Selon le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV), le SARS-CoV-2 est classé comme suit:

Les virus corona appartiennent au monde Riboviria, royaume Orthornavirae, phylum Pisuviricota, classe Pisoniviricetes, ordre Nidovirales, sous-ordre Cornidovirineae, famille Coronaviridae, famille Orthocoronavirinae, genre Betacoronavirus, sous-genre Sarbecovirus, espèces de SRAS-CoV-2. La classification actuelle des virus corona contient de nombreuses espèces dans le monde Riboviria, royaume Orthornavirae, Phylum Pisuviricota, ordre Nidovirales, et dépendantsm, Cornidovirineae, appartenant à la famille des Coronaviridae, et deux sous-familles d'Orthocoronavirinae divisées en quatre genres : virus corona, virus bêta-coron et deltacoronavirus. Chez l'homme, la maladie est causée par sept types connus de CoV. Le coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43), le coronavirus humain HKU1 (HCoV-HKU1), le SARS-CoV-2, le SARS-CoV et le MERS-CoV sont des Betacoronavirus. D'autres genres qui peuvent provoquer des maladies chez l'homme comprennent l'alpha-coronavirus humain NL63 (HCoV-NL63) et le coronavirus humain (HCoV-229E) (figure 9) [45].

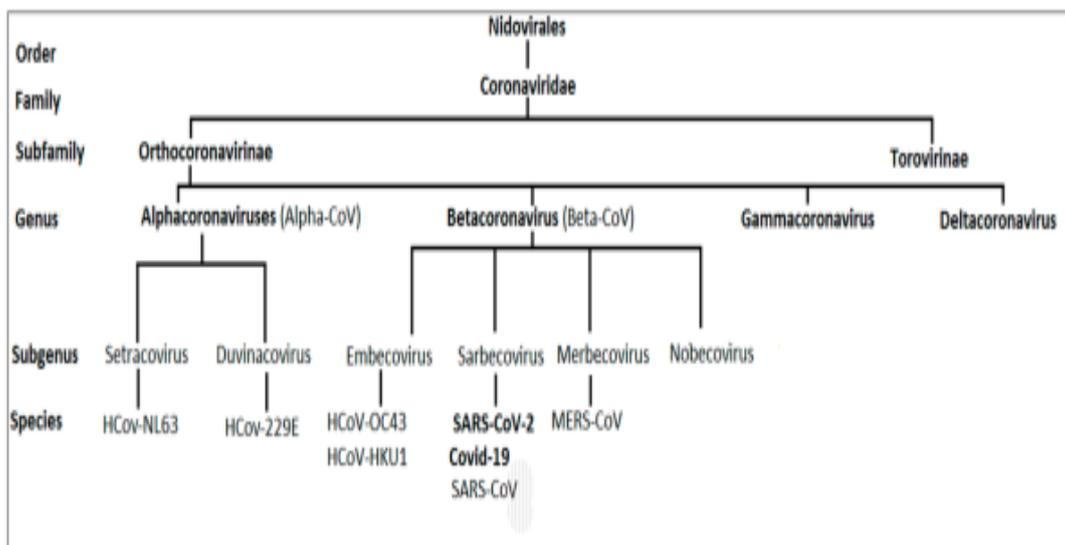


Figure 9 : Classification des coronavirus dans le domaine Riboviria, royaume Orthomavirae, phylum Pisuviricota, ordre Nidovirales, sous-ordre Coronaviridae, et deux sous-familles Orthoconavirinae, est divisée en quatre genres : Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gamacoronavirus et Detecoronavirus. Coronavirus humain OC43 (HCoV-OC43), humain Le coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1), le SARS-CoV-2, le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) et le coronavirus respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) sont des bêtacoronavirus. Le NL63 humain (HCoV-NL63) et le coronavirus humain (HCoV-229E) sont des Alphacoronavirus [45].

6.1.Mutation SARS-CoV-2

Bien que la plupart des mutations du génome du SARS-CoV-2 soient susceptibles d'être délétères, rapidement éliminées ou relativement neutres, une petite proportion peut affecter les caractéristiques fonctionnelles et potentiellement altérer l'infection et la maladie ainsi que les interactions avec l'immunité de l'hôte, l'évolution du SARS-CoV-2 est caractérisée par l'émergence de groupes de mutations, liées à des "changements préoccupants" qui affectent à leur tour les caractéristiques du virus, notamment la transmissibilité, l'antigénicité [46].

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN simple brin dirigé positivement, de sorte qu'un virus avec un génome peu stable est plus sensible à l'accumulation de mutations .Le groupe SARS-CoV-2 se compose de deux ensembles de protéines :

Protéines structurales (SP) et protéines non structurales (NSP), les SP possèdent 4 gènes :

- Including E(envelop)
- M (Membrane)
- S(Spike)
- N (Nucléocapside)

Les NSP sont principalement des protéines fonctionnelles ou des enzymes qui jouent un rôle dans la réplication du virus et agissent pour stimuler la réponse de l'hôte à l'infection. Ces gènes sont codés dans plusieurs groupes, comme suit :

- ORF1b(NSP12_16)

- ORF1a(NSP1_11)
- ORF3a, ORF6, ORF7, ORF8, ORF10 [47].

La réplication viral provoque des mutations dans le génome (en particulier les virus ayant ARN tels que le SARS-CoV-2), où la diminution relative de la mutation évolutive du SARS-CoV-2 est considérée comme due à l'exo ribonucléase correctrice d'erreurs et est estimée à 1×10^{-3} substitutions de nucléotides par site et par année [48].

Ces mutations se répartissent en 7 catégories, dont :

D614G(ASP614GLY)

La prévalence de la mutation D614G a augmenté fin février 2020, dépassant ainsi tous les virus ancestraux et a atteint un niveau mondial de prévalence approximative de 100%. Les clones de virus contenant D614G étaient également associés à une transmission accrue entre hamsters.

Des études de microscopie électronique ont montré que la mutation D614G perturbe un ou plusieurs contacts environnementaux, et il a également été rapporté que Domaine Carboxy-Terminal S1 (CTD) et le domaine S2 peuvent augmenter la réplication du SARS-CoV-2 par un mécanisme similaire. D614G est également responsable de l'augmentation du nombre de protéine Spike par virion, et du taux de clivage S1/S2 [49].

N501Y(ASN501TYR)

La mutation N501Y est présente dans les CoV Alpha, Beta et Gamma. Cette mutation augmente l'affinité pour l'ACE2 et augmente également la réplication du virus dans les cellules des voies respiratoires supérieures humaines ainsi que dans les voies respiratoires supérieures des hamsters, Il n'affecte pas la liaison et la neutralisation de la plupart des anticorps monoclonaux (mAbs) [49].

E484K(GLU484LYS)

La mutation E484K est présente dans les VOC Beta et Gamma, et dans les VOI Eta (B.1.525), Iota (B.1.526), Theta (P.3), et Zeta (P.2). Il est identifié par une incidence élevée de poly anticorps et se développe chez les personnes infectées par le

SARS-CoV-2. Il a également été signalé dans de nombreuses sous-lignées de taxons et E448Q(GLU448GLN) a été signalé dans le Kappa VOI (B.617.1).

Autre mutation de RBD (Receptor Binding Domain):

L452R (LEU452ARG)

La mutation L452R est présente dans le Delta VOC, ainsi que dans les VOI Kappa (B.1.617.1) et Epsilon (B.1.427/9). Il réduit la sensibilité à plusieurs mAb de classe 2 RBM [49].

6 .2. Variantes

Au cours des derniers mois, des variantes du SARS-CoV-2 avec de nouvelles protéines sont apparues car elles influencent les aspects épidémiologiques et cliniques de la pandémie de COVID-19. L'identification de quatre lignées virales en expansion rapide depuis décembre 2020, désignées variantes préoccupantes, a inauguré une nouvelle étape de la pandémie. Les quatre variantes préoccupantes: Alpha, bêta, Gamma et Delta [49].

Variante Alpha(B.1.1.7)

Là où les mutations du variant alpha constituent la mutation N501Y, P681H de RBD et des deletions au niveau de NTD aux sites 69-70 et 144, le variant alpha contient également de nombreuses mutations qui ne touchent pas la protéine Spike y compris nsp6: Δ 106–108 et les mutations de la nucléocapside D3L, R203K et G204R, qui peuvent augmenter la transmission en antagonisant de l'immunité innée [49].

Variante Beta (B.1.351)

La variante bêta contient 3 mutations au niveau du RBD à savoir (N501Y, E484K et K417N) cinq mutations au niveau du NTD [49].

Variante Gamma (p.1)

Il contient des mutations au niveau du RBD (N501Y, E484K, K417T) et contient également cinq mutations au niveau du NTD, dont il a été démontré que la mutation L18F interfère avec la liaison des anticorps neutralisants ciblant le NTD [49].

Variant Delta:

La variante delta a une transmissibilité d'environ 60 % de la variante alpha [50]. Certains rapports ont montré que les membres des souches B.1.617 présentent une sensibilité réduite à certains anticorps monoclonaux par rapport à la variante alpha et contiennent également la mutation RDB-T478K [51].

Variant Omicron

Il a été signalé pour la première fois le 24 novembre 2021 par l'Organisation mondiale santé, il a été classé comme variante sous surveillance (UVM), et seulement deux jours plus tard, il a été classé comme COV, certaines études ont indiqué qu'il est possible que la variante Omicron soit plus contagieux que les variants Alpha et Beta. Le séquençage génétique du variant Omicron a révélé la présence d'un grand nombre de mutations non synonymes, parmi lesquelles des mutations se sont avérées être impliquées dans la transmissibilité et la gravité de la maladie [52]. Il compte plus de 50 mutations, dont beaucoup sont connues pour affecter la transmissibilité ou provoquer une évasion immunitaire [53].

Plus de 60 substitutions/insertions/délétions ont été identifiées dans la variante Omicron. Cela lui a valu le plus grand nombre de sites de mutation pour toutes les variantes du SARS-COV-2. La variante Omicron contient 6 mutations (K856R, L2048I, A2710T, T3255I, P3395H, I3758V) et deux délétions (acide aminé 2083 et acide aminé 3764-376) et cela se trouve dans ORF1a. La variante a deux substitutions (P314L et I15667V). En ce qui concerne les protéines structurales, il y a une substitution (T9I) dans l'enveloppe (E) et trois substitutions (Q19E, D3G, A63T) dans la membrane (M) [52].

7. Thérapeutiques

7.1. Influence potentielle sur la vaccination

La stratégie adoptée aujourd'hui dans le monde pour réduire la propagation de l'épidémie est l'adoption vaccination d'un vaccin à large base selon l'Organisation mondiale de la santé, la consiste à immuniser une personne contre les maladies infectieuses. Les vaccins stimulent le système immunitaire et empêchent une personne d'être infectée. Un vaccin est une préparation qui, lorsqu'elle est administrée à un individu, stimule l'immunité contre la maladie en stimulant le système immunitaire de

l'individu [54]. La vaccination préviendra les formes graves d'infection par le SARS-CoV-2 mais empêchera également la propagation du virus en acquérant une immunité collective [55].

Plusieurs études indiquent que les réponses des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ jouent un rôle important dans la résolution de l'infection par le SARS-CoV-2, ainsi que dans la protection, en particulier dans les modèles animaux. Contrairement à la réponse des anticorps, la réponse des lymphocytes T est beaucoup plus importante et est dirigée contre un grand nombre de protéines virales. Une étude récente a démontré un large schéma immunitaire de la réponse T, avec 8 à 9 antigènes nécessaires pour couvrir 80 % de la réponse. Cela signifie qu'afin de surveiller l'effet sur la réponse globale des lymphocytes T contre le SARS-CoV-2, des modifications importantes et diverses du génome viral seront nécessaires [56].

En l'absence d'un lien protecteur actuellement, on émet l'hypothèse que les réponses immunitaires devraient inclure des agents protecteurs vaccinaux, comme le recommande l'Organisation mondiale de la santé, un contrôle dirigé contre la protéine Spike (ou contre RBD) associé aux réponses cellulaires Th1, mais pas Th2. De plus, les vaccins doivent utiliser une formulation capable de stimuler rapidement des niveaux élevés d'AcN avec le rapport AcN/Ac total le plus élevé possible afin de réduire le risque d'exacerbation de la maladie. Il serait préférable d'éviter les adjuvants qui stimulent les réponses de type Th2.

Grâce aux connaissances acquises lors du développement de vaccins contre le SARS-CoV et MERS, les chercheurs ont pu commencer à développer des vaccins candidats contre SARS-CoV-2 quelques semaines après le début de l'épidémie. Le choix des antigènes cible et du type de plateforme vaccinale repose sur des études préliminaires de vaccins dirigés contre ces deux types de coronavirus. La protéine de surface Spike (S) contenant le domaine de liaison au récepteur (RBD) est un bon antigène vaccinal car elle stimule les anticorps neutralisants qui empêchent le virus de se lier aux cellules hôtes et l'infection *in vitro*. Bien qu'ils n'aient pas été testés contre le SARS et le MERS, les vaccins à base d'ARNm sont potentiellement de haute technologie [57].

7.2. Différent types vaccins

7.2.1. Vaccins à ARNm

De nouvelles avancées dans l'exploitation de l'ARNm pour l'administration de vaccins ont le potentiel d'améliorer considérablement le développement de vaccins pour de nombreux agents pathogènes. Dans ces vaccins, des nanoparticules sont utilisées pour protéger l'ARNm codant pour la protéine S stabilisée par préfusion en cours de route à l'espace intracellulaire. L'hôte utilise l'ARNm pour créer un profil de protéine cible (protéine S dans ce cas), ce qui conduit à une réponse immunitaire équilibrée et cohérente [58].

Il existe deux principaux types de vaccins contre le SARS-CoV-2 à base de mRNA :

- **Vaccins ARNm BNT162b (BioNTech-Pfizer)**

Le vaccin BioNTech-Pfizer est un vaccin développé par la société allemande BioNTech avec le géant américain Pfizer [59]. Approuvé le 31 décembre 2020 [54]. Il s'agit d'un vaccin candidat à ARN nucléoside (ARNm) encapsulé dans des nanoparticules lipidiques qui codent pour chaque protéine S [59]. Pour qu'une personne soit considérée comme totalement immunisée, elle doit avoir été vaccinée pendant au moins quatorze jours [54].

- **Vaccin ARNm-1273 (NIAID-Moderna)**

Ce vaccin a été développé par le laboratoire Moderna Pharmaceuticals de Cambridge [59]. Approuvé le 6 janvier 2021 [54] , Il s'agit d'un vaccin à ARNm encapsulé dans une nanoparticule lipidique stable qui code pour la protéine S .une fois que le vaccin à ARNm-1273 pénètre dans les cellules hôtes , la traduction et la production de protéines commencent à stimuler la réponse immunitaire [59].

Pfizer-BioNTech et Moderna sont des vaccins à base d'ARNm qui montrent une efficacité de plus de 90 % contre le SARS-CoV-2 dans les essais cliniques. Cette efficacité élevée du vaccin est associée à un très petit nombre d'événements indésirables, bien que les interactions locales et systémiques avec le vaccin soient courantes. Cela présente plusieurs avantages, notamment la rapidité de fabrication du vaccin (semaines) et la capacité à générer une réponse Th1 et Th2 [58].

Un problème de santé publique concerne les mutations de la protéine SARS-CoV-2 dans les souches B.1.351 (E484K et K417N) et P.1 (E484K et K417T) avec échappement potentiel aux anticorps de SARS-CoV-2. La possibilité d'échappement immunitaire a été étudiée en évaluant la capacité de neutralisation du sérum ou du plasma d'individus ayant déjà été infectés par B.1.351 et p.1, et des sérums d'individus ayant reçu des vaccins à ARNm COVID-19 contre B.1.351 et P.1. En général, l'activité de neutralisation semble être similaire aux virus natifs non mutagènes et B.1.1.7, réduite pour B 1.351 et intermédiaire pour P.1. L'efficacité de deux doses de vaccin à ARNm BNT162b2 a été estimée à 75 % contre toutes les doses cliniques d'infections B.1.351 et à 97 % contre les maladies graves, critiques ou mortelles au Qatar [61].

Il a été récemment rapporté que la variante Omicron présente une résistance sévère aux anticorps neutralisants (nAbs) chez les receveurs sains ~~de~~ a deux doses de vaccins ARNm-1273 ou BNT162b2 ainsi que chez les patients COVID-19. Cependant, les individus en bonne santé qui ont reçu une troisième dose de rappel d'ARNm montrent une protection significativement plus forte contre la variante omicron et sont comparables à leur protection contre d'autres variantes préoccupantes du SARS-CoV-2 (COVs). Ces résultats indiquent que l'amélioration de la vaccination améliore non seulement les niveaux de nAb, mais élargit également la réponse des nAb contre ces COV, y compris la variante Omicron [62].

7.2.2. Vaccins à base d'adénovirus

Une autre façon de transférer du matériel génétique du coronavirus dans des cellules humaines pour produire des protéines du SARS-CoV-2 consiste à utiliser un vecteur viral. Il s'agit d'un virus modifié et inoffensif conçu pour transmettre des informations génétiques. Le vecteur viral utilisé n'est pas celui qui cause le COVID-19 mais un adénovirus, un virus responsable de certains rhumes chez l'homme ou le chimpanzé. Une fois injecté dans l'organisme, l'adénovirus va temporairement infecter les cellules et leur permettre de produire une protéine spécifique du coronavirus (la protéine de pointe des vaccins toujours en développement). Cette protéine ne rend pas malade mais est reconnue par le système immunitaire qui va alors développer des défenses immunitaires contre elle [63].

Quatre vaccins à adénovirus sont homologués pour une utilisation générale ou d'urgence :

- **Vaccin ChAdOx1/ AZD1222 (Oxford University-AstraZeneca)**

Le vaccin Astra Zeneca est produit par Astra Zeneca, un groupe de Société pharmaceutique suédo-britannique en partenariat avec l'université d'Oxford [59]. Agréé en février 2021 [64]. Un vaccin expérimental dirigé contre l'adénovirus du chimpanzé qui code la protéine Spike pour le SARS-CoV-2 [65]. Une fois le vaccin injecté, le virus vecteur du chimpanzé pénètre dans la cellule hôte et la stimule à fabriquer la protéine S. Par la suite l'organisme hôte reconnaît la protéine S comme étrangère et produit des anticorps pour neutraliser le virus [59].

- **Vaccin Janssen Ad26.COV2. S(Johnson &Johnson)**

Un vaccin à vecteur viral non récurrent développé par la société pharmaceutique américaine Johnson & Johnson [59]. Approuvé en avril 2021 [64], et est un adénovirus humain recombinant du vecteur de type 26 codant pour la protéine Spike SARS-CoV-2 [65], ne contient aucun additif, conservateurs, ou matières d'origine animale [59].

- **Vaccin Sputnik V (Gam-COVID-VAC)**

Il a été développé par le centre national de recherche russe pour l'épidémiologie et la microbiologie esthétique conformément aux bonnes pratiques de fabrication, et est basé sur combinaison de deux adénovirus: rAd type 26 (rAd26) et rAd type 5 (rAd5) [59], tous deux recombinants pour le gène intact de la glycoprotéine S de SARS-CoV-2 (rAd26S and rAd5S), qui ont montré en phase 1/2 un profil satisfaisant de sécurité et une forte immunogénicité [66].

- Vaccin à vecteur d'adénovirus produit par CanSino Biologics of China [63].

7.2.3.Vaccin sous-unitaire

- **Candidat vaccin Novavax (NVX-CoV2373) Novavax**

Le vaccin Novaxovid contre la COVID-19 est le premier vaccin sous-unitaire recombinant contre la COVID-19 au Canada. Le 17 février 2022 [67]. Le vaccin Novaxofide se compose de : Nanoparticules de protéine SARS-CoV-2 purifiées et entièrement recombinantes, Co-administrées avec l'adjuvant Matrix-M. Ce dernier est

un nouvel adjuvant à base de saponines pour renforcer la réponse immunitaire et faciliter l'activation de niveaux euphorisants d'anticorps neutralisants, ce qui augmente l'amplitude de la réponse immunitaire spécifique à la protéine S [67] [68].

Ce vaccin induit des anticorps de liaison et de neutralisation contre la protéine S du SARS-CoV-2. Cette Les participants plus âgés avaient des titres d'anticorps de liaison et de neutralisation légèrement inférieurs (65 ans et plus) par rapport aux participants plus jeunes (18 à 64 ans) après 2 doses, et Similaire dans les essais cliniques 2019nCoV-301 et 2019nCoV-302. Anticorps de liaison et La neutralisation est induite par une dose de vaccin et stimulée par une deuxième dose de vaccin. Le Pic de réponse immunitaire observé les 35 jours, après 14 jours Deuxième dose, avant de diminuer. Les anticorps étaient encore détectables jusqu'au jour 189, La chute d'anticorps neutralisants est plus forte que celle d'anticorps de liaison, la chute Environ 32 fois et 12 fois, respectivement, par rapport aux titres mesurés au jour 35. Les réponses immunitaires à médiation cellulaire spécifiques à la protéine S du SARS-CoV-2 ont 7 jours après la première dose du vaccin, mais toujours Augmente 7 jours après la deuxième dose. Les caractéristiques de ces réponses suggèrent que Réponses immunitaires à médiation cellulaire biaisées Th-1 [67].

Une dose de rappel de Novavax administrée au moins 6 mois après une série dont l'immunosuppression primaire a été démontrée. Les tests de réactivité croisée ont montré des niveaux accrus d'anticorps inhibiteurs des récepteurs IgG et d'hACE contre les variant préoccupant (VP), y compris les variantes delta et omicron, 7 jours après avoir reçu une dose de rappel par rapport à 7 jours après avoir reçu une deuxième dose. Estimations de l'efficacité potentielle d'un vaccin contre la souche originale du SARS-CoV-2 était similaire aux estimations dans les pays où la souche dominante était répandue en tant que variante alpha. Cependant, l'efficacité potentielle du vaccin était plus faible contre la variante bêta. Il n'existe pas de données sur l'efficacité potentielle ou réelle de Novaxovid contre les variants delta ou omicron [67].

7.2.4. Vaccins à base de virus inactivés

- **Vaccin BIBP (Sino pharm-China National Pharmaceutical Group)**

Le vaccin COVID-19 BIBP inactivé développé par Sinopharm / China National Pharmaceutical Group, Il s'agit d'un vaccin à virus complet inactivé, contenant un adjuvant d'hydroxyde d'aluminium.

Recevoir le vaccin au préalable ne modifiera pas les résultats des tests d'amplification des acides nucléiques antigéniques ou des tests utilisés pour diagnostiquer une infection grave/actuelle par le SARS-CoV-2. Cependant, il est important de noter que le profil de test sérologique actuellement disponible pour le SARS-CoV-2 mesure les niveaux d'IgM et/ou d'IgG dirigés contre une protéine S (Spike) ou une protéine de nucléocapside. Le vaccin contient le virus SARS-CoV-2 inactivé qui induit une réponse immunitaire contre la protéine squelettique et contre la nucléoprotéine ; Par conséquent, un résultat positif lorsqu'un test détecte des IgM ou des IgG contre la protéine S ou un test qui détecte spécifiquement des IgM ou des IgG contre la protéine centrale peut indiquer une infection ou une vaccination antérieure [69].

- **Vaccin Coronavac (Sinovac)**

Le vaccin Sinovac produit par Sinovac Life Science CO ,Ltd .Basé à Beijing, affilié à Sinovac Biotech, est un vaccin complet à virus inactivé basé sur le principe de l'inoculation de cellules rénales desinge vert africain (cellules Vero) avec le virus SARS-CoV-2 , concentrée , purifiée , puis finalement adsorbée sur hydroxyde d'aluminium [59]. Des données préliminaires d'une étude menée au Brésil Indique qu'il s'agit du vaccin le plus efficace contre la variante gamma [70] [71].

Chapitre 02

Matériel de banque de donnée utilisé

1. Banque de données sur les protéines (PDB)

La Protein Data Bank (PDB) : est un référentiel de données structurales 3D de macromolécules biologiques, telles que des protéines et des acides nucléiques. Elle est devenue la première ressource numérique en libre accès en sciences biologiques [72] [73]. Ces structures sont obtenues par: Cristallographie aux rayons X, spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, ou de plus en plus par cryo-microscopie électronique, ces données sont déposées dans la PDB par des biologistes et biochimistes du monde entier, librement accessibles sur Internet (figure.10) [74].

La Protein Data Bank (PDB) a été fondée en 1971 avec moins de dix structures cristallines de protéines aux rayons X, devenant ainsi la première source de données numériques en libre accès dans les sciences biologiques. Peu de temps après la publication des structures aux rayons X de la myoglobine et de l'hémoglobine, la communauté de la biologie structurale a entamé des discussions sur la meilleure façon d'archiver les résultats cristallographiques d'une protéine et de les rendre largement disponibles.

En 1971, Cold Spring Harbor Laboratory a accueilli un symposium sur la cristallographie des protéines, Au cours de laquelle une discussion approfondie a eu lieu sur le partage des données. Walter C. Hamilton, un participant, a proposé de créer la première maison de ce qui est maintenant connu sous le nom de Protein Data Bank (PDB). Peu de temps après, le PDB a été lancé au sein du Département de chimie du Brookhaven National Laboratory (BNL), basé sur la Framework Protein Structure Library. L'importance de l'archivage des données scientifiques en tant qu'entreprise mondiale a été initialement comprise, et l'annonce publique de l'APB en 1971 mentionnait explicitement la collaboration et la possibilité de présenter les données via le Cambridge Crystallographic Database Center.

Lorsque PDB a été lancé, la soumission des données était facultative. Dans les années 1980, en raison de cette influence, les membres de la communauté de la biologie structurale ont commencé à démontrer l'importance de la conservation obligatoire des données. Divers comités ont été mis en place pour décider quelles données doivent être demandées et quand elles doivent être publiées. Les directives ont été publiées en 1989 et, au fil du temps, l'approbation par toutes les revues scientifiques nécessite désormais le dépôt des coordonnées atomiques de PDB avant que les études structurales puissent être publiées [73].

En 2008, la poursuite du développement des normes communautaires a conduit au dépôt obligatoire des facteurs de structure cristalline et des contraintes RMN avec des coordonnées atomiques. En 2010, les transformations RMN pour la précipitation chimique sont devenues obligatoires. En mai 2016, environ 80 % des entrées d'archives de PDB contenaient des données empiriques.

L'archive PDB contient actuellement environ 130 000 entrées. Il est géré par la World Protein Data Bank Organisation (wwPDB ; wwpdb.org), qui comprend la banque de données sur les protéines du RCSB (RCSB PDB ; rcsb.org) Banque de données sur les protéines du Japon (PDBj ; pdbj.org), Banque de données sur les protéines d'Europe (PDBe ; pdbe.org), et BioMagResBank (BMRB; www.bmrb.wisc.edu). Les quatre partenaires wwPDB exploitent un système de fichiers logiciel mondial qui applique les normes de données convenues par la communauté et prend en charge le dépôt de données, la bio qualification et la validation d'environ 11 000 nouvelles entrées PDB chaque année (soumission wwpdb.org). Le RCSB PDB agit actuellement en tant que conservateur d'archives, assurant la reprise après sinistre des données PDB et coordonnant les mises à jour hebdomadaires. Les partenaires wwPDB publient les mêmes données d'archives à partir de plusieurs sites FTP, tout en exécutant des sites Web complémentaires qui fournissent des fichiers d'affichage de données PDB avec des informations spécifiques à valeur ajoutée et des liens vers des sources de données connexes.

À l'heure actuelle, PDB archive les données expérimentales, les métadonnées associées les modèles structurels 3D au niveau atomique dérivés de trois méthodes bien établies : la cristallographie, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et la microscopie électronique (3DEM). Les partenaires de wwPDB travaillent en étroite collaboration avec des experts dans des domaines expérimentaux connexes (dispersion aux petits angles, corrélation chimique/spectrométrie de masse, résonance Forester ou transfert d'énergie de frette, etc.) pour créer un consortium de ressources de données qui soutiendra l'archivage et la validation durables des modèles structurels 3D et des données expérimentales issues de méthodes intégratives ou hybrides [73].

The screenshot shows the RCSB PDB website interface. At the top, there is a navigation bar with options like Deposit, Search, Visualize, Analyze, Download, Learn, More, Documentation, and Careers. Below this, the PDB logo and tagline are displayed. A search bar is present with a 'PDB Archive' dropdown and a search icon. The main content area shows the entry for 6Y2E, titled 'Crystal structure of the free enzyme of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) main protease'. The interface includes tabs for Structure Summary, 3D View, Annotations, Experiment, Sequence, Genome, and Versions. A 3D model of the protein structure is shown on the left, and detailed entry information is on the right, including PDB DOI, Classification, Organism(s), Expression System, Mutation(s), Deposited/Released dates, and Author(s). There are also buttons for Display Files, Download Files, Experimental Data Snapshot, wwPDB Validation, 3D Report, and Full Report.

Figure 10: L'interface graphique du site web de la base de données PDB.

Dans notre étude, nous avons utilisé la Banque de données sur les protéines (BDP) pour télécharger les principaux fichiers de structure des protéines au moyen de codes de quatre lettres et les fichiers de structure sont affichés à l'aide du logiciel gratuit PyMOL.

2. Logiciel PyMOL

PyMOL est un logiciel de rendu de structure moléculaire 3D open source, créé par Warren Lyford Delano et développé en python, qui est multiplateforme. Ainsi, cela fonctionne sur Windows, Mac OS X, Linux et Unix. Il est principalement utilisé par les étudiants, les professeurs et les chercheurs en chimie et en biologie structurale. Ce logiciel est régulièrement utilisé pour produire des images structurales 3D de haute qualité de petites molécules ou de macromolécules biologiques (notamment des protéines). PyMOL est l'un des rares outils de visualisation open source utilisable dans le domaine de la biologie structurale [74].

PyMOL est un système créé par Warren Lyford Delano et initialement commercialisé par Delano Scientific LLC. À 2010, Schrodinger Inc. accord pour acquérir PyMOL. Depuis lors, Schrödinger a repris le développement et la

maintenance, ainsi que le support et la vente de PyMOL, y compris chaque abonnement en cours. PyMOL OpenGL Extension Wran utilise la bibliothèque gler (GLEW) et l'utilitaire gratuit OpenGL (Freeglut) Toolkit .PyMOL utilise une boîte à outils de widget multiplateforme (Tk) pour les éléments d'interface graphique. PyMOL peut produire des films et des images macromoléculaires de haute qualité dans diverses représentations, notamment des lueurs de côtes, des côtes, des animations, des points, des surfaces, des sphères sphériques, des bâtons et des lignes. De nos jours, PyMOL est l'un des outils de visualisation moléculaire les plus utilisés. Étant donné que PyMOL est écrit en Python, l'une des versions les plus populaires du langage de programmation, il peut facilement être étendu aux extensions Python [75].

Lorsque vous ouvrez PyMOL, deux fenêtres apparaissent (figure.11). La plus petite fenêtre (appelée "External GUI" dans la documentation PyMOL) contient une barre de menus (Fichier, Édition, Aide, Affichage, etc.), des boutons de raccourci pour les commandes courantes et une ligne de commande. La deuxième fenêtre est la visionneuse PyMOL, où toute la magie opère. Dans la visionneuse, les modèles 3D sont affichés et l'utilisateur interagit (comme la rotation) et manipule le modèle. Les objets affichés par PyMOL sont chargés sous forme 3D à partir de fichiers de coordonnées qui décrivent (en détail) les positions des atomes individuels dans la molécule. PyMOL peut afficher plus d'un objet à la fois et fournit un panneau de contrôle d'objet pour ajuster les modes d'affichage, les couleurs, les étiquettes, le masquage et tout ce qui concerne les objets (figure .12). Après chaque nom d'objet se trouve un ensemble de boutons de commande qui contrôlent l'objet. Voici les boutons et certaines de leurs options :

A - Actions : renommer, dupliquer, supprimer ou appliquer des préreglages (tels que "balle et bâton" ou "déployer"), et effectuer des calculs

S - Afficher : Modifiez l'apparence des choses, par exemple, passez à la vue bâton ou à la vue animation.

H - Masquer : les éléments affichés avec S s'empilent et ne remplacent pas automatiquement la dernière vue. H est l'opposé de S et masque les représentations indésirables.

L - Label : étiqueter les atomes, les résidus, etc.

C- Couleur : Change la couleur des atomes et des groupes.

Le coin inférieur droit de la visionneuse contient un guide pour l'utilisation de la souris, ainsi qu'un puissant outil de sélection. Il existe également une autre ligne de commande sous le visualiseur (PyMOL>) [76].

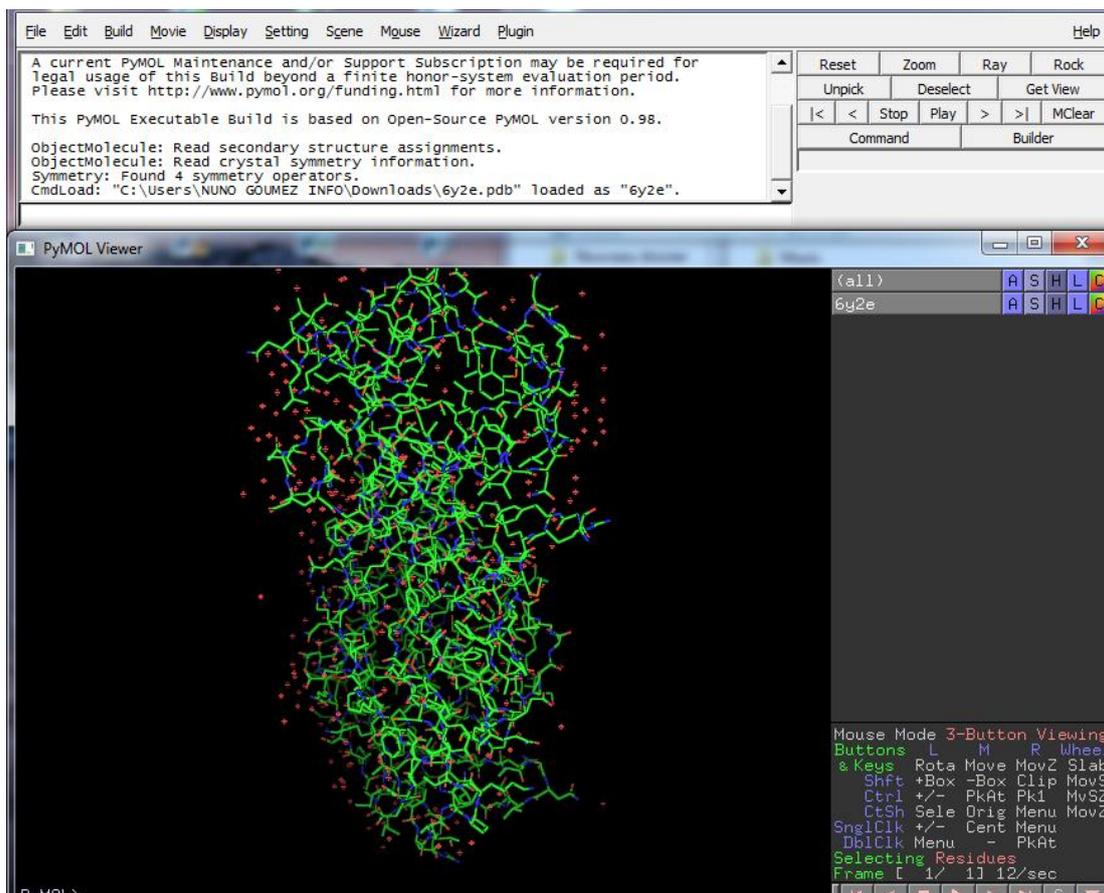


Figure 11: L'interface graphique du Logiciel PyMOL.

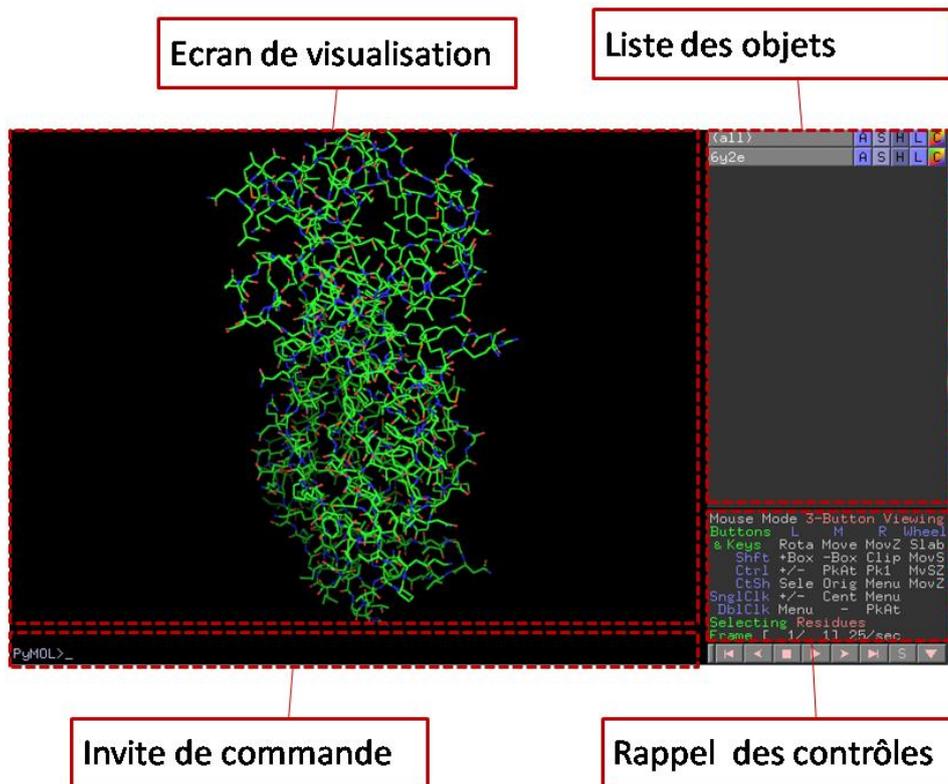


Figure 12 : La fenêtre de visualisation. [77]

Dans cette étude, nous avons utilisé le programme PyMOL pour afficher la structure tridimensionnelle de la protase principale (M^{pro}) et comprendre les mécanismes responsables de l'identification des protéines et de la liaison, qui est d'une grande importance pour la détection des inhibiteurs.

Chapitre 03

Protéase principale (M^{pro})

1. Structure

L'intervention dans la reproduction du virus est une stratégie de traitement alternative pour les vaccins. Dans ce contexte, la protéine de type chymotrypsine (souvent appelée la principale protéase, M^{pro} ci-après) est une excellente cible médicamenteuse [78].

1.1. Structure de l'enzyme protéase principale M^{pro} du SARS-CoV-2

La protéase principale (M^{pro}), également connue sous le nom de protéase de type chymotrypsine (3CLpro) [79] [80], est une protéase à cystéine homodimère [2] [81], dont la séquence est identique à 96 % au SARS-CoV-M^{pro} [2] [78] [82] [83] [84] (Fig.13), En revanche, l'identité de séquence avec le MERS-CoV M^{pro} n'est que d'environ 50 % [85], l'enzyme appartient à la famille des peptidases C30 de la tribu des peptidases PA [2].

SARS-CoV-2 M^{pro} est un dimère composé de 2 monomères approximativement orthogonaux l'un à l'autre [86]. Chaque sous-unité (également appelée protomère) [79] a une longueur de 306 résidus et se compose de trois domaines [2] [79] [87] qui sont conservés entre les CoVs [88]. Le domaine I est constitué des résidus 8-101 tandis que le domaine II est constitué de résidus 102-184. Les premier et deuxièmes domaines sont composés de structures β antiparallèle renfermant la cavité catalytique de l'enzyme. Le troisième domaine (III) est composé de résidus 201-303 et est principalement composé de cinq hélices α [87] [89] [90]. (Fig. 14) Il est attaché au domaine II via une longue région de boucle (résidus 185-200) [90] et est responsable de l'enzyme bipolaire [89] principalement via un pont salin de travail entre Glu290 d'un protom et Arg4 de l'autre [83].

M^{pro} contient un domaine C extra hélicoïdal et une chaîne N-terminale d'acides aminés appelée doigt N [82]. Dans la fente entre les premier et deuxième domaines, il y a un dimère catalysé par Cys-His, avec le N- résidus terminaux 1 à 7, ayant un rôle vital dans la formation du site de liaison au substrat [90].

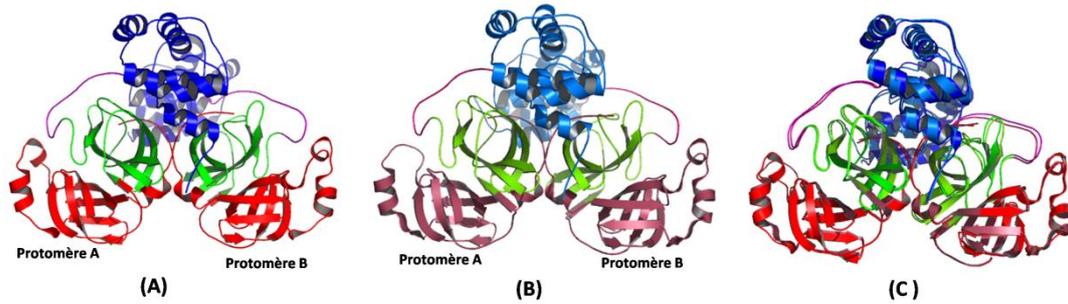


Figure 13: Structure du protéase principale (M^{pro}). **A)** structure des dimères du SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB: 6M03). **B)** structure des dimères du SARS-CoV M^{pro} (PDB: 2DUC). **C)** superposition de la structure tridimensionnelle de M^{pro} du SARS-CoV-2 et du SARS-CoV en dimères [91].

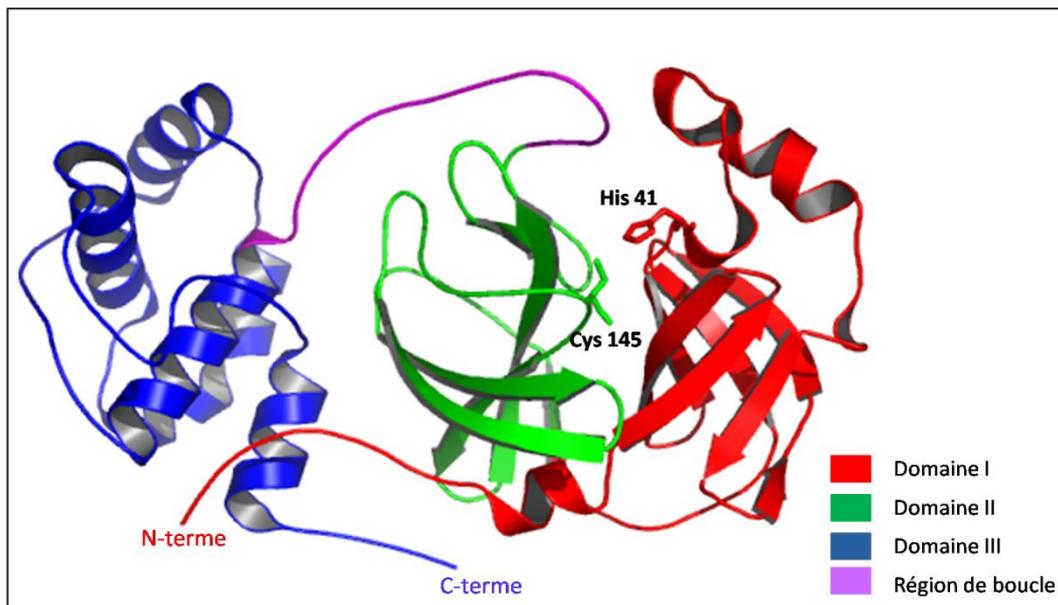


Figure 14: structure 3D du SARS-CoV-2 M^{pro} en monomère (PDB: 6M03). Les domaines I, II et III sont affichés en rouge, vert, et bleu, respectivement. La région de connexion entre II et III est en magenta et les résidus de dyades catalytiques (His41 et Cys145) sont des bâtons [91].

1.2. Site de la liaison au substrat

Le site de liaison est situé dans la fente entre les domaines I et II, les résidus Cys145 et His41 constituent le catalytique dans le site de liaison de la protéine [81] [88].

Le site de liaison au substrat est constituée de quatre sous-sites S'1, S1, S2 et S4 [79] [90] (Fig. 15), occupés respectivement par les fractions peptidiques P1, P2 P3 et P1' du substrat [79]. Le sous-site P1 est constitué des résidus Phe140, Asn142, Glu166, His163 et His172, ainsi que deux molécules d'eau conservée. Le sous site P2 est une poche profonde constituée de résidus His41, Met49, tyr54, Met165 et Asp187. Alors que P3 est défini par Glu166, Pro168 et Gly170, La protéolyse se produit via une dyade catalytique définie par Cys145 et His41 [2].

La dimérisation est nécessaire pour l'activité enzymatique car le doigt N des deux monomères interagit avec Glu166 de l'autre monomère (Fig.16), aidant ainsi la formation de la poche S1 du site de liaison au substrat. Les extrémités C et N des monomères constituent l'interface dimère et sont étroitement maintenues dans le dimère que dans l'état monomère où la mobilité de ces extrémités est plus élevée [86]. Pour atteindre ce site de réaction, le doigt N est pressé entre le deuxième et le troisième domaine du monomère et le deuxième domaine du l'autre monomère [83].

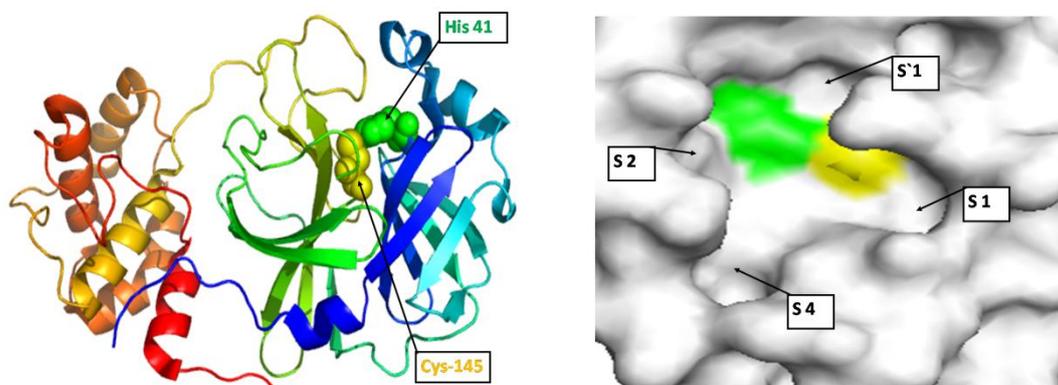


Figure 15: Structure cristallographique du SARS-CoV-2 M^{pro} libre résolue à une résolution de 1,75 Å (entrée PDB : 6Y2E) (à gauche) et vue de surface du substrat-fente de reliure (à droite). Les trois domaines distincts du protomère sont indiqués. Résidus His41 (vert) et Cys145 (jaune) de la dyade catalytique [90].

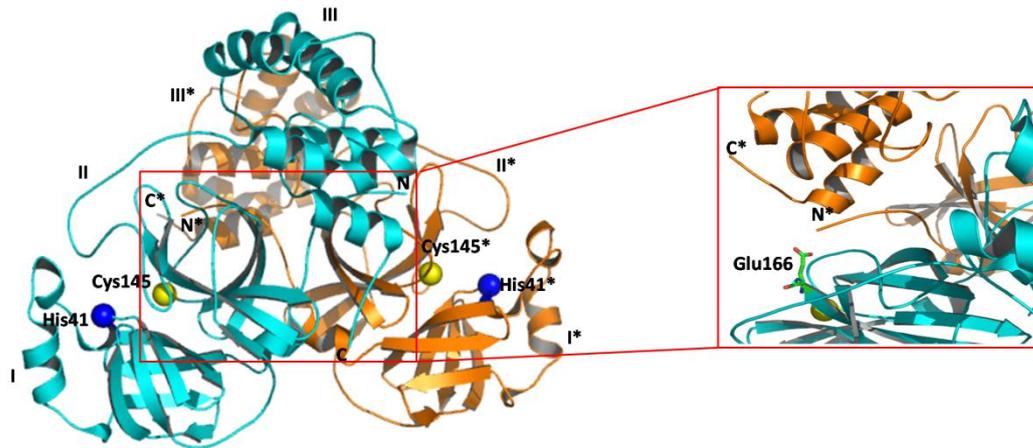


Figure 16: structure tridimensionnelle des cristaux de SARS-CoV-2 M^{pro} est montrée (PDB: 6Y2E). SARS-CoV-2 M^{pro} est un homodimère et les deux monomères du dimère sont montrés en bleu clair et orange. La forme agrandie représente l'interaction N doigt du monomère avec le Glu166 de l'autre monomère [86].

1.3. Spécificité du substrat

Selon la nomenclature donnée par Schechter et Berger, la M^{pro} reconnaît principalement les résidus de substrat allant de site P_4 au site P_1' (Fig.17). La reconnaissance du site prime au-delà de P_1' n'est pas conservée (Fig.18). La spécificité est souvent déterminée par les sites P_1 , P_2 et P_1' , qui présentent le plus haut degré de conservation parmi les sites de clivage.

La glutamine 166 dans P_1 est hautement conservée dans tous les sites de clivage polyprotéique du SARS-CoV, du MERS-CoV et du SARS-CoV-2. En site P_2 , plus d'acides aminés hydrophobes sont tolérés avec une nette préférence pour la leucine. Le site P_1' tolère de petits résidus tels que la sérine ou l'alanine. L'analyse de tous les sites de clivage de polyprotéines traités par M^{pro} pour le SARS-CoV, le MERS-CoV et le SARS-CoV-2 illustre des profils de reconnaissance de substrat très similaires parmi ces virus [85].

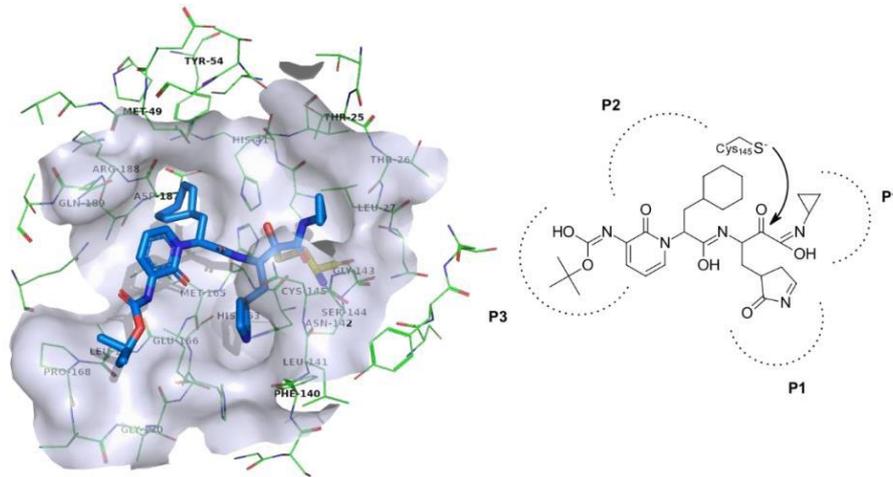


Figure 17: site actif de l'enzyme SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB: 6Y7M), avec représentation les différents sites P dans la cavité catalytique [2].

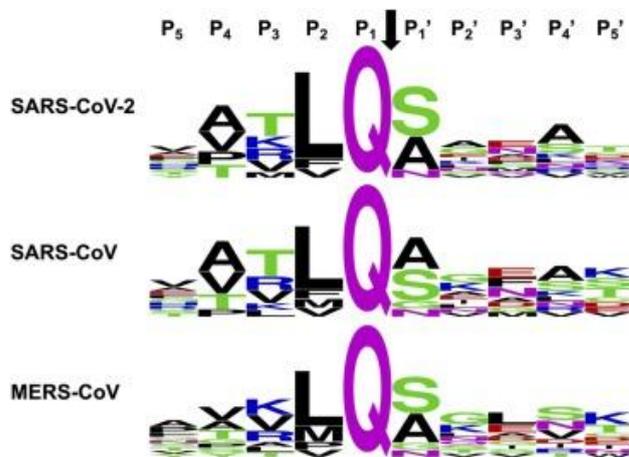


Figure 18: Sites de clivage des polyprotéines reconnus par M^{pro} du SARS-CoV-2, SARS-CoV et MERS-CoV. Les séquences peptidiques couvrent les résidus P5 à P5' selon la nomenclature de Schechter et Berger [85].

1.4. Comparaison structurale de la protéase principale de SARS-CoV-2 et SARS-CoV

La superposition structurale de la protéase M^{pro} du SARS-CoV-2 et du SARS-CoV montre un écart quadratique moyen (RMSD) de 0,517 Å indiquant que la structure de la protéine est hautement conservée [92] car le SARS-CoV-2 M^{pro} partage une identité de séquence de 96 % avec M^{pro} du SARS-CoV [78] (Fig. 19).

Les auteurs ont résolu la structure cristallographique de M^{pro} pour le SARS-CoV-2 avec une résolution de 1,75 Å avec seulement une différence de 0,53Å de

RMSD entre les deux enzymes libres. Le SARS-CoV-2 M^{pro} forme un dimère serré et a une interface de contact principalement entre le deuxième domaine de la sous unité A et les résidus NH₂-terminaux de la sous unité B, où cette dimérisation est important pour l'activité catalytique [93]. Contrairement au SARS-CoV-2, la protéase principale de SARS-CoV possède une interaction polaire entre les trois domaines qui comprend une liaison hydrogène de 2,60 Å entre la chaîne latérale et les groupes hydroxyle du Thr285 de chaque protomère et prend également en charge une interaction hydrophobe entre la chaîne latérale Ile286 et thr285. Dans le SARS CoV-2 M^{pro}, la thréonine a été remplacée par l'alanine et l'isoleucine par la leucine [8] [83] [93].

Le SARS-CoV-2 M^{pro} est particulièrement diversifié pour avoir un résidu catalytique Cys non conventionnel. Contrairement à d'autres enzymes de type chymotrypsine et à plusieurs hydrolases Ser (ou Cys), il a une dyade catalytique Cys-His au lieu d'une triade canonique Ser(Cys)-His-Asp(Glu). Les résidus catalytiques Cys145 et His41 dans la SARS-CoV-2 M^{pro} sont enfouis dans une cavité de site actif située à la surface de la protéine [89].

12 résidus sur 306 sont différents entre le SARS-CoV-2 M^{pro} et SARS-CoV M^{pro} (Fig. 20). De plus, aucune des 12 résidus variantes (T35V, A46S, S65N, L86V, R88K, S94A, H134F, K180N, L202V, A267S, T285A, I286L) ne participe à des rôles majeurs dans l'activité enzymatique du SARS-CoV-2 M^{pro}. La structure globale du SARS CoV-2-M^{pro} n'a pas été affectée par ces mutations, et la structure entière a été superposée à celle du SARS-CoV-2 M^{pro}. Les modèles d'homologie du SARS CoV-2 M^{pro} se sont avérés très similaire à celui du SARS-CoV-M^{pro} et donc les inhibiteurs qui ciblent le SARS-CoV M^{pro} peuvent également inhiber l'activité enzymatique du SARS CoV-2-M^{pro} [86].

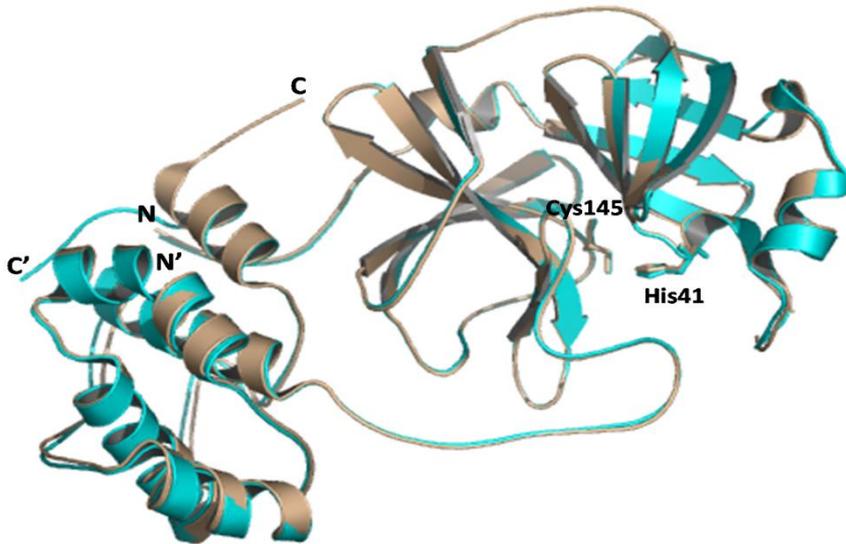


Figure 19: Superposition de structures cristallographiques aux rayons X de Protéase majeure du SARS-CoV-2 (tan, PDB: 6Y2F), et SARS-CoV (cyan, PDB: 3TNT). Seuls les monomères sont représentés. Le résidu de la dyade catalytique (His41/ Cys145) pour le SARS-CoV et le SARS-CoV-2. Structures avec une valeur R.M.S.D de 0.517 Å [92].



Figure 20: Séquence d'acides aminés des M^{pro} du SARS-CoV et du SARS-CoV-2 [92].

2. Fonction

La protéase majeure (M^{pro}) du SARS-CoV-2 est à la base de la maturation virale et constitue une cible médicamenteuse prometteuse car elle diffère des protéases humaines [85] en raison de la conservation élevée entre les différentes souches de coronavirus et du manque d'analogues fonctionnels dans le protéome humain [94].

La fonction de cette protéase est de cliver les polyprotéines produites dans les cellules infectées par le virus pendant la phase de réplication virale. Cette enzyme peut couper à l'intérieur des chaînes peptidiques (et pas seulement couper les résidus terminaux), c'est donc une endopeptidase (ou protéinase). C'est aussi une cystéine protéase [95]. Mais, peu de choses sont connues sur les aspects structurels de son association avec les 11 sites de clivage naturels [96].

- La séquence et la structure de la protéase principale sont étroitement liées à d'autres bêta-coronavirus, ce qui facilite les tentatives de découverte de médicaments basés sur des composés majeurs antérieurs [85].
- 1^{ère} étape clé de la maturation Le SARS-CoV-2, un virus à ARN simple brin sens positif, est l'hydrolyse de ses polyprotéines **pp1a** et **pp1ab**. La majorité de ces Les événements de clivage - sur 11 sites - sont effectués par la principale protéase du SARS-CoV-2 (M^{pro} ; également connue sous le nom de protéase de type chymotrypsine ou 3CL, protéase de type 3C, 3CLpro ; ou protéine non structurale 5, Nsp5) [96].
- Les résultats des tests de spectrométrie de masse (MS) non dénaturants indiquent que les monomères M^{pro} sont non seulement inactifs (sauf avec les substrats de test), mais ne lient pas non plus les fragments de substrat 11-mères à haute affinité.
- SARS-CoV-2 M^{pro} et SARS-CoV M^{pro} ont des spécificités de substrat similaires et reconnaissent tous les deux la séquence universelle [P4 : Small] [P3:X] [P2: Leu/Phe/Val/Met][P1:Gln] ↓ [P1' :Gly / Ala/Ser/Asn], où "Small" désigne un petit résidu comme (Ala, Val, Pro ou Thr), "X" désigne n'importe quel résidu, et "↓" désigne un amide clivable.(Fig.21)

- Ces positions dans le substrat sont appelées P4-P1' et sont reconnues par les sous-sites S4-S1' correspondants sur SARS-CoV-2 M^{pro}. En partie parce que ces séquences ne sont pas connues pour être reconnues par les protéases humaines, M^{pro} est une cible médicamenteuse attrayante [96].

- **Utilisation de SARS-CoV-2 M^{pro} comme cible thérapeutique :**

Les enzymes M^{pro} agissent comme catalyseurs pour plusieurs événements de traitement protéolytique qui facilitent la réplication des coronavirus dans les cellules hôtes. Étant donné que la cystéine (C145) entraîne l'activité catalytique de M^{pro}, le ligand covalent à base de pyrazoline réactif à la cystéine semble naturellement attrayant pour le développement d'inhibiteurs de M^{pro} qui peuvent interagir de manière irréversible avec le M^{pro} C145. Dans l'ensemble, l'inhibition de M^{pro} avec un antiviral pourrait empêcher efficacement la réplication des coronavirus, offrant un bénéfice thérapeutique [97].

Le M^{pro} est essentiel à la réplication du coronavirus et il ne se produit pas naturellement dans les cellules humaines non infectées, de sorte que les inhibiteurs de cette protéase sont des candidats très intéressants contre l'infection par des coronavirus pathogènes, par exemple le SARS-CoV ou le SARS-CoV-2 [98].

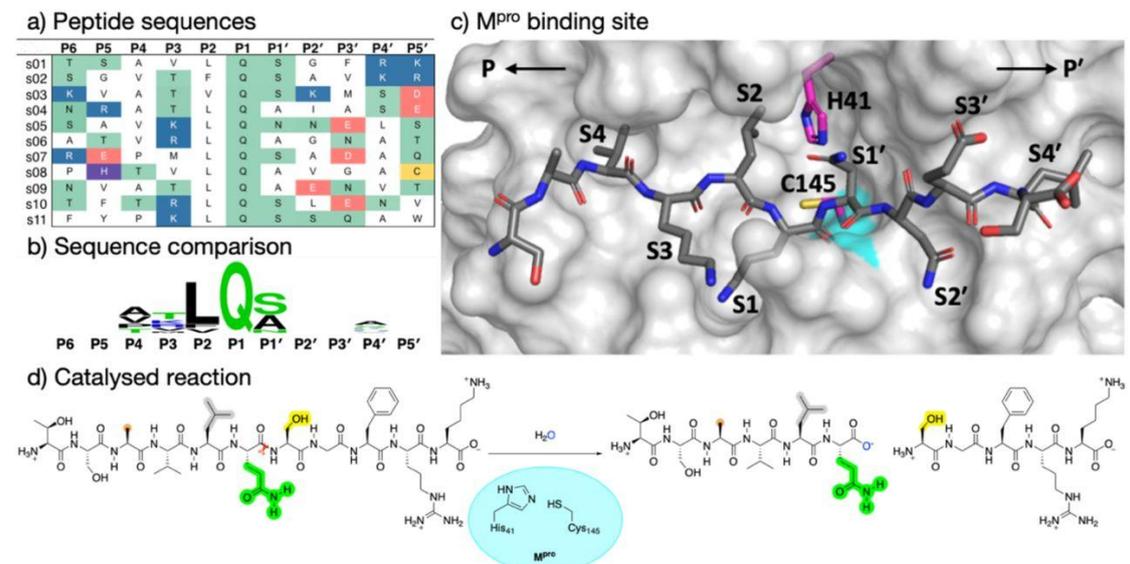


Figure 21 : Substrats traités par SARS-CoV-2 M^{pro}. a) Les 11 sites de clivage SARS-CoV-2 M^{pro} et les peptides fragmentés correspondants à 11 résidus, s01-s11, avec résidus chargés positivement/négativement en bleu/rouge, respectivement ; l'histidine

est en violet ; les résidus avec des chaînes latérales polaires sont en vert ; et la cystéine est en jaune. **b)** Comparaison entre les 11 séquences de substrat (générées par WebLogo) mettant en évidence le Gln conservé en P1 et le Leu prédominant en P2. **c)** Vue d'un modèle à énergie minimisée, construit à l'aide d'apo M^{pro} (PDB : 6yb7, surface gris clair), de M^{pro} complexé avec s05 (bâtonnets gris foncé) ; les sous-sites S4-S4' sont étiquetés. Le trou oxyanion formé par le squelette M^{pro} NHs du Gly-143, Ser-144 et Cys-145 sont en cyan. **d)** La réaction catalysée par M^{pro} illustrée par s01. Les résidus de substrat importants pour la reconnaissance (voir le texte principal) sont mis en évidence [96].

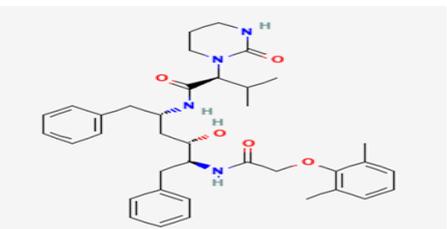
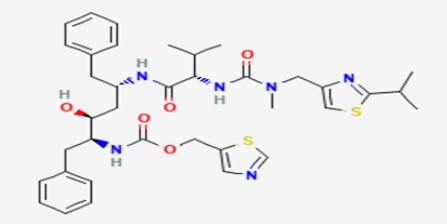
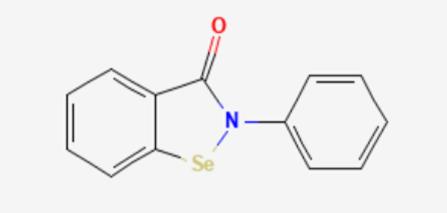
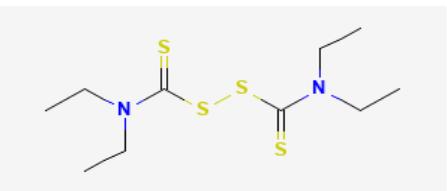
Chapitre 04

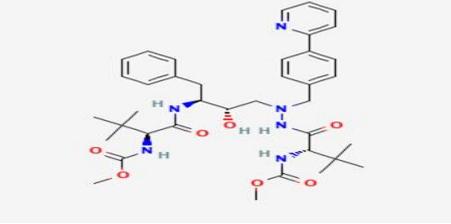
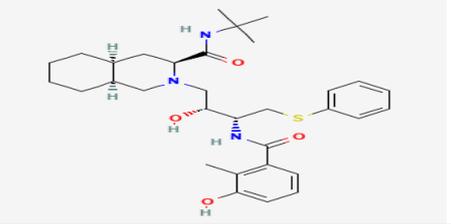
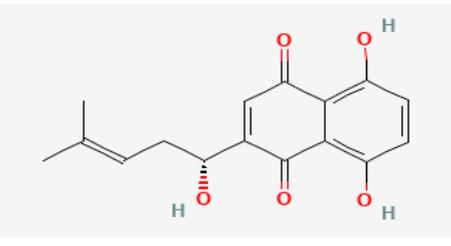
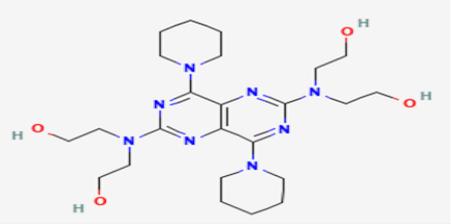
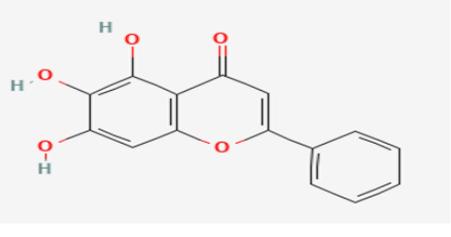
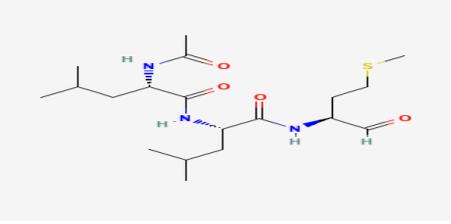
Inhibiteur de protéase principale (M^{pro})

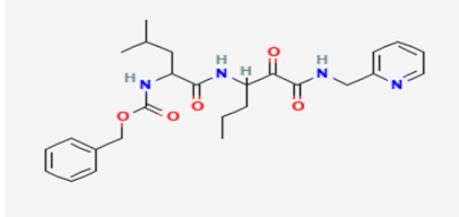
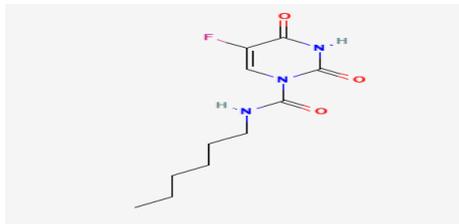
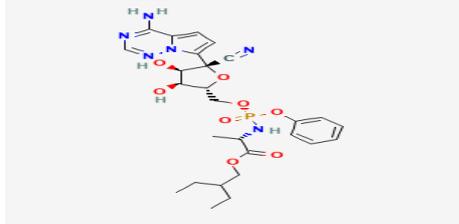
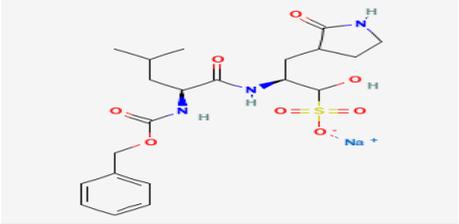
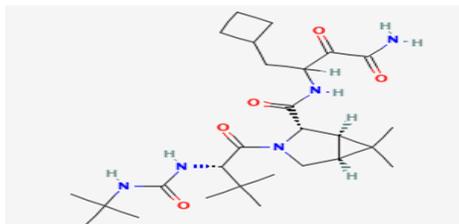
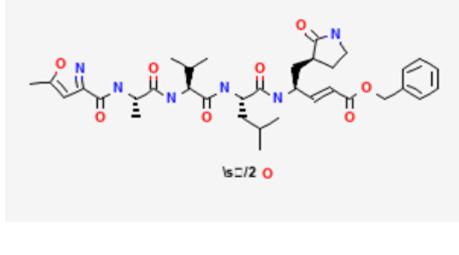
Méthode découverte inhibiteur M^{pro}

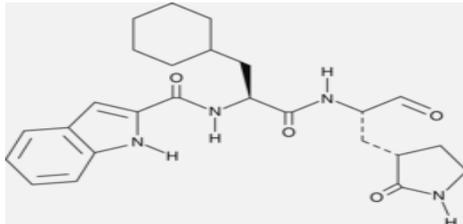
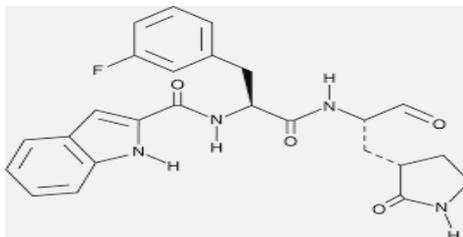
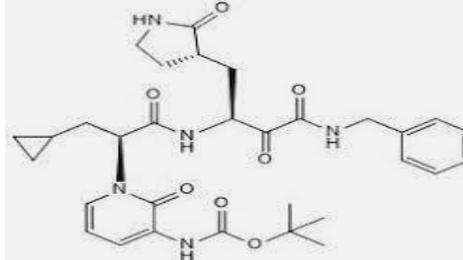
En interférant avec la maturation des NSPs, plusieurs médicaments candidats qui inhibent l'activité de M^{pro} ont été découverts par examen pharmacologique, tels que l'Ebselen, le disulfirame, le Carmofur, les α -cétoamides et aldéhydes qui imitent le peptide 11a/11b (tableau1). Tous ces composés peuvent être divisés en deux classes, les médicaments de classe I initialement conçus pour d'autres maladies ont été redirigés, les autres étant des médicaments conçus principalement sur la base de la caractérisation de la structure de protéine cible [88].

Tableau 1: Activité antivirale des hits nouvellement découverts contre le SARS-CoV-2.

Structure chimique (99)	Code PDB	Inhibition du SARS-CoV-2 M ^{pro} (μ M)	Activité antivirale SARS-CoV-2 M ^{pro} (μ M)
Lopinavir 	N.D	IC ₅₀ =486 (8)	EC ₅₀ =6.73 (8)
Ritonavir 	N.D	IC ₅₀ =13.7 (8)	EC ₅₀ =8.63 (8)
Ebselen 	7BAK (110)	IC ₅₀ =0.67 (88)	EC ₅₀ =4.67 (88)
Disulfiram 	N.D	IC ₅₀ =9.35 (88)	

<p>Atazanavir</p> 	N.D	IC ₅₀ =102 (8)	EC ₅₀ =2.0 (8)
<p>Nelfinavir</p> 	N.D	IC ₅₀ =234 (8)	EC ₅₀ =1.13 (8)
<p>Shikonin</p> 	7CA8 (110)	IC ₅₀ =1.57 (107)	EC ₅₀ =15.75 (122)
<p>Dipyridamole</p> 	N.D	n.d (8)	EC ₅₀ =0.1 (8)
<p>Baicalein</p> 	N.D	IC ₅₀ =0.94 (88)	EC ₅₀ =1.69 (88)
<p>Calpain inhibiteur II</p> 	6XA4 (110)	IC ₅₀ =0.97 (88)	EC ₅₀ =0.49 (88)

<p>Calpain inhibiteur XII</p> 	<p>6XBH (110)</p>	<p>$IC_{50}=0.45$ (88)</p>	<p>$EC_{50}=3.37$ (88)</p>
<p>Carmofur</p> 	<p>7BUY (110)</p>	<p>$IC_{50}=1.82$ (88)</p>	<p>$EC_{50}=24.87$ (88)</p>
<p>Remdesivir</p> 	<p>N.D</p>	<p>n.d (8)</p>	<p>$EC_{50}=0.77$ (8)</p>
<p>GC-376</p> 	<p>6WTT (90)</p>	<p>$IC_{50}=0.03$ (88)</p>	<p>$EC_{50}=2.07$ (88)</p>
<p>Boceprevir</p> 	<p>7K40 (90)</p>	<p>$IC_{50}=4.13$ (88)</p>	<p>$EC_{50}=1.9$ (88)</p>
<p>N3</p> 	<p>6LU7 (88)</p>	<p>$K_{obs}/(I)=11.300 M^{-1} S^{-1}$ (88)</p>	<p>$EC_{50}=16.77$ (88)</p>

11a 	6LZE (90)	$IC_{50}=0.05$ (88)	$EC_{50}=0.53$ (88)
11b 	6M0K (90)	$IC_{50}=0.04$ (88)	$EC_{50}=0.72$ (88)
13b 	6Y2F (8)	$IC_{50}=0.67$ (88)	$EC_{50}=4-5$ (88)

N.D., non disponible .n.d. = non détecté.

1. Réutilisation des médicaments

Le développement d'un nouveau médicament sélectif et sûr pour traiter le COVID-19 est certainement l'option la plus cohérente pour lutter contre la nouvelle épidémie. Cependant, il s'agit d'une approche à long terme qui n'est pas adaptée à la situation d'urgence actuelle. Par conséquent, l'utilisation de médicaments antiviraux déjà disponibles était la décision la plus rationnelle de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) au début de 2020 en tant que première ligne d'intervention pour faire face à l'épidémie imminente [8].

1.1. Lopinavir / Ritonavir

Sont les médicaments utilisés dans les essais cliniques pour le traitement du COVID-19 ciblant M^{pro} [88], ce sont des inhibiteurs du VIH [8] [88] [100] [101], qui est codé par le gène pol du VIH et clive les précurseurs polypeptidiques du VIH [88].

Bien que le Ritonavir soit lui-même un inhibiteur de la protéase, il est utilisé avec le Lopinavir car il est un inhibiteur du cytochrome P450 3A4 qui augmente ainsi significativement la concentration plasmatique des autres médicaments anti-VIH [8].

Tests cliniques avec l'association Lopinavir-Ritonavir ont montré un risque réduit d'infection par le SARS. La thérapie Ritonavir-Lopinavir a également été bénéfique dans le traitement du MERS-CoV [102], puisque M^{pro} est hautement conservé entre le SARS-CoV et le SARS-CoV-2 [88]. Cependant, un essai clinique randomisé de la thérapie combinée Lopinavir-Ritonavir impliquant des patients adultes hospitalisés confirmés infectés par le SARS-CoV-2 n'a montré aucun avantage au-delà des soins standard [102] [103] [104].

1.2. Ebselen

Est un composé organosélénium [8] [88], a été étudié pour le traitement de diverses affections, telles que le trouble bipolaire, la perte auditive [88] et les accidents vasculaires cérébraux [105], et son innocuité chez l'homme a été signalée dans beaucoup Évalué dans des essais cliniques [88].

Ebselen peut agir comme glutathion peroxydase et imiter la peroxydoxine. Il a été démontré qu'il forme des liaisons siléno-sulfure avec les groupes thiol de la cystéine (Cys) sur de nombreuses protéines, entraînant des effets anti- inflammatoires, antibactériens et antineurogènes [105] [106].

Ebselen a un fort effet inhibiteur sur l'activité M^{pro} du SARS-CoV-2 avec une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de 0,67 µM et une concentration effective médiane (EC₅₀) de 4,67 µM (tableau1) [88], respectivement. Des simulations de dynamique moléculaire ont montré qu'Ebselen était capable de se lier aux deux sites. L'un est Cys145 présent dans la cavité catalytique via une liaison siléno-sulfure, tandis que l'autre est présent dans la région de dimérisation [105].

Fait intéressant, la structure cristalline des complexes formés entre l'Ebselen et son analogue MR6-31-2 avec le SARS-CoV-2 M^{pro} a résolu (PDB 7BAK et 7BAL). Ils ont montré que l'atome de sélénium est lié à l'atome de soufre de Cys145 mais sans la charpente organique de l'Ebselen (Fig. 22) [107].

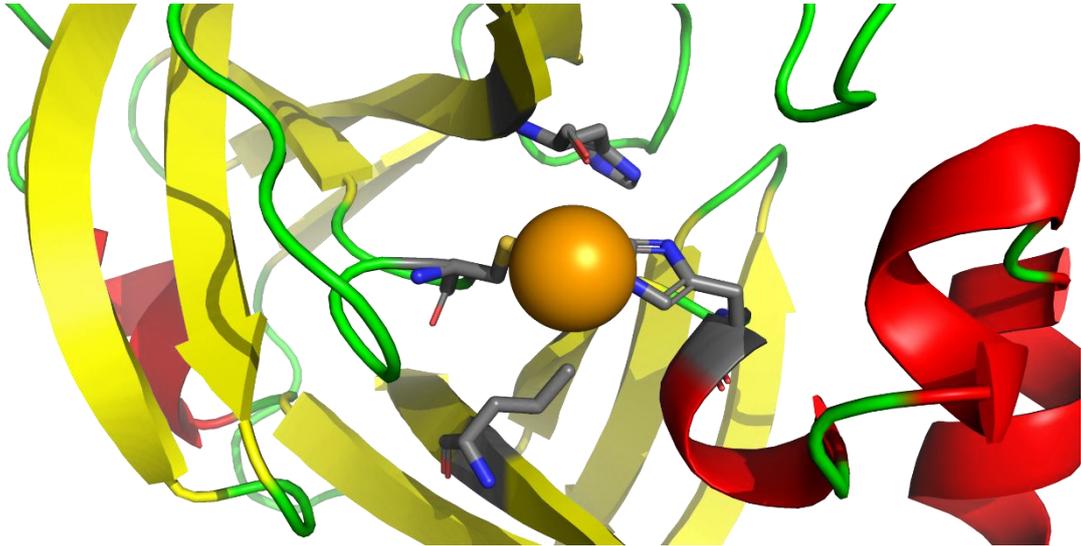


Figure 22:Détail de la structure cristalline du complexe sélénium-M^{pro} (code pdb 7BAL) [107].

1.3. Disulfirame

Le disulfirame a été signalé comme un inhibiteur putatif dans une étude informatique récente [109]. Le disulfirame est un médicament approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour le traitement de la dépendance à l'alcool [88] [110] [111]. Il a également été vérifié comme médicament réutilisable pour le traitement de la gale au cours des dernières années [88].

La recherche sur les nouveaux médicaments a montré que le disulfirame peut inhiber efficacement M^{pro} [112], avec une IC₅₀ de 9,35 µM. (tableau1) [88] [110] car il a un effet antiviral synergique contre le SARS-CoV-2 [110]. En échangeant la réaction d'un disulfure de thiol avec les résidus du site actif principal Cys145 [109].

En fonction de sa structure moléculaire [113]. Les modes de transmission représentatifs sont représentés sur la figure (23A), en dehors de la liaison disulfure covalente. Le disulfirame peut également former une liaison hydrogène avec His163 dans la poche de liaison de M^{pro} Ensuite, nous explorons la possibilité d'une autre cystéine dans M^{pro} qui pourrait également être oxydée par des médicaments disulfure et pourrait conduire à une modification allostérique négative de la fonction protéase dans M^{pro}. En fait, il existe de nombreux sites Web qui peuvent bien absorber les médicaments. Un profil représentatif de la liaison du disulfirame à Cys128 est représenté sur la figure (23B). Une forte interaction a été observée avec Lys5, et cette interaction a été encore stabilisée par Glu290, directement ou indirectement [111].

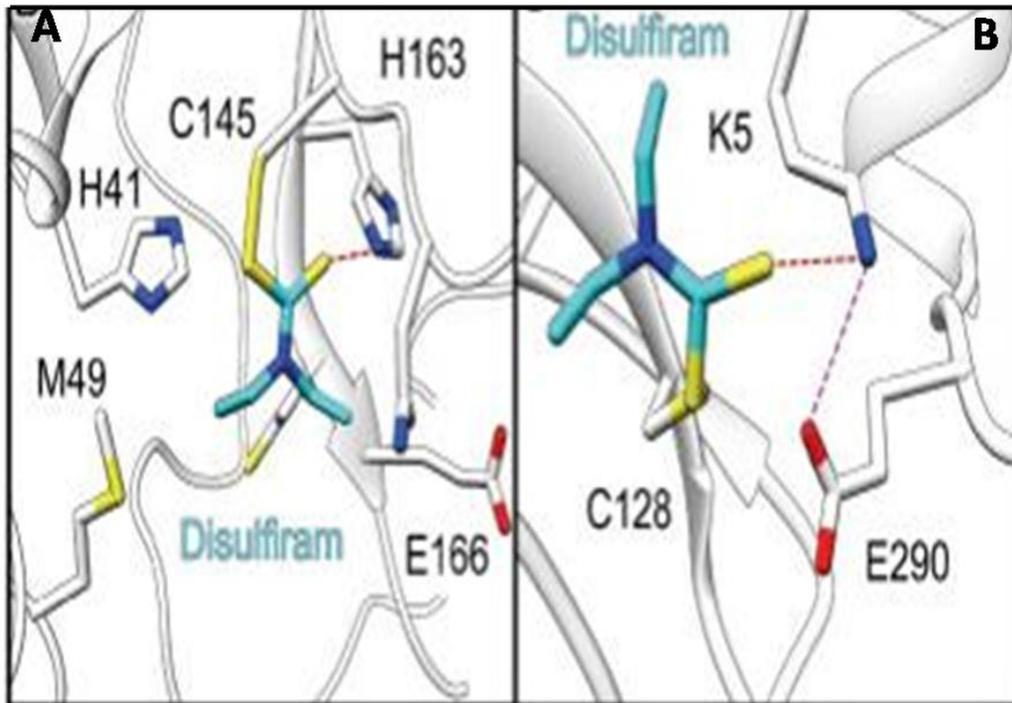


Figure 23 : Détails de la structure cristalline du complexe formé entre le disulfirame et le SARS-CoV-2 M^{pro}. **A**, pose d'amarrage covalent du disulfirame dans le site actif de M^{pro}. **B**, poses d'amarrage covalentes du disulfirame à Cys128 de M^{pro} [111].

1.4. Atazanavir

L'Atazanavir, un inhibiteur de la protéase du VIH [114] [115], a été proposé comme nouveau médicament anti-COVID-19 en raison de sa grande puissance [8]. Cible la protéase majeure (M^{pro}) [116] et inhibe la réplication du SARS-CoV-2 seul ou en association avec le Ritonavir [8] [114] [117] ($EC_{50} = 2,0$ et $0,5 \mu\text{M}$, respectivement). Atazanavir La combinaison de Ritonavir s'est avérée très efficace pour inhiber la réplication virale dans les cellules Vero E6, encore mieux que la chloroquine $EC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$ [8].

Les interactions entre l'Atazanavir et les protéases cibles comprennent la liaison hydrogène des résidus d'acides aminés Lys5, Lys137, Glu290 et Glu288 [118].

1.5. Nelfinavir

Le Nelfinavir est un médicament antirétroviral efficace [8] [119], utilisé dans le traitement du VIH [8] [119] [120] [121]. Il existe plusieurs études in vitro montrant l'efficacité de ce médicament pour réduire la récurrence du SARS-CoV-2 [8] dans le site actif de M^{pro}, indiquant sa capacité à inhiber les protéases virales [90].

Lorsque le Nelfinavir a été testé contre des cellules Vero E6 infectées par le SARS-CoV-2, le test a montré une EC_{50} de 1,13 μM , de meilleurs résultats par rapport au Lopinavir ($EC_{50} = 5,73 \mu\text{M}$) (tableau1) [8]. Alors que le Nelfinavir se lie à M^{pro} via une liaison hydrogène avec Glu166 et avec His41 et tyr54 as-site S2 [90].

1.6. Shikonine

La Shikonine est une naphthoquinone naturelle [122] principalement utilisée dans le traitement de l'hépatite fibreuse aiguë ou non filamenteuse et de l'hépatite chronique [123] Il a été récemment rapporté que la Shikonine inhibe la réplication du SARS-CoV-2 in vitro ($EC_{50} = 15,75 \mu\text{M}$ (tableau 1). Li et ses collègues sont les premiers à établir la structure cristalline du SARS-CoV-2 M^{pro} en complexe avec la Shikonine [122] [124] (PDB:7CA8) [107], à une résolution de 2,45Å° [122] [124].

L'analyse de la poche de liaison à la Shikonine a révélé trois nouvelles interactions [122]:

Premièrement, la Shikonine forme une liaison hydrogène de réseau avec les protéases polaires tripartites Cys145 et His164 situées dans le sous-site S1.

Deuxièmement, les groupes de tête aromatiques de la Shikonine ont formé une interaction p-p avec His41 au niveau du sous-site S2.

Troisièmement, les groupes hydroxy et méthyle de la chaîne latérale isothexényle de la queue de la Shikonine forment la liaison H avec Arg188 et Gln189 sur le sous-site S3, respectivement [125] [126] (fig.24).

Cependant, l'inhibition de M^{pro} par la Shikonine a été abolie en présence de DTT, indiquant que ce composé est un inhibiteur mixte [107] [122] [124].

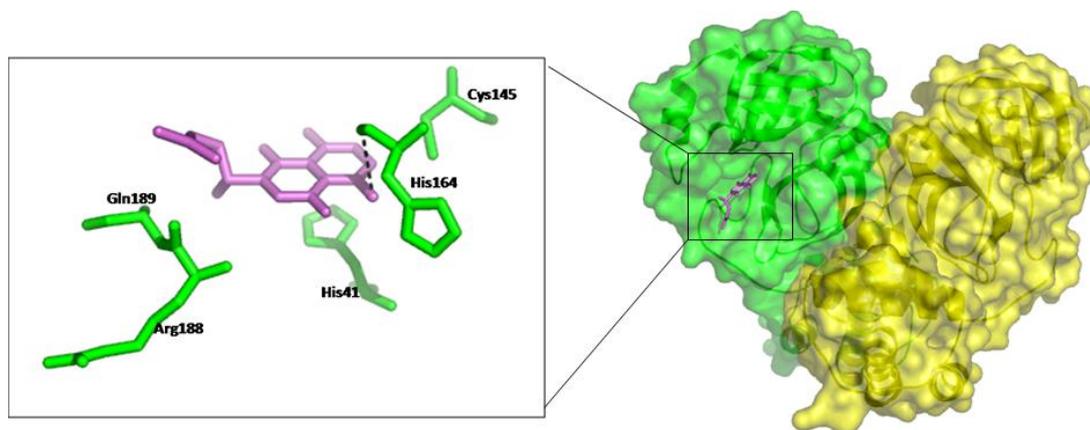


Figure 24 : Détails de la structure cristalline du complexe formé entre la Shikonine et le SARS-CoV-2 M^{pro} [107] [125].

1.7. Dipyridamole

Le Dipyridamole est un inhibiteur de la phosphodiesterase-2 qui inhibe le métabolisme et l'absorption de l'adénosine par les érythrocytes et les cellules endothéliales vasculaires [127]. Il s'agit d'un vasodilatateur coronaire qui a été utilisé en clinique comme médicament anti-COVID-19 [8] [128]. Son mécanisme d'action comprend l'inhibition de SARS-CoV-2 M^{pro} [8]. Un test cellulaire viral in vitro a montré que le Dipyridamole avait une valeur EC₅₀ faible (0,1 µM) (tableau 1) par rapport au SARS-CoV-2 [8] [128].

L'analyse d'amarrage a suggéré que le Dipyridamole forme des interactions hydrophobes et hydrophiles avec M^{pro} et interagit avec Asn142 Leu141 par liaison hydrogène [127]. Cependant, les études informatiques n'ont pas montré une bonne interaction entre M^{pro} et le Dipyridamole (-5,4 kcal/mol), ce qui conduit à traduire le résultat en un faux négatif [8].

1.8. Baicalein

Les produits naturels Baicalein et Baicalein dérivés de la médecine traditionnelle chinoise ont été signalés comme de nouveaux inhibiteurs du SARS-CoV-2 M^{pro} [90]. Sont fréquemment utilisés pour la prévention et le traitement de l'hépatite et des troubles respiratoires [88]. Les deux produits ont montré une inhibition significative contre M^{pro} avec IC₅₀ de 6,41 et 0,94 µM, (tableau 1) respectivement [88] [90].

Le concepteur a démontré la structure M^{pro} dans un complexe avec un nouveau modèle d'inhibition non covalente de la Baicalein (Fig.25) Un cycle phényle avec trois groupes hydroxyle de la Baicalein a formé des interactions π -S et π - π avec le catalyseur dyade C145 et H41, tandis que les autres groupes hydroxyle formaient des liaisons hydrogène avec les résidus Multiple au sous-site S1. L'anneau de vinyle gratuit occupait le sous-site S2. La molécule de Baicalein a agi comme un revêtement sur le site catalytique pour l'empêcher de pénétrer dans le substrat peptidique [88].

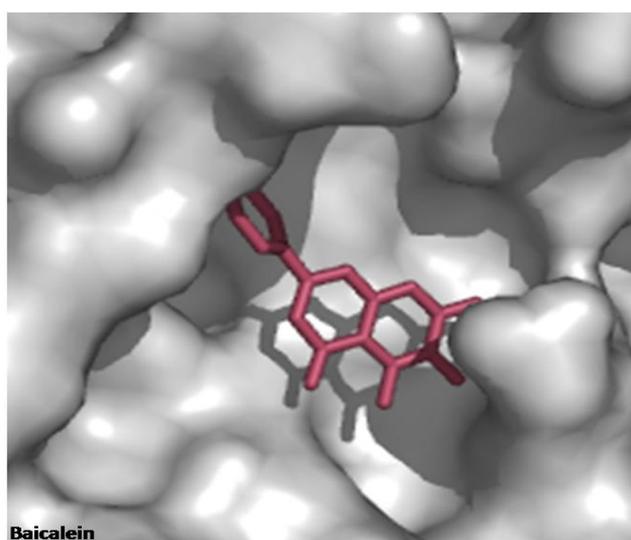


Figure 25: Pose de la liaison d'un inhibiteur de Baicalein dans un complexe avec SARS-CoV-2 M^{pro} . Des contre-indications et des cofacteurs apparaissent dans le stick (Entrée PDB : 6M2N) [88].

1.9. Carmofur

Ce dérivé de 5-fluorouracile (5-FU), qui porte une chaîne 1-hexylcarbamoyl, inhibe le SARS-CoV-2 M^{pro} avec une IC_{50} de 1,82 μ M. une enzyme clé impliquée dans les processus de réplication cellulaire [8]. Il a été démontré que le Carmofur, un médicament antinéoplasique, inhibe la principale protéase du SARS-CoV-2 (M^{pro}). et identifié le Carmofur comme un composé pouvant inhiber M^{pro} in vitro, avec une concentration de capacité inhibitrice semi-maximale (IC_{50}) de 1,82 μ M (tableau 1) [129].

On pense que le Carmofur cible la thymidylate synthase 12, 13, mais il a également été démontré qu'il inhibe la céramidase acide (AC) en modifiant de

manière covalente sa catacystéine lytique [129]. X du complexe M^{pro}/Carmofur montre que le réactif Carmofur du groupe carbonyle est lié de manière covalente à l'atome S_γ de Cys145 [130], tandis que sa queue d'acide gras occupe le sous-site S2 hydrophobe. Le Carmofur inhibe la réplication virale dans (EC₅₀= 24.30 μM) les auteurs ont suggéré que le groupe sulfhydryle de Cys145 attaque le groupe carbonyle électrophile du Carmofur, entraînant une modification covalente de Cys145 et la libération du fragment 5-FU [130]. Le Carmofur inhibe la céramidase acide humaine en modifiant de manière covalente le résidu catalytique C143 [131], en acylant son résidu catalytique cystéine. De plus, le Carmofur s'est avéré efficace dans un test antiviral cellulaire avec une EC₅₀ de 24,87 μM (tableau 1), acylant le groupe thiol et libérant du 5-FU (PDB 7buy). L'oxygène carbonyle interagit avec Gly143 et Cys145 par des liaisons H, et l'adduit formé imite l'état de transition du complexe enzyme-substrat (Fig.26 A) [8].

1.10. PX-12

Px-12 est une petite molécule inhibitrice irréversible de la protéine redox thiorédoxine [132]. Tideglusib est un inhibiteur irréversible de la glycogène synthase kinase-3β (GSK-3β) [131]. La thiorédoxine est une protéine qui, lorsqu'elle est produite en excès, transforme les cellules normales en cellules cancéreuses en inhibant l'apoptose et en assurant la survie [132]. PX-12s est un puissant inhibiteur de SARS-CoV-2 M^{pro} et modifie le site actif du Cys-résidu 145 de M^{pro} par le sélénosulfure/disulfure [133]. Les inhibiteurs N3 et PX-12 sont les seuls inhibiteurs avec plusieurs acides aminés à l'intérieur de leur distance de liaison hydrogène [132].

1.11. Danoprevir

Une étude récemment publiée suggère que le Danoprevir est un nouveau médicament anti-COVID-19 potentiel [8]. Il s'agit d'un inhibiteur de protéase disponible dans le commerce pour le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C [8]. IC₅₀ pour la protéase du VHC est de 0,29 nM et a été approuvé pour la commercialisation en Chine en 2018 en tant qu'antiviral direct oral pour le traitement de l'hépatite C [134].

Sur la base de la similitude structurelle de la protéase du VHC avec le SARS-CoV-2 M^{pro} [8], ou cette étude portant sur 11 patients adultes chinois a montré que la combinaison Danoprevir/Ritonavir réduisait les symptômes d'infection et accéléraila

guérison du COVID-19 [8]. L'analyse d'amarrage moléculaire a montré que le danoprévir avait la meilleure énergie de liaison pour inhiber la protéase majeure SARS-CoV-2 (9,3 kcal/mol) [134]. Co-renforcé avec le Ritonavir, l'activatrice pharmacocinétique du danoprévir [136].

Le danoprévir s'est avéré cliniquement sûr et bien toléré chez des milliers de patients infectés par le VHC en Chine [134]. Ont rapporté que le danoprévir boosté par le Ritonavir inhibait la réplication virale et réduisait efficacement les GGO et les zones ressemblant à des patchs en moins d'une semaine [134]. Le danoprévir/Ritonavir peut efficacement inhiber la réplication du virus et améliorer l'état de santé des patients [135].

1.12. Remdesivir

Ce composé est un promédicament analogue à l'adénosine qui inhibe les ARN polymérases virales après activation métabolique [136]. Il était à l'origine utilisé pour le traitement du virus Ebola, et il a été prouvé qu'il était actif contre d'autres souches virales, en particulier les rétrovirus [8]. Cette molécule inhibe puissamment la réplication de tous les types de coronavirus in vitro [8], Le Remdesivir a été le premier médicament antiviral à être recommandé pour approbation dans l'Union européenne (UE) et aux États-Unis pour le traitement du COVID-19, 48, 49 a reçu l'approbation finale et a été récemment examinée par les autorités réglementaires de l'UE [136]. Elle a été approuvée ou autorisée pour une utilisation temporaire comme traitement COVID-19 dans environ 50 pays dans le monde [8].

Le mécanisme d'action du Remdesivir implique sa conversion en un actif métabolite (GS-441524 ; analogue structural de l'adénosine) qui bloque la réplication virale en inhibant l'ARN-polymérase virale-dépendante de l'ARN, agissant probablement comme un terminateur de chaîne ou provoquant des mutations dans le génome du virus. Le Remdesivir in vitro inhibe la réplication du SARS-CoV-2 avec une CE_{50} de 0,77 μ M et un $CC_{50} > 100$ dans les cellules Vero E6 ($SI = 129,87$), et s'est avéré efficace chez quelques patients gravement malades. Des études informatiques ont souligné comment le Remdesivir et son métabolite peuvent former efficacement des complexes avec le SARS-CoV-2 M^{pro} montrant des scores d'affinité de -7,0 et -6,4 kcal/mol [8], Le Remdesivir a démontré une activité inhibitrice in vitro dans les cellules épithéliales primaires des voies respiratoires humaines et les cellules pulmonaires humaines Calu-3 avec une concentration efficace demi-maximale de 9,9

nM et 280 nM, respectivement. Des effets thérapeutiques *in vivo* ont également été démontrés chez des singes rhésus, montrant une diminution significative des signes cliniques de maladie respiratoire, de pathologie pulmonaire, de lésions macroscopiques et de charge d'ARN par rapport aux animaux témoins. Des données cliniques préliminaires récentes ont montré une diminution significative de la charge virale du SARS-CoV-2 chez les patients COVID-19 recevant du Remdesivir au jour 5, et une augmentation significative des valeurs Ct de gRNA (génomique) et sgRNA (subgénomique) au jour 2 et 5. Cet antiviral a été formulé pour une administration intraveineuse (IV) après une extraction extensive de premier passage. Le Remdesivir intraveineux a une biodisponibilité de 100 % et culmine après 30 min. Il présente une liaison modérée aux protéines plasmatiques et est principalement métabolisé par la carboxylestérase 1, suivie par la cathepsine A et le cytochrome P450 (CYP) 3A. Il est éliminé par l'urine (74%) et les fèces (18%). Plusieurs études ont évalué l'efficacité du Remdesivir dans le traitement des patients COVID-19. Ce travail passe en revue les principaux résultats des essais cliniques et des études observationnelles du Remdesivir chez des patients atteints de COVID-19 [136].

1.13. Boceprevir

Le Boceprevir est un médicament approuvé par la FDA pour le virus de l'hépatite (VHC) [88]. Il a été démontré qu'il inhibe l'activité enzymatique de M^{pro} avec une valeur IC₅₀ de 4,13 µM et une valeur EC₅₀ de 1,90 µM contre le virus SARS-CoV-2 M^{pro} (tableau 1) [106].

L'amarrage moléculaire (PDB: 7K40) a révélé que le Boceprevir formait des liaisons hydrogène avec différents résidus et des interactions hydrophobes avec les principaux résidus His41, Leu141, Met165, Glu166 et Asp187 en formant un lieu unique sur le site actif (fig.26 B) [90].

Le groupe nucléophile C145 de M^{pro} forme une liaison covalente C-S avec le carbone céto du Boceprevir, et le groupe hydroxyle résultant forme une liaison H avec la chaîne latérale de H41 et cette conformation est stable (Fig. 27) [106].

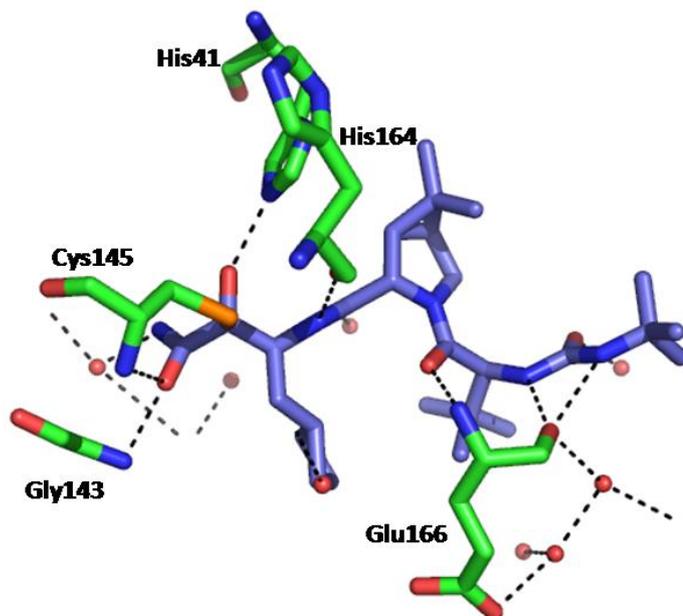


Figure 27: Vue rapprochée des interactions entre SARS-CoV-2 M^{pro} et Boceprevir. (PDB : 7C6S). Les résidus impliqués dans la réaction sont représentés sous forme de bâtonnets. Les inhibiteurs sont représentés en violet des bâtons. Les liaisons hydrogène ont été marquées par des lignes pointillées [106].

1.14. GC-376

Le GC-376 est un médicament vétérinaire expérimental [88] qui est un composé disulfate qui agit comme un promédicament pour la forme aldéhyde active [107] qui inhibe fortement la M^{pro} de plusieurs coronavirus, dont le SARS-CoV-2 [106].

La structure cristalline du SARS-CoV-2 M^{pro} en complexe avec GC-376 (PDB:6WTT) a montré que l'ogive bisulfate d'aldéhyde forme une liaison covalente avec les résidus de cystéine du colorant catalytique (Fig.26 C). Le cycle γ -lactame dans P1, le fragment isobutyle dans P2 et l'ester phénylméthyle dans P4 montrent une intégration parfaite avec les sous-sites, S1, S2 et S4 respectivement [88].

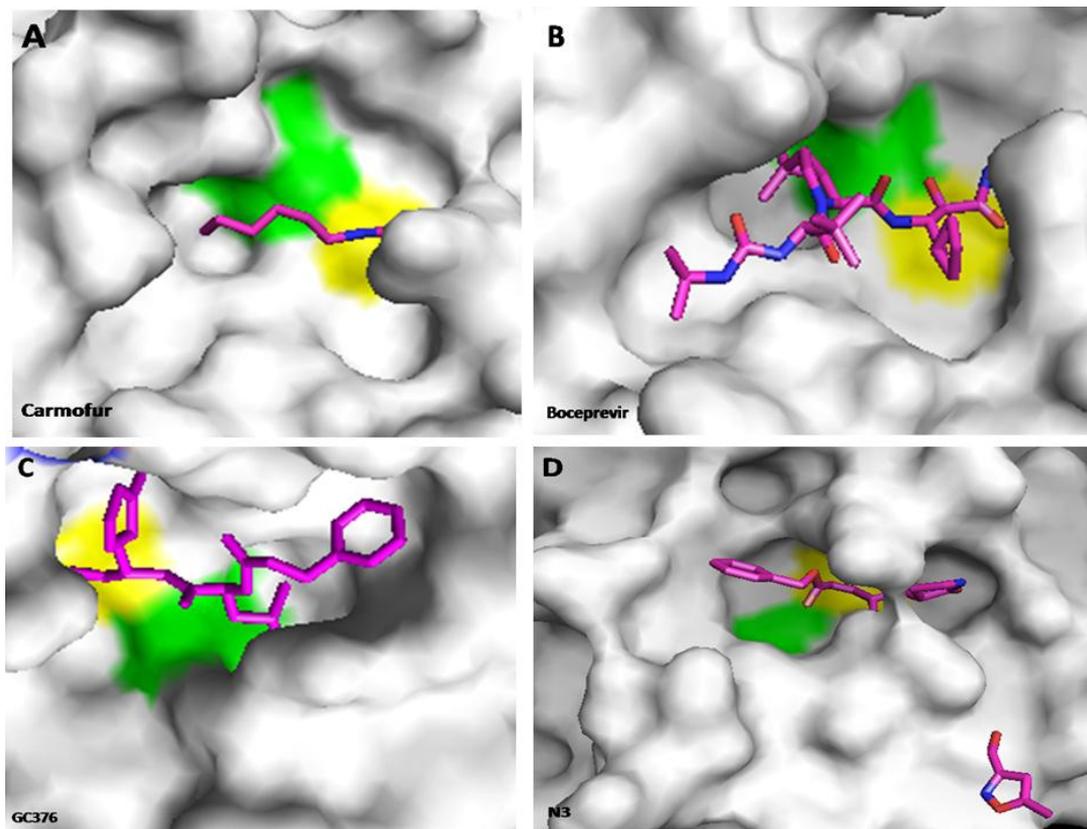


Figure 26 : Modes de liaison des inhibiteurs nouvellement identifiés en complexe avec SARS-CoV-2 M^{pro}. L'inhibiteur et les cofacteurs apparaissent dans le stick : Carmofur : (entrée PDB: 7BUY).Boceprevir (entrée PDB: 7K40). GC-376 (entrée PDB: 6WTT). N3 (entrée PDB : 6LU7).Résidus dans la dyade catalytique : His41 est surligné en vert et Cys145 est surligné en jaune [90].

1.15. Chloroquine / Hydroxychloroquine

Bien qu'il n'y ait aucune preuve de l'efficacité de la chloroquine et de l'hydroxychloroquine, ces deux agents antipaludiques ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement du coronavirus d'urgence [137] et des études de simulation et de dynamique d'amarrage ont également indiqué que les deux agents affecter d'autres cibles virales, et a donc été suggéré pour traiter le COVID-19 [8].

La chloroquine et l'hydroxychloroquine sont les plus efficaces pour contrôler l'infection par le SARS-CoV-2 [138] avec des EC₅₀ antiviraux de 5,47 et 0,72 μM, respectivement [112].

La chloroquine provoque certains effets secondaires chez les patients atteints de porphyrie cutanée aiguë ou retardée, tels que fièvre, élévation des aminotransférases sériques et même ictère. L'hydroxychloroquine est moins toxique que la chloroquine, ne provoque pas ces effets secondaires indésirables et s'est avérée avoir des effets bénéfiques partiels dans la porphyrie, cependant, il a été démontré que la chloroquine a une affinité et une capacité inhibitrice plus fortes pour 3CL M^{pro} que l'hydroxychloroquine.

Bien que la chloroquine et l'hydroxychloroquine partagent un produit chimique similaire, la petite différence rend les cinq premiers résidus avec les contributions de liaison dominantes de l'hydroxychloroquine (Cys145, Met165, Asn142, Gly143 et Ser144) assez différents de ceux de la chloroquine (Met165, Gln189, Met49, Asp187, Arg188) [138].

1.16. Calpain inhibiteur II et XII

Les inhibiteurs de la Calpain II et de la Calpain XII sont des inhibiteurs de la cathepsine L humaine, dans laquelle la cathepsine L joue un rôle important dans l'entrée virale du SARS-CoV-2 en clivant la protéine virale de pointe S dans l'endosome ou le lysosome [139].

Il a été rapporté que les inhibiteurs de la Calpain II et XII ont un double mécanisme d'action : inhibition de M^{pro} et inhibition de la protéase hôte cathepsine L. [140], ils sont considérés comme les inhibiteurs de M^{pro} les plus puissants avec des valeurs IC₅₀ = 0,97 et 0,45 µM, respectivement [88] [141]. Test d'activité antivirale in vitro, ces médicaments ont montré une forte inhibition de la réplication virale du SARS-CoV-2 en culture cellulaire avec des valeurs de EC₅₀ allant de 0,49 à 3,37 µM (Tableau 1) [88].

Les structures cristallines du SARS-CoV-2 M^{pro} en complexe avec les inhibiteurs de la Calpain II (PDB : 6XA4) et XII (PDB : 6XFN) ont révélé que l'inhibiteur II occupe le trou d'axe formé par les groupes amides squelettiques de Gly143, Ser144 et Cys145 (Fig. 23 A). Contrairement Au locus inhibiteur de la Calpain II, l'inhibiteur de la Calpain XII présente un mode de liaison atypique car il prend la forme d'une demi-hélice inversée qui s'enroule autour du noyau catalytique [142] (Fig.28 B).

Les structures co-cristallines des inhibiteurs de Calpain II et XII avec le SARS-CoV-2 M^{pro} ont montré une liaison hydrogène critique entre la chaîne latérale

méthionine de l'inhibiteur de Calpain II et la substitution pyridinyle de l'inhibiteur de Calpain XII par la chaîne latérale d'imidazole His163 présente dans le S1 poche [143].

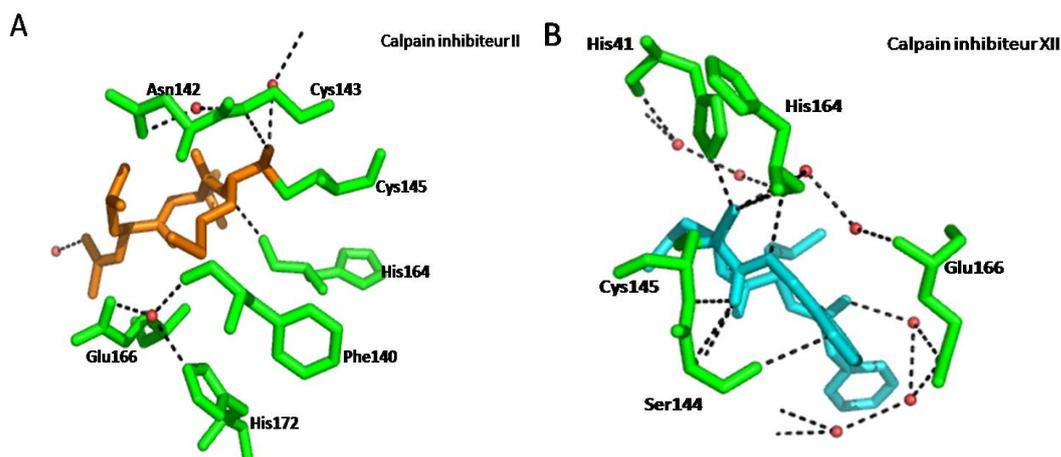


Figure 28: Structures cristallines aux rayons X du SARS-CoV-2 M^{pro} en complexe avec les inhibiteurs de Calpain II (PDB : 6XA4) et XII (PDB : 6XFN). Les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes pointillées noir. SARS-CoV-2 M^{pro} en complexe avec (A) inhibiteur de Calpain II (orange) et (B) inhibiteur de Calpain XII (cyan) [142].

2. Inhibiteurs peptidomimétiques

Les imitateurs de peptides sont des dispositifs synthétiques utilisés pour imiter la structure naturelle d'un peptide ou d'une protéine et interagir avec une cible biologique de la même manière que le substrat d'origine.

En fait, bon nombre des inhibiteurs du SARS-CoV-M^{pro} développés au cours de la dernière décennie sont des imitateurs de peptides. Ensuite, proposer à nouveau comme inhibiteurs du SARS-CoV-2 M^{pro} était une stratégie logique, également du point de vue de la similitude susmentionnée entre les deux cibles [8].

2.1. Esters vinyliques (N3)

Dans cette classe de dérivés, Jin.Z et al ont identifié un composé nommé N3, qui est un pseudo-térapeptide, modifié en P1 avec du benzyle α , β -insaturé [8].

La première structure cristallisée de la protéine SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB : 6LU7), qui a été libérée le 5 février 2020, cristallisée avec un inhibiteur covalent N3, a été largement utilisée [144]. N3 est un inhibiteur irréversible de l'accepteur de Michael [145], qui a été conçu à l'origine pour traiter les maladies infectieuses

causées par d'autres CoV [88]. Les inhibiteurs accepteurs de Michael forment des liaisons covalentes avec la protéine cible par l'interaction de Michael, en tant qu'inhibiteur peptidique [145].

La densité électronique montre que l'atome S γ du C145 du protomère A forme une liaison covalente ($A^\circ 1.8$) avec l'atome C β du groupement phényle, confirmant l'apparition de l'addition de Michael [146]. Un groupement phényle est utilisé pour inhiber le processus catalytique via la liaison covalente cystéine du di-catalyseur. De plus, il comprend un cycle A-lactame, un groupe isobutyle aliphatique et un groupe méthyle tels que les chaînes latérales P1, P2 et P4, respectivement, qui s'intègrent parfaitement dans les sous-sites S1, S2 et S4.

Sans surprise, N3 s'est également avéré présenter une forte inhibition du SARS-CoV-2-M^{pro}, en déterminant la structure cristalline du SARS-CoV-2-M^{pro} en complexe avec N3 [88] (fig29 .PDB: 6LU7).

Le cycle lactame des inhibiteurs intrinsèques au site S1 est constitué de chaînes latérales des résidus Phe140, Asp142, Glu166, His163 et His172 du protomère A de la structure, qui comprend également deux molécules d'eau ordonnées. Au site S2, le groupe isobutyle de Leu était flanqué des résidus His41, Met49, Tyr54, Met165 et Asp187. Au site S3, le groupe isopropyle de Val était exposé à un solvant et l'alanine était présente du côté S4 flanqué par les résidus Met165, Leu167, Phe185, Gln192 et Gln189 (Fig. 29) [107].

De plus, N3 forme de multiples liaisons hydrogène avec la chaîne principale de résidus dans la poche de liaison au substrat, qui aide à verrouiller l'inhibiteur dans la poche Liaison au substrat [146] [88] (fig.26 D) N3 a affiché une inhibition contre le SARS-CoV-2 avec une valeur EC₅₀ de 16,77 μ M (Tableau 1) [106].

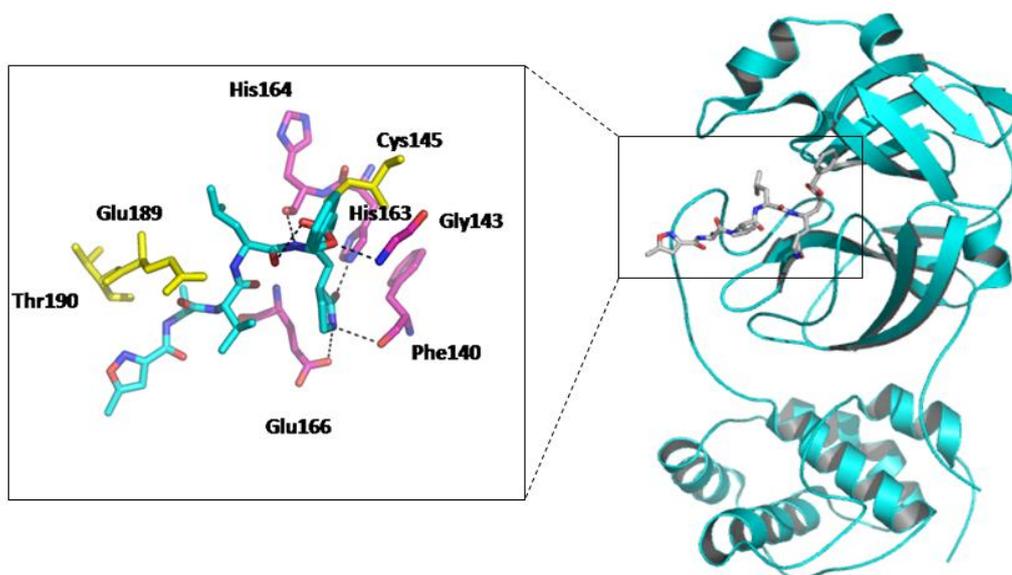


Figure 29: Structure aux rayons X du complexe entre N3 et SRAS-CoV-2 M^{Pro} [107] [145].

2.2. Aldehyde

Les aldéhydes mimétiques de peptides ont été introduits comme candidats pour les médicaments antiviraux dans le cadre de la conception de médicaments basés sur la structure [88], où Dai et al ont conçu deux médicaments (11a et 11b) contre le SARS-CoV-2 M^{Pro} [90], qui utilisent des peptides imitant aldéhydes comme charpente et diffèrent par leur groupe P2. Les deux composés ont montré une bonne activité inhibitrice contre le SARS-CoV-2 M^{Pro} avec une valeur IC₅₀ de 0,05 et 0,04 μM, respectivement. Il a également montré une forte efficacité anti-SARS-CoV-2 dans les cellules Vero E6 avec une valeur EC₅₀ de 0,53 et 0,72 μM, respectivement. (Tableau 1) [88].

La structure cristalline du SARS-CoV-2 avec 11a et 11b montre que le carbone du groupe aldéhyde et le site catalytique C145 du SARS-CoV-2 M^{Pro} forment une liaison covalente standard (C-S 1.8Å°) (PDB : 6LZE, PDB : 6M0K) [8] [106] (Fig.30 A, B). La figure 11b montre une liaison inhibitrice similaire avec 11a, avec une légère différence peut-être due au groupe 3-fluorophényle de 11b dans P2 [90] (Fig.30 C).

L'atome d'oxygène du groupe aldéhyde joue également un rôle important dans la stabilité conformationnelle de l'inhibiteur en formant une liaison H avec le squelette du résidu C145 au site S1. Le groupe amide sur le cycle lactame forme des liaisons H avec F140 et His163. Le fragment silcohexyle 11a dans P2 est inséré profondément dans S2 et s'accumule avec le cycle imidazole de H41. Le groupe fluoro-3-fluorophényle 11b est fixé par la liaison H à Gln189 [106].

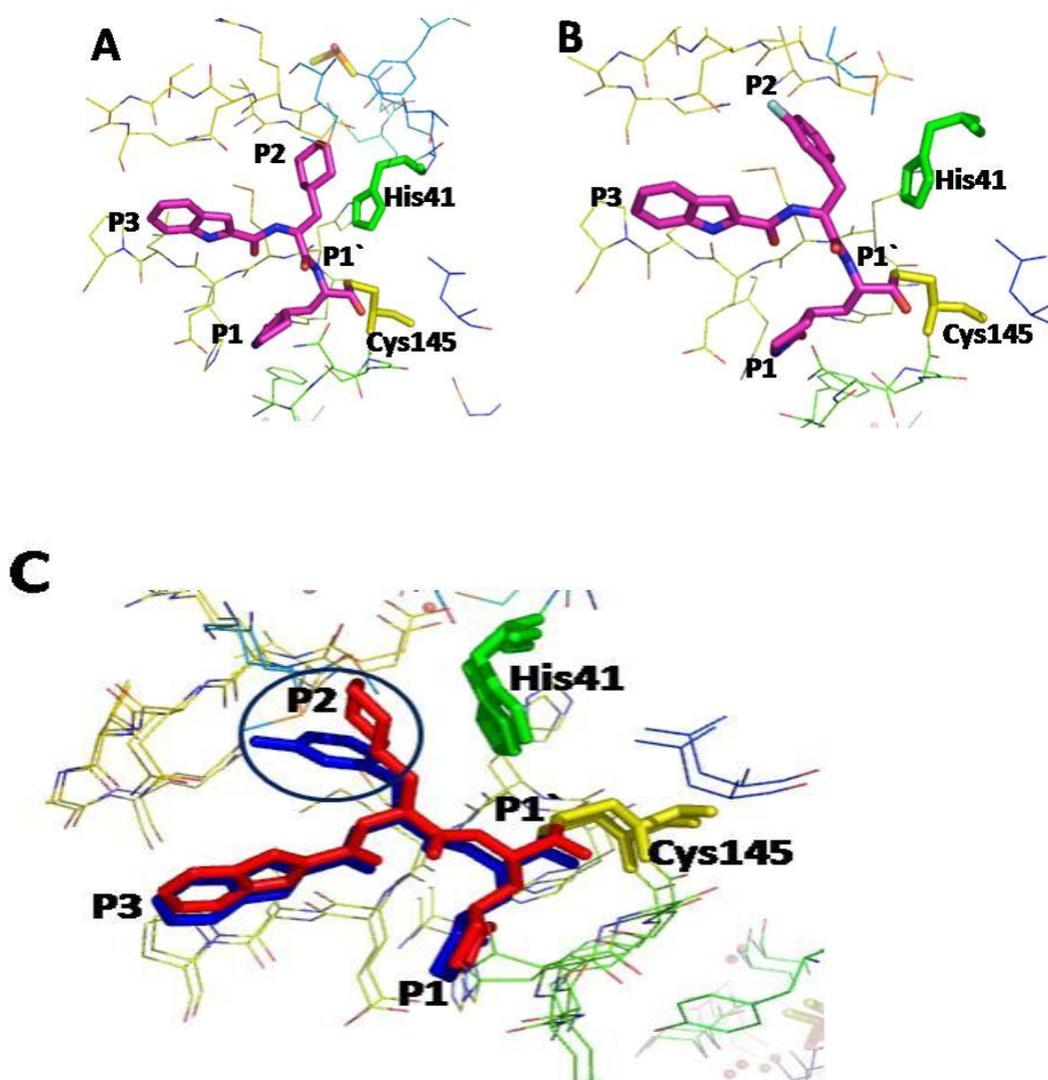


Figure 30: Interaction de 11a, 11b (entrée PDB : 6LZE, entrée PDB : 6m0k) avec SARS-CoV-2 M^{pro}. (A) Interaction de 11a et (B) 11b avec des résidus à les sous-sites de la fente de liaison au substrat. (C) Comparaison de la différence des modes de liaison de 11a (rouge) et 11b (bleu) [90].

2.3. α -cétoamide

Les α -cétoamides sont des inhibiteurs M^{pro} à large spectre des bêta-coronavirus et des alpha-coronavirus, ainsi que des protéases d'entérovirus 3C, qui ont été pré-conçus selon une approche basée sur la structure [88]. Un avantage de l' α -cétoamide est que ses ogives peuvent interagir avec le centre catalytique de la protéase cible par le biais de deux réactions de renforcement, plutôt qu'une seule [83].

Le groupe α -céto est utilisé pour inhiber de manière covalente l'attaque nucléophile du résidu catalysé par la cystéine sur le substrat. De plus, ces inhibiteurs sont équipés d'un groupe γ -lactame et d'un groupe hydrophobe respectivement en P1 et P2 pour occuper des sous-sites distincts S1 et S2 et renforcer leur activité inhibitrice.

Auparavant, le 11r était identifié comme le meilleur inhibiteur parmi eux contre les CoV. Plus récemment, Zhang et al ont proposé un nouvel inhibiteur par modifications de 11r appelé 13b avec un effet inhibiteur renforcé : la liaison amide de P2-P3 a été incorporée dans l'anneau péripéritonéal. Ce composé a présenté une inhibition du SARS-CoV-2 M^{pro} avec IC₅₀ = 0,67 μ M et la réplication de l'ARN viral avec EC₅₀ = 4-5 μ M. (tableau 1) [88].

La structure cristalline de 13b liée à SARS-CoV-2 M^{pro}, a montré comment l'inhibition se produit par la formation d'une interaction covalente entre Cys145 et le groupe α -céto de l'inhibiteur (Fig.31 PDB : 6y2f) [8].

L' α -cétoamide forme des interactions avec les résidus H41, Gly143, Ser144, Cys145, 163, His164, Glu166, Pro168 et Gln 189 des principales protéases [147].

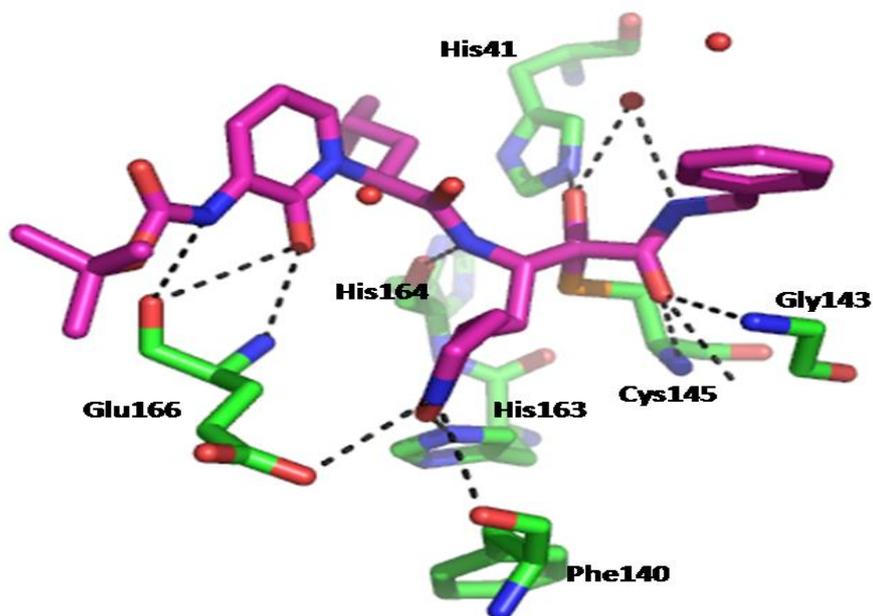


Figure 31: Composé 13b dans la liaison au substrat fente située entre domaines I et II de la M^{pro} dans la monoclinique forme cristalline [83] [8].

2.4. Peptidyl fluorométhyl cétones (pFMKs)

Les pFMKs sont des inhibiteurs de caspases bien connus dans la recherche biomédicale [148]. Ces types de composés peuvent être utilisés comme substrats pour une variété de cibles biologiques [149]. Ils sont capables d'inhiber les cystéines protéases virales et parasitaires, y compris M^{pro} du coronavirus [8]. Où il agit comme une ogive pour interagir avec le site actif de la Cystéine pour 3CL^{pro} [150].

La présence d'atomes de fluor à la position C-terminale du fragment méthylcétone augmente la susceptibilité du groupe carbonyle à subir une attaque lipophile nucléophile par le groupe thiol des protéases. Sur la base du nombre d'atomes de fluor dans cette position, nous pouvons distinguer trois classes différentes de composés, à savoir les monofluorométhylcétones (MFMK), les difluorométhylcétones (DFMK) et les trifluorométhylcétones (TFMK). Récemment, Zhu.W et al ont identifié MFMK (Fig. 32), un inhibiteur irréversible (translocation SN2 de l'atome de fluor) de la caspase-3 comme un puissant inhibiteur du SARS-CoV-2 M^{pro} (IC₅₀ = 11,3 μM). Il a également montré un profil antiviral impressionnant dans le test CPE contre des cellules Vero E6 infectées par le SRAS-CoV-2 (EC₅₀ = 0,13 μM) [8].

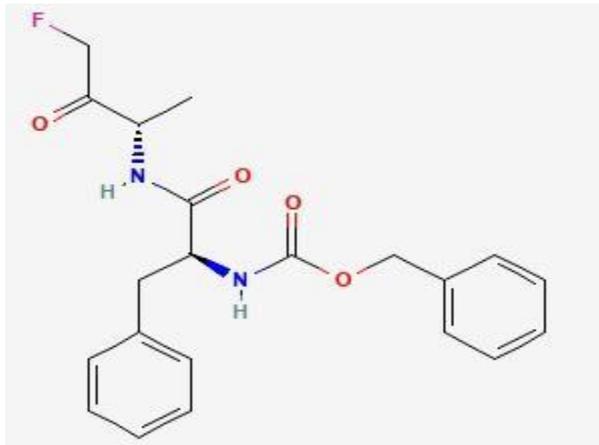


Figure 32: Structure chimique de MFMK qui est un inhibiteur irréversible du SARS-CoV-2 M^{pro} [8].

2.5. Hydroxyméthylcétones

Pfizer a annoncé le développement de deux inhibiteurs de la protéase SARS-CoV-2 M^{pro}, PF-00835231 et PF-07321332 (ou nirmatélvir) [151]. PF-00835231 possède une fraction hydroxyméthylcétone, tandis que PF-07321332 contient une ogive de nitriles, tous deux interagissent avec la cystéine catalytique (Cys145) pour inactiver les protéases [152].

Les deux inhibiteurs présentent un cycle γ -lactame en position P1 et un groupe hydrophobe en P2, imitant le substrat naturel de l'enzyme (Fig. 33) [151].

Dans le cas de PF-00835231, un résidu glutamine ou bioisostère est incorporé à la position P1, pour donner la puissance, la sélectivité et un échafaudage peptidique mésomorphe avec des substitutions hydrophobes ramifiées aux deux positions P2 et P3. Le groupement électrophile forme une liaison covalente entre les résidus de cystéine du site actif (C145), pré-activés par l'histidine résiduelle (H41) et l'inhibiteur. [153]



Figure 33: PF-00835231, à gauche, et PF-07321332, à droite. P2 est surligné en bleu et P1 en orange [151].

2.6. Acyloxyméthylcétone

Les sondes basées sur l'activité (APBs) sont de petites molécules organiques qui se lient activement à une forme de l'enzyme cible via une liaison covalente. Il se compose de trois parties : (1) un groupe de réaction électrophile ou ogive, (2) un espaceur qui peut inclure des marqueurs de séquence pour lier sélectivement une enzyme cible spécifique qui peut être une protéase, et (3) une marque de divulgation [154].

Les ABPs portant le fragment acyloxyméthyl cétone ont été les premiers capteurs synthétisés pour détecter le SARS-CoV-2 M^{pro} [8], basé sur l'électrophilie réactive de la cystéine (AOMK) [155]. Outre l'ogive, il se caractérise par la présence d'un simulé squelette portant un résidu peptidique Acides aminés pour la reconnaissance spécifique de SARS-CoV-2 M^{pro} (Fig. 34) [8].

Un complexe de complexes peptidiques imitant les ogives acyloxyméthylcétone conçues pour former une liaison covalente irréversible avec Cys145 a montré des valeurs IC₅₀ par rapport au SARS-CoV-2 M^{pro} de l'ordre du nanomètre. Il a également empêché la réplication du SARS-CoV-2 et fourni une faible cytotoxicité et une bonne stabilité,[156].

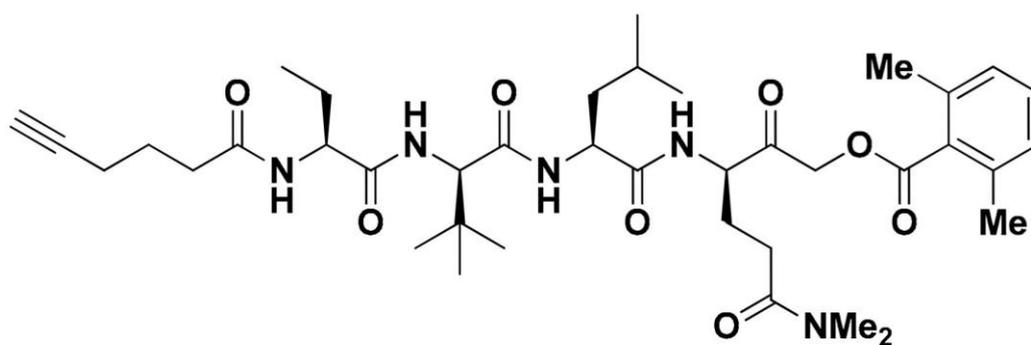
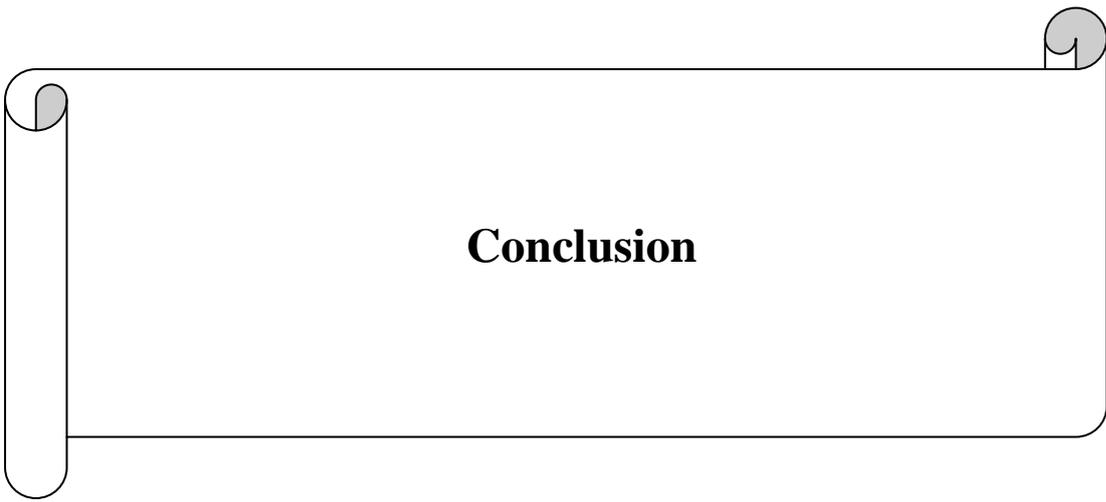


Figure 34: Structure chimique et activité biologique de l'acyloxyméthyl cétone [8].



L'infection par le SARS-CoV-2 est un problème de santé mondial en raison des variables émergentes du COVID-19, face à cette situation, la course pour trouver des traitements efficaces s'est considérablement accélérée. Dans cette étude, l'une des stratégies de traitement est la découverte de médicaments en ciblant des protéines essentielles dans le cycle de vie viral. En utilisant le Banque de Données sur les Protéines (PDB) et logiciel PyMOL, nous avons analysé la structure 3D de la protéase principale (M^{pro}) en tant que cible médicamenteuse attrayante car elle joue un rôle central dans la médiation de la transcription et de la réplication virales et de sa conservation parmi d'autres virus apparentés. De plus, nous avons mentionné la plupart des inhibiteurs de protéase principale (M^{pro}).

Une série de candidats-médicaments ont été signalés à ce jour. Certains de ces agents médicamenteux ont été transmis, qui étaient auparavant conçus pour d'autres applications avec approbation de médicament. Ils fonctionnent bien sur les antigènes d'étude *in vitro* du SARS-CoV-2 et peuvent rapidement entrer dans des études cliniques supplémentaires. Les autres facteurs sont principalement conçus sur la base de l'architecture 3D de M^{pro} . Ces composés ont montré une caractéristique d'inhibition et une spécificité plus fortes vis-à-vis de M^{pro} . Avec l'aide de l'étude structurale, des modes d'inhibition plus précis ont été identifiés, ce qui fournirait des informations uniques sur l'augmentation de l'utilisation des médicaments.

La stratégie qui combine la conception de médicaments basée sur la structure avec le criblage virtuel a montré un potentiel prometteur. Une telle stratégie peut faciliter la préparation de communauté biomédicale à l'avance pour toute future pandémie causée par l'émergence d'un virus mortel.

Références

- [1] Wang.M , Zhao.R , Gao.L , Gao.X , Wang.D , and Gallagher.T , “SARS-CoV-2 : Structure , Biology , and Structure-Based Therapeutics Development,” vol. 10, no. November, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.587269.
- [2] Jukić.M , Škrlić.B , Tomšić.G , Pleško.S , Podlipnik, and Bren.U , “Prioritisation of Compounds for 3CL pro Inhibitor Development on SARS-CoV-2 Variants,” pp. 1–14, 2021.
- [3] Outcomes.M , “Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China,” vol. 323, no. 11, pp. 1061–1069, 2020, doi: 10.1001/jama.2020.1585.
- [4] Oerlemans.R *et al.*, “Repurposing the HCV NS3–4A protease drug boceprevir as COVID-19 therapeutics ,” pp. 370–379, 2021, doi: 10.1039/d0md00367k.
- [5] Douangamath.A *et al.*, “Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease,” *Nat. Commun.*, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18709-w.
- [6] Gu.H *et al.*, “Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy,” vol. 1607, no. September, pp. 1603–1607, 2020.
- [7] Tcheshnokova.V *et al.* , “Acquisition of the L452R Mutation in the ACE2-Binding Interface of Spike Protein Triggers Recent Massive Expansion of SARS-CoV-2 Variants,” vol. 2, pp. 1–10, 2021.
- [8] Citarella.A , Scala.A , Piperno.A , and Micale.N , “SARS-CoV-2 M pro : A Potential Target for Peptidomimetics and Small-Molecule Inhibitors,” pp. 1–34, 2021
- [9] Wang G, Nair MES, Liu D, et al. Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature* 2021; 1–6 (consulter le 26.08.2021).
- [10] Kleemm, A.; Ebeert, C.; Calleja, D.G.; Allison, C.G.; Richardson, L.V.; Bernardini, J.P.; Lu, B.G.; Kuchel, N.W.; Grohmann, C.; Shibata, Y.; et al. Mechanism and inhibition of SARS-CoV-2 PLpro. *Biorxiv* 2020.
- [11] Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, Hu Y, Tao Z-W, Tian J-H, Pei Y-Y, Yuan M-L, Zhang Y-L, Dai F-H, Liu Y, Wang Q-M, Zheng J-J, Xu L, Holmes EC & Zhang Y-Z (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579: 265–269
- [12] Wang C, Horby PW, Hayden FG & Gao GF (2020a) A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet* **395**: 470–473
- [13] Chen Y, Liu Q & Guo D (2020b) Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* **92**: 418–423.
- [14] Coronaviridae - Virus à ARN à sens positif - Virus à ARN à sens positif (2011) - ICTV [Internet]. [cité 26 nov 2020]. Disponible sur:https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-naviruses2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae
- [15] HuloG., de Castro R., Masson, B. Viraleone: a knowledge resource to

- understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D576–D582.(consulter le 13.08.2021).
- [16] Mourez T., Burrel S., Boutolleau, E., Piellet S. Société française, de microbiologie; Paris: 2019. *Traité de virologie médicale*. 793 p. (consulter le 13.08.2021). [Google Scholar]
- [17] Yee Z.V., Yeuan C., Yuen G.S. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci.* 2020;16(10):1686–1697. (consulter le 29.08.2021).[Article PMC gratuit] [PubMed] [Google Scholar]
- [18] Malcolm, B.A. The picornaviral 3C proteinases: Cysteine nucleophiles in serine proteinase folds. *Prot. Sci.* 1995, 4,1439–1445.
- [19] Jin, Q.; Du, XX.; Xu, YE.; Deng, VX.; Lieu., ME.; Zhao, YA.; Zhang, P.; Li, X.; Zhang, L.; Peng, C.; et al. Structure of Mpro from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors. *Nature* 2020, 582, 289–293.(consulter le 28.08.2021).[PubMed]
- [20] Anand, R.; Ziebuhr, G.; Wadhwani, P.; Mesters, J.R.; Hilgenfeld, R. Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure:Basis for Design of Anti-SARS Drugs. *Science* 2003, 300, 1763–1767. (consulter le 01.09.2021).
- [21] Hilgenfeld., F. From SARS to MERS,: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design.*FEBS J.* 2014; 281:4085–4096
- [22] Hilgenfeld, R. From SARS to MERS: Crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design.*FEBS* 2014, 281, 4085–4096 [https://febs.onlinelibrary.wiley.com/journal/17424658]
- [23] M, Vivaldo Gomes da Costa, Marcos LázaroMoreli, Marielena, Vogel Saivish; *The emergence of SARS, MERS and novel SARS-2 coronaviruses in the 21st century*; Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature; 22 Avril 2020.
- [24] Didier Raoult et al., ; Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label nonrandomized clinical trial ; *ELSEVIER* ; Avril 2020.
- [25] Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, Guo L, Guo R, Chen T, Hu J, Xiang Z, Mu Z, Chen X, Chen J, Hu K, Jin Q, Wang J & Qian Z (2020) Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* **11**: 1–12.
- [26] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE & Acton S (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* **87**: E1-9.
- [27] Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B & Pöhlmann S (2005) Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 7988–7993.
- [28] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, Graham BS & McLellan JS (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the

- prefusion conformation. *Science* **367**: 1260–1263.
- [29] Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE & Ling AE (2003) Early events of SARS coronavirus infection in vero cells. *J. Med. Virol.* **71**: 323–331.
- [30] Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfeifferle S, Steffen I, Tsegaye TS, He Y, Gnirss K, Niemeyer D, Schneider H, Drosten C & Pöhlmann S (2011) Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *J. Virol.* **85**: 4122–4134.
- [31] Huang I-C, Bosch BJ, Li F, Li W, Lee KH, Ghiran S, Vasilieva N, Dermody TS, Harrison SC, Dormitzer PR, Farzan M, Rottier PJM & Choe H (2006) SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 3198–3203
- [32] Fehr AR & Perlman S (2015) Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses* **1282**: 1–23.
- [33] “Symptômes, transmission et traitement _ Gouvernement du Québec.” [En ligne].Adresse URL: <https://www.quebec.ca/sante/problemes-de-sante/a-z/coronavirus-2019/symptomes-transmission-traitement>
- [34] Zhou .L , Ayeh .S .K , Chidambaram .V , and Karakousis .P .C , “Modes of transmission of SARS-CoV-2 and evidence for preventive behavioral interventions,” pp. 1–9, 2021.
- [35] Ramanathan.K , *et al* , “Modes de transmission du SARS-CoV-2 : que sait-on actuellement ?,” no. January, pp. 1–12, 2020.,
- [36] “Diagnostic biologique de l’infection à Sars-CoV-2 : stratégies et interprétation des résultats,” no. January, pp. 48–56, 2020.
- [37] Marih. L , and Sodqi .M , “Diagnostic de l ’ infection par le SARS-CoV2 MONOGRAPHIE COVID-19 Diagnosis of SARS-CoV2 infection,” no. June, pp. 14–17, 2021, doi: 10.48087/BJMStf.2020.S714.
- [38] Gala .J , Nyabi .O, Durant . J , Chibani .N , and Bentahir.N , “Méthodes diagnostiques du COVID-19,” no. 1, pp. 228–235.
- [39] “SARS-CoV-2 (Covid-19) _ Test Rapide IgG_IgM pour le diagnostic Clinisciences.” [En ligne].Adresse URL: <https://www.clinisciences.com/lire/newsletter-26/sars-cov-2-covid-19-test-rapide-2264.html>
- [40] “Découvrez le rôle clef de l’imagerie dans la prise en charge du covid-19.” [En ligne].Adresse URL: <https://www.nehs-digital.com/decouvrez-le-role-clef-de-limagerie-dans-la-prise-en-charge-du-covid-19/>
- [41] “Imagerie pulmonaire de la COVID19 _ le scanner, un examen clé à prescrire à bon escient.” [En ligne].Adresse URL: <https://www.vidal.fr/actualites/26133-imagerie-pulmonaire-de-la-covid-19-le-scanner-un-examen-cle-a-prescrire-a-bon-escient.html>
- [42] Poggiali .E ,*et al.*, “Can Lung US Help Critical Care Clinicians in the Early

- Diagnosis of Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia?,” vol. 2, no. 8, p. 1, 2020.
- [43] Mahieu.R , and Dubée .V , “Diagnostic d ’ infection par le SARS-CoV-2 : tests disponibles et stratégie en réanimation Diagnosis of SARS-CoV-2 infection : available tests and strategy in the Intensive Care Unit,” vol. 30, pp. 19–26, 2021.
- [44] Statement .C , “The species Severe acute respiratory syndrome- related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2,” vol. 5, no. March, pp. 536–544, 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
- [45] Trebu .M , Špakovsk .T , Schnitzer.M , Bednarč . L , and Živč . J , “Comparison of Selected Characteristics of SARS-CoV-2, SARS-CoV, and HCoV-NL63,” pp. 1–14, 2021.
- [46] Harvey . W. T ,*et al.*, “SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape,” *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, no. July, pp. 409–424, 2021, doi: 10.1038/s41579-021-00573-0.
- [47] Khateeb .J , Li .Y , and Zhang .H , “Emerging SARS - CoV - 2 variants of concern and potential intervention approaches,” *Crit Care*, pp. 1–8, 2021, doi: 10.1186/s13054-021-03662-x.
- [48] Pendant .D , “Évolution génétique du Sars-CoV-2 et ses conséquences,” no. January, pp. 21–23, 2020.
- [49] Pond .S .L .K , Fera .D , and Shafer .R .W , “The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants,” vol. 22, no. December, p. 757_773, 2021, doi: 10.1038/s41576-021-00408-x.
- [50] Hall.V , Ferreira.V ,Ku. T ,*et al.*, "Randomized of a third Dose of mRNA-1273 vaccin in transplant Recipients ",*New England Journal of Medicine*, Vol.385, pp.1244-1246, 2021,dio: 10.1056/nejmc2111462.
- [51] Phanas.D ,Veyer.D ,Baidaliuk .A ,*et al.*, "Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 Varriant Delta to antibody neutralization" , *Nature*, Vol.596, pp.276-280 , 2021,[online] . Available: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-0377>.
- [52] Harey.W ,Carabeli. A ,Jackson. B ,*et al.* "SARS-CoV-2 variant, spike mutations and immune escape" .*Nature reviews Microbiology*, Vol.19 ,no.July, pp.409-424, 2021 ,[online].Available: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-021-0057>.
- [53] Zohao. H ,*et al.*, SARS-CoV-2 "Omicon variant show less efficient replication and fusion activity when compared with Delta variant in TMPRSS2-expressed cells" ,*Energin Microbes Infections*, Vol.11, pp.1-8,2022 ,[online] .Available: <https://org/10.1080/22221751.2021.2023329>.
- [54] Lecroart.A , “Étude exploratoire sur les facteurs influençant la vaccination contre le SARS-CoV-2 parmi les professionnels de la santé,” pp. 1–56.
- [55] Dauby .N , “Impact sociétal de la vaccination : au-delà de la protection individuelle,” *Rev Med Liege*, vol. 75, no. November, pp. 170–175, 2020.
- [56] Moselle . E, and Zeneca .A ,, “Stratégie vaccinale contre la Covid-19 : impact potentiel de la circulation des variants du SARS-CoV-2 sur la stratégie,” pp. 1–

- 33, 2021.
- [57] Autran .B .C .B , “Vaccins contre le SARS-CoV-2; 9 Juillet 2020; Une stratégie de vaccination,” pp. 1–24, 2020.
- [58] Creech .C .B , Walker.S .C , and Samuels.R.J , “SARS-CoV-2 Vaccines,” pp. 1–3, 2021.
- [59] WIAM .K , “vaccins anti covid-19 et stratégie nationale de vaccination,” pp. 1–135, 2021.
- [60] Billon-denis .E , “COVID-19 et vaccination : une dérégulation globale,” vol. 36, pp. 1034–1037, 2020.
- [61] Lefevre . B ,*et al.*, “Impact of B.1.351 (beta) SARS-CoV-2 variant on BNT162b2 mRNA vaccine effectiveness in long-term care facilities of eastern France: a retrospective cohort study,” *medRxiv*, vol. 351, pp. 1–21, 2021, [Online]. Available: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.07.28.21261285v1%0Ahttps://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.07.28.21261285v1.abstract>
- [62] Cong Zeng *et al.*, “COVID-19 mRNA booster vaccines elicit strong protection against SARS-CoV-2 Omicron variant in patients with cancer Cong,” no. January, pp. 117–119, 2022.
- [63] “Quels sont les différents types de vaccins contre la COVID-19 ? | Adios Corona.” 2021. [Online]. Available: <https://www.adioscorona.org/questions-reponses/2021-01-28-quels-sont-les-différents-types-de-vaccins-contre-la-covid-19.html>
- [64] Botton. J, *et al.*, “Évaluation du r isque d ’ infarctus du myocarde , d ’ accident vasculaire cérébral et d ’ embolie pulmonaire suite aux différents vaccins anti-COVID-19 chez les adultes de moins de 75 ans en France Rapport complet,” pp. 1–14, 2022.
- [65] Kircheis.R , “Coagulopathies after vaccination against sars-cov-2 may be derived from a combined effect of sars-cov-2 spike protein and adenovirus vector-triggered signaling pathways,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 19, pp. 1–25, 2021, doi: 10.3390/ijms221910791.
- [66] Meylan .P , “Sécurité et efficacité du vaccin Sputnik V,” *Rev Med Suisse*, vol. 17, no. 728, p. 463, 2021, doi: 10.53738/revmed.2021.17.728.0463.
- [67] “Déclaration du Comité consultatif (DCC) Comité consultatif national de l ’ immunisation (CCNI),” no. Dcc, pp. 1–25, 2022.
- [68] Malabadi.R .B ,Meti .N.T , and Chalannavar.R .K , “Applications of nanotechnology in vaccine development for coronavirus (SARS-CoV-2) disease (Covid-19),” *Int J Res Sci Innov*, vol. 8, no. 2, pp. 191–198, 2021, [Online]. Available: www.rsisinternational.org
- [69] “Recommandations provisoires pour l’utilisation du vaccin anti-COVID-19 inactivé BIBP développé par China National Biotec Group (CNBG), Sinopharm,” vol. 2021, pp. 1–10, 2021.
- [70] “Recommandations provisoires pour l ’ utilisation du vaccin anti-COVID-19

- inactivé CoronaVac développé par Sinovac,” pp. 1–8, 2021.
- [71] Ranzani. O.T ,*et al.*, “Effectiveness of the CoronaVac vaccine in older adults during a gamma variant associated epidemic of covid-19 in Brazil: Test negative case-control study,” *BMJ*, vol. 374, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1136/bmj.n2015.
- [72] Sussman.J.L *et al.*, “Protein Data Bank (PDB): Database of three-dimensional structural information of biological macromolecules,” *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*, vol. 54, no. 6 I, pp. 1078–1084, 1998, doi: 10.1107/S0907444998009378.
- [73] Burley .S.K , Berman .H .M , Kleywegt .G .J , Markley . J.L , H. Nakamura. H , and Velankar . S , “Protein Data Bank (PDB): The single global macromolecular structure archive,” *Methods Mol Biol*, vol. 1607, pp. 627–641, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-7000-1_26.
- [74] Nawal.S.H , “Bioinformatique et modélisation,” pp. 1–50, 2019.
- [75] Yuan .S , Chan. H. C. S , and Z. Hu .Z , “Using PyMOL as a platform for computational drug design,” *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*, vol. 7, no. 2, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1002/wcms.1298.
- [76] Interface.T .P , “Practical Pymol for Beginners,” *Change*, pp. 1–7, 2009.
- [77] “Le logiciel PyMOL,” pp. 1–23, 2015.
- [78] Gossen.J *et al.*, “A blueprint for high affinity SARS-CoV-2 Mpro inhibitors from activity-based compound library screening guided by analysis of protein dynamics,” pp. 1–36, 2020.
- [79] Gimeno.A , Mestres-truyol.J , and Macip.G , “Prediction of Novel Inhibitors of the Main Protease (M-pro) of SARS-CoV-2 through Consensus Docking and Drug Reposition,” no. May 2020.
- [80] Amamuddy.O .S , Verkhivker.G. M , and Bishop.O .T , “Impact of Early Pandemic Stage Mutations on Molecular Dynamics of SARS-CoV 2 M pro,” pp. 5080–5102, 2020, doi: 10.1021/acs.jcim.0c00634.
- [81] Bung.N , “De novo design of new chemical entities for SARS-CoV-2 using artificial intelligence,” vol. 13, pp. 575–585, 2021.
- [82] Coelho.C , Gloria.G , Campos.C .B , Hardy.L , and Wu.M , “Biochemical screening for SARS-CoV-2 main protease inhibitors,” pp. 1–11, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0240079.
- [83] Zhang.L , Lin.D , Sun.X , Curth.U , and Drosten.C , “Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a - ketoamide inhibitors,” vol. 412, no. April, pp. 409–412, 2020.
- [84] Garg.S and Roy .A , “In silico analysis of selected alkaloids against main protease (Mpro) of SARS-CoV-2,” no. January, pp. 1–13, 2020.
- [85] Ullrich.S , Nitsche. C , "The SARS-CoV-2 main protease as drug target ", *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, pp .1-8 , 2020.
- [86] Goyal.B and Goyal.D , “Targeting the Dimerization of the Main Protease of

- Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy,” pp. 297–305, 2020, doi: 10.1021/acscombsci.0c00058.
- [87] Kneller.D.W , Phillips.G , Kovalevsky.A , and Coates.L , “Room-temperature neutron and X-ray data collection of 3CL M pro from SARS-CoV-2 research communications,” pp. 483–487, 2020, doi: 10.1107/S2053230X20011814.
- [88] Cui.W , Yang.K , and Yang.H , “Recent Progress in the Drug Development Targeting SARS-CoV-2 Main Protease as Treatment for Covid-19,” vol. 7, no. December, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.616341.
- [89] Kneller.D.W et al., “Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography,” *Nat. Commun.*, no. 2020, pp. 1–6, doi: 10.1038/s41467-020-16954-7.
- [90] Mengist.H.M , Dilnessa.T , and Jin.T , “Structural Basis of Potential Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Main Protease,” vol. 9, no. March, pp. 1–19, 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.622898.
- [91] Parmar. M *et al*, “Structural differences in 3C-like protease (Mpro) from SARS-CoV and SARS-CoV-2: Molecular insights for drug repurposing against COVID-19 revealed by molecular dynamics simulations.” pp.1-32, 2021, doi:10.1101/2021.08.11.455903.
- [92] Bahadur. A, Ajmal. M, Lee. J, and Abul. M, "Unravelling lead antiviral phytochemicals for the inhibition of SARS-CoV-2 Mpro enzyme through in silico approach," no.January, pp.1-13, 2020.
- [93] Mengist.H.M , “Designing of improved drugs for COVID-19 : Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease M pro,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, no. April, pp. 1–2, 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0178-y.
- [94] “ Mpro, 3CL Protease from coronavirus SARS-COV-2 recombinant protein, lyophilized powder _ Sigma-Aldrich.” [En ligne].Adresse URL: <https://www.sigmaaldrich.com/DZ/fr/product/sigma/sae0172>
- [95] Lu. X. T, Sims. A. C, and Denison. M. R , “Mouse Hepatitis Virus 3C-Like Protease Cleaves a 22-Kilodalton Protein from the Open Reading Frame 1a Polyprotein in Virus-Infected Cells and In Vitro,” *J. Virol.*, vol. 72, no. 3, pp. 2265–2271, 1998, doi: 10.1128/jvi.72.3.2265-2271.1998.
- [96] Chan. H. T *et al.*, “Discovery of SARS-CoV-2 Mpropeptide inhibitors from modelling substrate and ligand binding,” *Chem. Sci.*, vol. 12, no. 41, pp. 13686–13703, 2021, doi: 10.1039/d1sc03628a.
- [97] “ Poursuite de l’optimisation des inhibiteurs covalents à base de pyrazoline réactifs à la cystéine pour le SARS-CoV-2 Mpro.” [En ligne].Adresse URL: <https://ma-clinique.fr/poursuite-de-loptimisation-des-inhibiteurs-covalents-a-base-de-pyrazoline-reactifs-a-la-cysteine-pour-le-sars-cov-2-mpro>
- [98] “ Protéase 3C-like — Wikipédia.”, [En ligne].Adresse URL: https://fr.wikipedia.org/wiki/Prot%C3%A9ase_3C-like
- [99] Pubchem, [En ligne].Adresse URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [100] Uzunova.K , Filipova.E , Pavlova.V , and Vekov.T , “Insights into antiviral

- mechanisms of remdesivir, lopinavir/ritonavir and chloroquine/hydroxychloroquine affecting the new SARS-CoV-2,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 131, no. August, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110668.
- [101] Costanzo.M , De Giglio.M.A.R , and Roviello.G.N , “SARS-CoV-2: Recent Reports on Antiviral Therapies Based on Lopinavir/Ritonavir, Darunavir/Umifenovir, Hydroxychloroquine, Remdesivir, Favipiravir and other Drugs for the Treatment of the New Coronavirus,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 27, no. 27, pp. 4536–4541, 2020, doi: 10.2174/0929867327666200416131117.
- [102] Jang.M *et al.*, “Lopinavir-ritonavir is not an effective inhibitor of the main protease activity of SARS-CoV-2 in vitro,” *bioRxiv*, pp. 1–12, 2020, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.299800>
- [103] Banerjee.R , Perera.L , and Tillekeratne.L.M.V , “Potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors,” *Drug Discov. Today*, vol. 26, no. 3, pp. 804–816, 2021, doi: 10.1016/j.drudis.2020.12.005.
- [104] Komatsu.T.S *et al.*, “Drug binding dynamics of the dimeric SARS-CoV-2 main protease, determined by molecular dynamics simulation,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-74099-5.
- [105] Ampornnanai.K *et al.*, “Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–7, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-23313-7.
- [106] Lv.Z , Cano.K.E , Jia.L , Drag.M , Huang.T.T , and Olsen.S.K , “Targeting SARS-CoV-2 Proteases for COVID-19 Antiviral Development,” *Front. Chem.*, vol. 9, no. February, pp. 1–31, 2022, doi: 10.3389/fchem.2021.819165.
- [107] Beltrán.L.A , De La Hoz-Rodríguez.S , Iserte.L.B , Rodríguez.S , Fernández-De-La-pradilla.A , and F. V. González , “Advances in the Development of SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors,” *Molecules*, vol. 27, no. 8, pp. 1–15, 2022, doi: 10.3390/molecules27082523.
- [108] Menéndez.C.A , Byléhn.F , Perez-Lemus.G.R , Alvarado.W , and Pablo.J.J , “Molecular characterization of ebselen binding activity to SARS-CoV-2 main protease,” *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 37, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1126/sciadv.abd0345.
- [109] Stroylov .V.S, and Svitanko.I.V , “Computational identification of disulfiram and neratinib as putative SARS-CoV-2 main protease inhibitors,” *Mendeleev Commun.*, vol. 30, no. 4, pp. 419–420, 2020, doi: 10.1016/j.mencom.2020.07.004.
- [110] Ma.C , Tan.H , Choza.J , Wang.Y , and Wang.J , “Validation and invalidation of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using the Flip-GFP and Protease-Glo luciferase assays,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 12, no. 4, pp. 1636–1651, 2022, doi: 10.1016/j.apsb.2021.10.026.
- [111] Xu.L , Tong.J , Wu.Y , Zhao.S , and Lin.B.L , “A computational evaluation of targeted oxidation strategy (TOS) for potential inhibition of SARS-CoV-2 by disulfiram and analogues,” *Biophys. Chem.*, vol. 276, no. April, pp. 1–6, 2021, doi: 10.1016/j.bpc.2021.106610.

- [112] Cao.W *et al.*, “Evaluation of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors Using a Novel Cell-Based Assay,” *ACS Cent. Sci.*, vol. 8, no. 2, pp. 192–204, 2022, doi: 10.1021/acscentsci.1c00910.
- [113] Li .Z *et al.*, “Identify potent SARS-CoV-2 main protease inhibitors via accelerated free energy perturbation-based virtual screening of existing drugs,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 44, pp. 27381–27387, 2020, doi: 10.1073/pnas.2010470117.
- [114] Narayanan.A *et al.*, “Identification of SARS-CoV-2 inhibitors targeting Mpro and PLpro using in-cell-protease assay,” no. 2022, pp. 1–17, doi: 10.1038/s42003-022-03090-9.
- [115] Kumar.V , Singh.R , Das.P , and Purohit.R , “Evaluation of acridinedione analogs as potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors and their comparison with repurposed anti-viral drugs,” no. January, pp. 1–13, 2020.
- [116] Sacramento.C.Q *et al.*, “Atazanavir Is a Competitive Inhibitor of SARS-CoV-2 M pro , Impairing Variants Replication In Vitro and In Vivo sible for RNA replication and transcription of structural genes .,” pp. 1–14, 2022.
- [117] Fintelman-Rodrigues.N , Sacramento.C.Q , Carlyle Ribeiro Lima, and da Silva.F.S , “Atazanavir, Alone or in Combination with Ritonavir, Inhibits SARS-CoV-2 Replication and Proinflammatory Cytokine Production,” vol. 6, pp. 1–12, 2019.
- [118] Araújo.J.L , Sousa.CL.A , Sousa.A.E , and Bastos.R.S , “DFT, Molecular Docking, and ADME/Tox Screening Investigations of Market -Available Drugs against SARS -CoV -2,” vol. 32, no. 8, pp. 1628–1641, 2021.
- [119] Pramod.A *et al.*, “Computational basis of SARS-CoV 2 main protease inhibition : an insight from molecular dynamics simulation based findings,” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1080/07391102.2021.1922310.
- [120] Ghahremanpour.M.M *et al.*, “Identi fi cation of 14 Known Drugs as Inhibitors of the Main Protease of SARS-CoV - 2,” pp. 2526–2533, 2020, doi: 10.1021/acsmchemlett.0c00521.
- [121] Qu.H , Zheng.Y , Wang.Y , Li.H , and Liu.X , “The potential effects of clinical antidiabetic agents on SARS-CoV-2,” no. July, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1111/1753-0407.13135.
- [122] Wang.Z and Yang.L , “Chinese herbal medicine: Fighting SARS-CoV-2 infection on all fronts Zhonglei,” no. January, pp. 1–18, 2020.
- [123] Zhao.J *et al.*, “Exploration of SARS-CoV - 2 3CL pro Inhibitors by Virtual Screening Methods , FRET Detection , and CPE Assay,” *J. Chem. Inf. Model.*, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1021/acs.jcim.1c01089.
- [124] Wang.Z , Yang.L , and Zhao.X , “Co-crystallization and structure determination : An effective direction for anti-SARS-CoV-2 drug discovery,” *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 19, no. 57, pp. 4684–4701, 2021, doi: 10.1016/j.csbj.2021.08.029.

- [125] Li.J *et al.*, “Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease in complex with the natural product inhibitor shikonin illuminates a unique binding mode,” no. January, pp. 1–4, 2020.
- [126] Yang.H , “Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development,” *Nat. Rev. Microbiol.*, pp. 685–700, doi: 10.1038/s41579-021-00630-8.
- [127] Thakur.K.G , “Potential inhibitors of SARS-CoV-2 Main protease (Mpro) identified from the library of FDA approved drugs using molecular docking studies Dipesh,” no. April, pp. 1–24, 2020, doi: 10.20944/preprints202004.0149.v1.
- [128] Huynh.T , Wang.H , and Luan.B , “In Silico Exploration of the Molecular Mechanism of Clinically Oriented Drugs for Possibly Inhibiting SARS-CoV-2 ’ s Main Protease,” pp. 4413–4420, 2020, doi: 10.1021/acs.jpcllett.0c00994.
- [129] Jin.Z *et al.*, “Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 27, no. June, pp. 529–532, 2020, doi: 10.1038/s41594-020-0440-6.
- [130] Hemati.N , Hadidi.S , Shiri.F , and Hosein.M , “Structural modification of antineoplastic drug carmofur designed to the inhibition of SARS-CoV-2 main protease : A theoretical investigation,” *Results Chem.*, vol. 4, no. October 2021, pp. 1–5, 2022, doi: 10.1016/j.rechem.2021.100259.
- [131] Are.S *et al.*, “Ebselen, Disulfiram, Carmofur, PX-12, Tideglusib, and Shikonin Are Nonspecific Promiscuous SARS-CoV - 2 Main Protease Inhibitors,” pp. 1265–1277, 2020, doi: 10.1021/acsptsci.0c00130.
- [132] Monajemi and .H , Zain.S.M , “Strong inhibition of M-Protease activity of Coronavirus by using PX-12 inhibitor based on ab initio ONIOM calculations,” pp. 136–140, 2021, doi: 10.1177/1747519820938025.
- [133] Shekh.S , Reddy.K.K.A , and K. Gowd.H , “In silico allicin induced S - thioallylation of SARS-CoV-2 main protease,” *J. Sulfur Chem.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1080/17415993.2020.1817457.
- [134] Chen.H *et al.*, “First clinical study using HCV protease inhibitor danoprevir to treat COVID-19 patients,” vol. 0, no. October, pp. 1–9, 2020.
- [135] Usud.D , Jesus.L , Pereira.M.M , Ramos.L.D.S , and De.T.P , “Protease Inhibitors as Promising Weapons against COVID-19 : Focus on Protease Inhibitors as Promising Weapons against COVID-19 : Focus on Repurposing of Drugs Used to Treat HIV and HCV Infections,” no. June, pp. 1–11, 2021, doi: 10.2174/1568026621666210701093407.
- [136] Moreno and B. Alcázar.S , “Use of Antivirals in SARS-CoV-2 Infection . Critical Review of the Role of Remdesivir,” no. March, pp. 117–141, 2022.
- [137] Tallei.T.E *et al.*, “Potential of Plant Bioactive Compounds as SARS-CoV-2 Main Protease (M pro) and Spike (S) Glycoprotein Inhibitors : A Molecular Docking Study,” vol. 2020, pp. 1–18, 2020.
- [138] Han.Y , Wang.Z , Ren.J , Wei.Z , and Li.J , “Potential inhibitors for the novel

- coronavirus (SARS-CoV-2),” vol. 00, no. April, pp. 1–7, 2020, doi: 10.1093/bib/bbaa209.
- [139] Hu.Y , Ma.C , Szeto.T , and Hurst.B , “Boceprevir, calpain inhibitors II and XII, and GC-376 have broad-spectrum antiviral activity against coronaviruses in cell culture,” pp. 1–36, 2020.
- [140] Rawson.J.M.O , Duchon.A , Nikolaitchik.O.A , Pathak.V.K , and Hu.W , “Development of a Cell-Based Luciferase Complementation Assay for Identification of SARS-CoV-2 3CL pro Inhibitors,” pp. 1–16, 2021.
- [141] Ma.C *et al.*, “Boceprevir , GC-376 , and calpain inhibitors II , XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease,” *Cell Res.*, no. June, pp. 678–692, 2020, doi: 10.1038/s41422-020-0356-z.
- [142] Sacco.M.D *et al.*, “Structure and inhibition of the SARS-CoV-2 main protease reveal strategy for developing dual inhibitors against M pro and cathepsin L,” no. December, pp. 1–15, 2020.
- [143] Kitamura.N *et al.*, “An expedited approach towards the rationale design of non-covalent SARS-CoV-2 main protease inhibitors with in vitro antiviral activity,” pp. 1–31, 2020.
- [144] Macip.G , Truyol.J.M , Massagué.A.C , and Pujadas.G , “Haste makes waste : A critical review of docking - based virtual screening in drug repurposing for SARS - CoV - 2 main protease (M - pro) inhibition,” no. March 2021, pp. 744–769, 2022, doi: 10.1002/med.21862.
- [145] Griffin.J .W .D , “SARS-CoV and SARS-CoV-2 main protease residue interaction networks change when bound to inhibitor N3,” no. January, pp. 1–10, 2020.
- [146] Jin.Z , Du.X , Xu.Y , Deng.Y , Liu.M , and Zhao.Y , “Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors,” *Nature*, vol. 582, no. June, pp. 289–292, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2223-y.
- [147] Journal.J , “Identification of potential SARS-CoV- 2 main protease inhibitors from Ficus Carica Latex : An in-silico approach,” vol. 2, no. Covid 19, pp. 1–12.
- [148] Hu.F *et al.*, “A novel framework integrating AI model and enzymological experiments promotes identification of SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors and activity-based probe,” vol. 00, no. July, pp. 1–14, 2021.
- [149] Citarella.A and Micale.N , “Peptidyl Fluoromethyl Ketones and Their Applications in Medicinal Chemistry,” pp. 1–31, 2020.
- [150] Antonopoulou.I , Sapountzaki.E , Rova.U , and Christakopoulos.P , “Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (M pro) by repurposing / designing drug-like substances and utilizing nature ’ s toolbox of bioactive compounds,” *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 20, pp. 1306–1344, 2022, doi: 10.1016/j.csbj.2022.03.009.
- [151] Ramos-guzm.C.A , Vel.L , and Ruiz-pern.J.J , “Testing A ff ordable Strategies for the Computational Study of Reactivity in Cysteine Proteases :

- The Case of SARS-CoV - 2 3CL Protease Inhibition,” pp. 1–9, 2022, doi: 10.1021/acs.jctc.2c00294.
- [152] Johansen-leete.J *et al.*, “Antiviral cyclic peptides targeting the main protease of SARS-CoV-2†,” pp. 3826–3836, 2022, doi: 10.1039/d1sc06750h.
- [153] Mart.S , Arafet.K , Lodola.A , Mulholland.A.J , and Katarzyna.S , “Impact of Warhead Modulations on the Covalent Inhibition of SARS- CoV - 2 M,” pp. 698–708, 2022, doi: 10.1021/acscatal.1c04661.
- [154] Sotiropoulou.G , Zingkou.E , and Bisyris.E , “Activity-Based Probes for Proteases Pave the Way to Theranostic Applications,” pp. 1–16, 2022.
- [155] Van De Plassche.M.A.T , Barniol-xicota.M , and Verhelst.S.H.L , “Peptidyl Acyloxymethyl Ketones as Activity-Based Probes for the Main Protease of SARS-CoV-2 **,” pp. 1–7, 2020, doi: 10.1002/cbic.202000371.
- [156] Macip.G , Garcia-segura.P , Mestres-truyol.J , Saldivar-espinoza.B , and Pujadas.G , “A Review of the Current Landscape of SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors : Have We Hit the Bullseye Yet ?,” pp. 1–18, 2022.